

ISSN 2658-6533

# НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

---

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

**11(1) 2025**

**16+**

Сайт журнала:  
[rrmedicine.ru](http://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 11, №1. 2025

СЕТЕВОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2014 г.

ISSN 2658-6533



Volume 11, №1. 2025

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, Hanover Unified Biobank of Hannover Medical School, Hannover, Germany*  
**H.M. Kubeshova**, *MD, PhD, Professor, Masaryk University, Brno, Czech Republic*  
**G. Malerba**, *PhD, Professor of Medical Genetics, University of Verona, Verona, Italy*  
**B. Miljkovic**, *PhD, Professor, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*  
**E. Nkenke**, *MD, DMD, MA, Dr. rer. medic., Full Professor, Medical University of Vienna, Vienna, Austria*  
**M.V. Pokrovsky**, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*  
**A.V. Polonikov**, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Kursk State Medical University, Kursk, Russia*  
**K.I. Prashchayeu**, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Research Medical Center "Gerontology", Moscow, Russia*  
**V.E. Radzinsky**, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*  
**V.V. Ruzhenkova**, *Doct. Sci. (Medicine), Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*  
**A.V. Sorokin**, *Cand. Sci. (Medicine), National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, USA*  
**V.A. Stepanov**, *Academician of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Biology), Professor, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*  
**M.B. Freydin**, *Doct. Sci. (Biology), Queen Mary University of London, London, UK*  
**M.B. Khamoshina**, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*  
**E.K. 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

<b>Alexandra A. Lebedeva, Alexandra I. Kavun, Ekaterina V. Belova, Tatiana G. Antonova, Anna B. Semenova, Olesya A. Kuznetsova, Tatiana V. Grigoreva, Egor M. Veselovsky, Anastasiia N. Taraskina, Maxim V. Ivanov, Vladislav A. Mileyko, Alexey A. Tryakin, Mikhail Y. Fedyanin, Ilya A. Pokataev, Mariya M. Byakhova, Vsevolod N. Galkin</b> Pathway directed mechanisms of anti-EGFR resistance in colorectal cancer (review)	<b>5</b>	<b>Alexandra A. Lebedeva, Alexandra I. Kavun, Ekaterina V. Belova, Tatiana G. Antonova, Anna B. Semenova, Olesya A. Kuznetsova, Tatiana V. Grigoreva, Egor M. Veselovsky, Anastasiia N. Taraskina, Maxim V. Ivanov, Vladislav A. Mileyko, Alexey A. Tryakin, Mikhail Y. Fedyanin, Ilya A. Pokataev, Mariya M. Byakhova, Vsevolod N. Galkin</b> Pathway directed mechanisms of anti-EGFR resistance in colorectal cancer (review)	<b>5</b>
<b>Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова</b> Взаимосвязь мобильных генетических элементов с некодирующими РНК в развитии атеросклероза (обзор)	<b>31</b>	<b>Rustam N. Mustafin, Elza K. Khusnutdinova</b> Relationship of transposable elements with non-coding RNAs in the development of atherosclerosis (review)	<b>31</b>
<b>Р.М. Али, С.В. Ломтева, А.А. Александрова, М.Н. Аммар, И.Г. Буланов, Т.П. Шкурат</b> Ассоциация полиморфного локуса rs4880 гена супероксиддисмутазы 2 ( <i>SOD2</i> ) с синдромом поликистозных яичников: мета-анализ	<b>57</b>	<b>Ruba M. Ali, Svetlana V. Lomteva, Anzhela A. Alexandrova, Manar N. Ammar, Igor G. Bulanov, Tatyana P. Shkurat</b> Association of polymorphic locus rs4880 of superoxide dismutase 2 gene ( <i>SOD2</i> ) with Polycystic Ovary Syndrome: A meta-analysis	<b>57</b>
<b>Т.А. Пономарева</b> Генетические варианты глобулина, связывающего половые гормоны, и гормональный профиль больных генитальным эндометриозом	<b>75</b>	<b>Tatyana A. Ponomareva</b> Genetic variants of sex hormone-binding globulin and hormonal profile in patients with genital endometriosis	<b>75</b>

ФАРМАКОЛОГИЯ,  
 КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACOLOGY

<b>М.М. Манвелян, Э.А. Манвелян, В.А. Батурин, Н.Д. Бунятян</b> Спектр противовоспалительной, противомикробной и противоопухолевой активности производных хиназолина и хиназолинона (обзор)	<b>91</b>	<b>Michael M. Manvelyan, Eleonora A. Manvelyan, Vladimir A. Baturin, Natalia D. Bunyatyan</b> Spectrum of anti-inflammatory, anti-infectious and anti-tumor activity of quinazoline and quinazolinone derivatives (review)	<b>91</b>
<b>Ahmad S. Jamil, Sri Widyarti, Meddy Setiawan, Muhaimin Rifa'i</b> Bioactivity of Vitamin D and <i>Tinospora cordifolia</i> Extract in Increasing Cathelicidin Synthesis and Regulating TNF Alpha Production in CD66a Cells	<b>111</b>	<b>Ahmad S. Jamil, Sri Widyarti, Meddy Setiawan, Muhaimin Rifa'i</b> Bioactivity of Vitamin D and <i>Tinospora cordifolia</i> Extract in Increasing Cathelicidin Synthesis and Regulating TNF Alpha Production in CD66a Cells	<b>111</b>

**КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА**

**MEDICINE**

<b>Л.И. Лащенко, В.Н. Перфилова, Г.Л. Снигур, А.В. Калуев</b> Использование рыб зебраданио ( <i>Zebrafish</i> ) в качестве модельных объектов для изучения возраст-ассоциированных заболеваний (обзор)	<b>120</b>	<b>Lyudmila I. Lashhenova, Valentina N. Perfilova, Grigorij L. Snigur, Alan V. Kalueff</b> The use of <i>Zebrafish</i> ( <i>Danio rerio</i> ) as model subjects for the study of age-associated diseases (review)	<b>120</b>
<b>Polina V. Grebenkina, Valentina A. Mikhailova, Elizaveta V. Tyschuk, Oksana B. Marko, Varvara A. Yukhina, Anastasia M. Gulina, Olesya N. Bespalova, Sergey A. Selkov, Dmitriy I. Sokolov</b> Regulation of natural killer cells cytotoxicity by trophoblast cells: proteins and receptors	<b>142</b>	<b>Polina V. Grebenkina, Valentina A. Mikhailova, Elizaveta V. Tyschuk, Oksana B. Marko, Varvara A. Yukhina, Anastasia M. Gulina, Olesya N. Bespalova, Sergey A. Selkov, Dmitriy I. Sokolov</b> Regulation of natural killer cells cytotoxicity by trophoblast cells: proteins and receptors	<b>142</b>
<b>Н.М. Агарков, В.Н. Агаркова, А.Е. Копылов</b> Особенности тестирования базовой функциональной активности пациентов с саркопеническим ожирением и зрительным дефицитом	<b>164</b>	<b>Nikolay M. Agarkov, Vera N. Agarkova, Andrey E. Kopylov</b> Features of testing the basic functional activity of patients with sarcopenic obesity and visual impairment	<b>164</b>
<b>Е.А. Бодагова, Н.В. Говорин, В.А. Мудров</b> Ассоциация полиморфизмов генов нейромедиаторных систем мозга с риском развития психических нарушений у детей, оставшихся без попечения родителей	<b>178</b>	<b>Ekaterina A. Bodagova, Nikolai V. Govorin, Victor A. Mudrov</b> Association of polymorphisms of genes in neurotransmitter systems of the brain with the risk of developing mental disorders in children left without parental care	<b>178</b>

ГЕНЕТИКА  
GENETICS

DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-1

УДК 616-006.66

# Pathway directed mechanisms of anti-EGFR resistance in colorectal cancer (review)

Alexandra A. Lebedeva<sup>1,2</sup> , Alexandra I. Kavun<sup>1</sup> , Ekaterina V. Belova<sup>1,2,3</sup> ,  
Tatiana G. Antonova<sup>4</sup> , Anna B. Semenova<sup>4</sup> , Olesya A. Kuznetsova<sup>1,5</sup> ,  
Tatiana V. Grigoreva<sup>1,2</sup> , Egor M. Veselovsky<sup>1,6</sup> , Anastasiia N. Taraskina<sup>1</sup> ,  
Maxim V. Ivanov<sup>1,2,7</sup> , Vladislav A. Mileyko<sup>1,2</sup> , Alexey A. Tryakin<sup>5</sup> ,  
Mikhail Y. Fedyanin<sup>5,8,9</sup> , Ilya A. Pokataev<sup>4</sup> , Mariya M. Byakhova<sup>4</sup> ,  
Vsevolod N. Galkin<sup>4</sup>

<sup>1</sup> OncoAtlas LLC,

4/1A Leninsky Ave., Moscow, 119049, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

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

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskie Gory St., Moscow, 119991, Russia

<sup>4</sup> City Clinical Oncological Hospital №1,

18A/7 Zagorodnoye Hgw., Moscow, 117152, Russia

<sup>5</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,

23 Kashirskoe Hgw., Moscow, 115522, Russia

<sup>6</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,

26 Vavilov St., Moscow, 119334, Russia

<sup>7</sup> Moscow Institute of Physics and Technology,

9 Institutskiy Ln., Dolgoprudny, 141701, Russia

<sup>8</sup> Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka”,

8/3 Sosensky Stan St., Kommunarka village, 108814, Russia

<sup>9</sup> Pirogov Russian National Research Medical University,

1 Ostrovityanova St., Moscow, 11799, Russia

*Corresponding author: Alexandra A. Lebedeva (lebedeva\_a\_a\_1@staff.sechenov.ru)*

## Abstract

**Background:** Targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) with cetuximab or panitumumab (anti-EGFR MAb) has been historically reserved for patients with *RAS/BRAF* wild-type advanced colorectal cancer (CRC). However, results of recent studies including PARADIGM and PRESSING evaluating the role of negative hyperselection of *RAS* wild-type CRC by alterations in other genes suggest that other genomic factors beyond *RAS/BRAF/ERBB2* might influence the response to anti-EGFR MAbs in CRC. Although vast, current data on the predictive role of individual biomarkers to anti-EGFR MAb is often misunderstood. **The aim of the study:** In this review, in light of recent findings, we aimed to summarize existing data on the influence of various signaling

pathways and their individual components along with nongenomic factors for the optimal patient selection for anti-EGFR MABs. **Materials and methods:** To collect available information on possible mechanisms of resistance to anti-EGFR MAB in patients with colorectal cancer we searched PubMed and ClinicalTrials.gov in May 2024. We also searched proceedings from the major oncology conferences ESMO, ASCO, and ASCO GI up to May 2024. We further scanned reference lists from eligible publications. **Results:** In this review we outline current knowledge on the mechanisms of resistance to anti-EGFR MABs beyond traditional *KRAS/NRAS/BRAF* mutations in CRC. We focus on the alterations of genes involved in signaling pathways downstream of EGFR that can be detected by comprehensive tumor profiling in real-world clinical practice. **Conclusion:** Despite many mechanisms affecting various signaling pathways beyond the traditional *KRAS/NRAS/BRAF* mutations that are thought to be implicated in the resistance to anti-EGFR MAB in CRC, future efforts are needed to clarify their significance. Ongoing sequencing efforts will clarify the need for expanding the list of alterations routinely tested for the selection of candidates for anti-EGFR MAB. **Keywords:** colorectal cancer; epidermal growth factor receptor; anti-EGFR resistance; cetuximab; panitumumab; anti-EGFR monoclonal antibodies

**For citation:** Lebedeva AA, Kavun AI, Belova EV, et al. Pathway directed mechanisms of anti-EGFR resistance in colorectal cancer (review). *Research Results in Biomedicine*. 2025;11(1):5-30. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-1

**Introduction.** Advanced colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer, and one of the leading causes of cancer-related deaths [1]. Many molecular mechanisms of CRC progression have been described, including genes involved in Ras/Raf/MEK/ERK known as the mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway as well as Wnt/ $\beta$ -catenin, transforming growth factor- $\beta$ 1/SMAD (TGF- $\beta$ /SMAD) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (JAKs/STAT3) pathways [2]. Concomitantly genes regulating metabolism, as well as genes responsible for biotransformation of xenobiotics and antioxidant enzymes etc., affect the effectiveness of anti-EGFR MAB therapy, reducing it [3].

Development and approval of anti-EGFR monoclonal antibodies (MAB), cetuximab and panitumumab, have provided a significant survival benefit for patients with *KRAS/NRAS* (*RAS*) and *BRAF* wild type (wt) CRC [4]7. However, while the development of acquired resistance to treatment is inevitable in most patients, some patients demonstrate intrinsic resistance [5-8]. In current clinical practice, treatment decisions

regarding anti-EGFR MABs are based on the analysis of classic biomarkers of resistance, such as mutations in *RAS* and *BRAF* genes [9, 10]. Various nonsystemic studies have previously reported on the influence of individual genomic alterations beyond *RAS/RAF* mutations on the benefit of anti-EGFR MAB therapy. However, the results of PRESSING and PARADIGM trials have truly reopened the question of the optimal selection of CRC patients for the anti-EGFR MABs. Unlike previous studies, these studies suggest that the simultaneous screening of various genes frequently upregulated in CRC might be the most effective approach [11, 12]. However, current data suggests that not all of the alterations might be the same in terms of influencing the resistance to therapy. Therefore, it is important to address the impact of individual alterations in various genes, as the genes included in diagnostic panels used in real-world clinical practice might vary. In addition, several clinical trials are still ongoing (Table 1). In this review, we discuss current understanding of the mechanisms of resistance to anti-EGFR MABs in CRC beyond *RAS/BRAF* V600 mutations. Here, we review mechanisms of both primary and acquired resistance with a focus on altered signaling pathways, and not on differentiation between the two.

Table 1

**Active clinical trials associated with studying the mechanism of tumor resistance to the EGFR inhibitors cetuximab and panitumumab**

NCT	Name	Study Design	Phase	Status	Patient population	Mutations	Treatment arms	Primary end point	Secondary/Exploratory end point
NCT03263663	Optimization of Individualized Therapy for CRCs With Secondary RESISTance Towards Anti-EGFR Targeted Therapy Using an Avatar Model (2016-003295-46)	Observational Case-Control Prospective	II	Recruiting	Locally advanced CRC (n=1000)	RAS wild-type	Chemotherapy + targeted treatment according to the resistance mechanism to cetuximab pretreatment Chemotherapy according to physician's choice after cetuximab pretreatment	PFS at 5-7 months	N/A
NCT03908788	EmutRAS: Detection of the Emergence of RAS (Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) Mutations in Circulating DNA (Deoxyribonucleic Acid) in Patients With mCRC (Metastatic Colorectal Cancer) During Treatment with Anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) Therapy	Interventional Non-randomized Single Group Assignment	N/A	Active, not recruiting	mCRC (n=130)	RAS/BRAF wild-type	ctDNA test after 1st line with cetuximab/panitumumab	Proportion of patients with mCRC who develop a RAS mutation under anti-EGFR therapy	PFS, OS at 36 months, proportion of RAS/BRAF mutation
NCT06226857	Other Oncogene Mutations for Anti-EGFR Efficacy in Patients with Left-sided RAS-wild Type Metastatic Colorectal Cancer (CRC01)	Interventional Randomized Parallel Assignment	III	Recruiting	mCRC (n=355)	KRAS/NRAS/BRAF wild-type or KRAS/NRAS wild-type with unknown BRAF status	Cohort A FOLFOX plus anti-EGFR therapy (panitumumab or cetuximab) Cohort B FOLFOX plus anti-EGFR therapy Cohort C FOLFOX ± bevacizumab	PFS an average of 3 years	PFS, OS an average of 3 years, AEs
NCT04034173	Optimal Anti-EGFR Treatment of mCRC Patients with Low-Frequency RAS Mutation	Interventional Randomized Parallel Assignment	II	Not yet recruiting	mCRC (n=120)	RAS mutations	Panitumumab, Irinotecan, Folinic acid, 5-FU	OS up to 60 months	PFS, OS up to 60 months ETS up to 48 months DpR up to 48 months

Note: abbreviations: (m)CRC – (metastatic) colorectal cancer, ctDNA – circulating tumor DNA, PFS – progression-free survival, OS – overall survival, ORR – overall response rate, AEs – adverse events, ETS – early tumor shrinkage, DpR – depth of response, N/A – not applicable.

**1. Unconventional mechanisms of RAS/RAF-mediated resistance.** The mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway, often known as the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway, is a highly conserved signal transduction pathway in all cells. The MAPK pathway is one of the best-characterized signaling cascades that

regulates cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis, by transmitting signals from upstream extracellular growth factors to various downstream effectors [13] (Fig.1). However, although widely investigated, there are still some unanswered questions regarding RAS/RAF-mediated resistance.

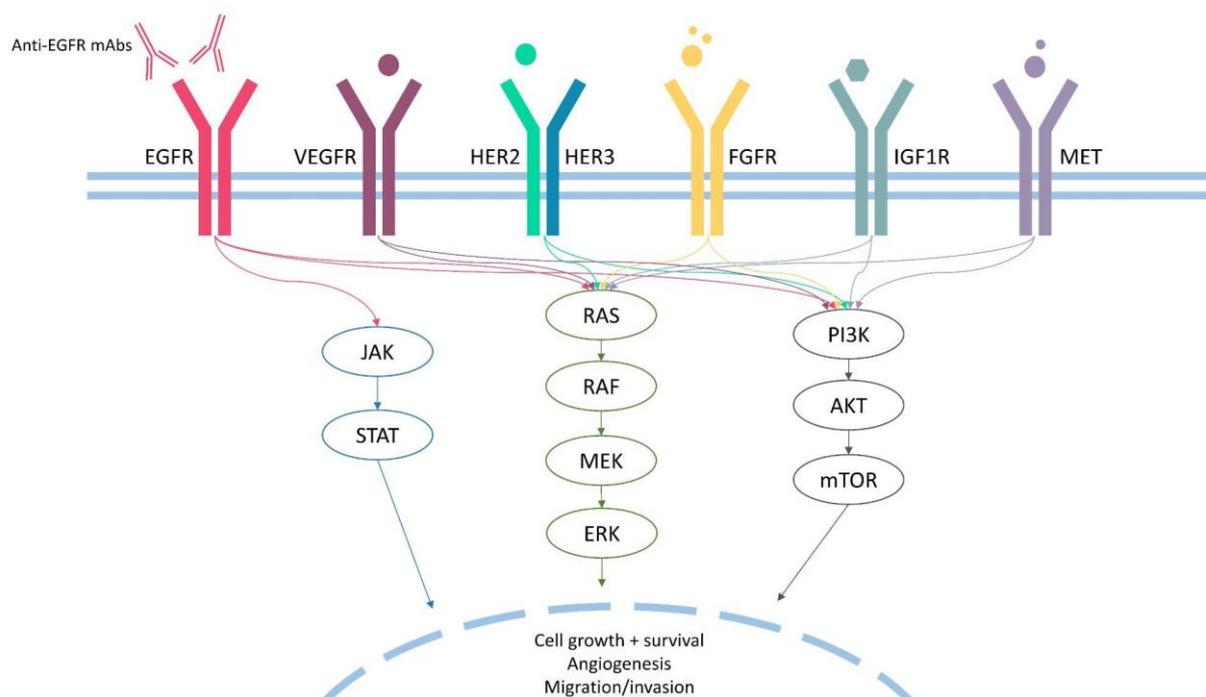


Fig. 1. Schematic representation of commonly altered pathways driving therapy resistance and their key components in CRC resistant to treatment with anti-EGFR Mab

**1.1 Unanswered questions regarding RAS.** Oncogenic mutations in *RAS* are the most common molecular event in CRC (Fig.2). *RAS* mutations are detected in up to 60% of CRC patients; *KRAS* mutations are found in around 30% of cases, while *NRAS* mutations are found in about 5% of cases [14, 15]. Activating mutations are predominantly located in 2, 3 and 4 exons, affecting the catalytic G domain. The majority of observed mutations are substitutions that occur in hotspots affecting codons 12 (70-80% of all

cases), 13 and 61 [16]. Rare activating missense variants affect codons 59, 117 and 146 [17]. Oncogenic activation of *RAS* genes is a known mechanism of resistance to anti-EGFR MABs in CRC patients [18], as shown in numerous clinical studies [19-24]. *RAS* mutations are routinely analyzed by PCR, and the implementation of NGS analysis may increase the detection rate by 9% with tissue and X ctDNA analysis, respectively [25].

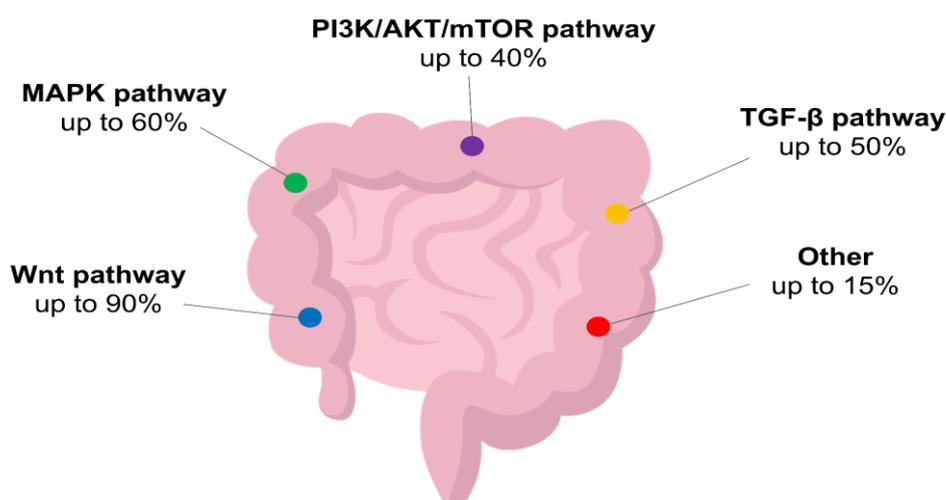


Fig. 2. Frequencies of commonly upregulated signaling pathways in CRC resistant to treatment with anti-EGFR MAb

Although *KRAS* mutations are validated predictive biomarkers of resistance to cetuximab and panitumumab, patients harboring the *KRAS* G13D mutation might still derive benefit from cetuximab, as shown in several retrospective studies [26, 27]. This effect may be attributed to the atypical activating effect of the variant, as shown in functional studies [28]. A possible mechanism that distinguishes *KRAS* G13D from other activating variants was shown using a mathematical model and biochemical studies [29, 30]. According to the model, *KRAS* G13D is most likely sensitive to cetuximab due to a difference in the mechanism of interaction with NF1 and wt RAS. While other *KRAS* variants bind to wt RAS negative regulator NF1, effectively inhibiting the wt RAS inhibitor and leading to wt HRAS and NRAS activation, G13D does not interact with NF1, thus promoting NF1-mediated inhibition of wt RAS and the effective functioning of cetuximab. Thus, cetuximab treatment can block wt HRAS and NRAS activation. Although this hypothetical mechanism explains the atypical effect of the *KRAS* G13D variant, its clinical relevance remains unknown. Despite this evidence, a more recent retrospective analysis indicates that patients with *KRAS* G13D mutations are unlikely to respond to cetuximab [31]. However, both large retrospective and prospective trials failed to confirm this effect. Teipar et al. [27]

reported a significant improvement of PFS (median, 7.4 vs 6.0 months; hazard ratio [HR], 0.47;  $P = 0.039$ ) and tumor response (40.5% vs 22.0%; odds ratio, 3.38;  $P = 0.042$ ), but not survival (median, 15.4 vs 14.7 months; HR, 0.89;  $P = 0.68$ ) in those receiving cetuximab harboring *KRAS* codon 13 mutations. Similarly, in a retrospective analysis by Peeters et al. [32] the presence of *KRAS* G13D was significantly associated with a negative impact on OS ( $P = 0.0018$ ). In a phase II Fleming single-stage design study by Schirripa et al. [33] evaluating the activity of single-agent cetuximab in *KRAS* G13D-mutated CRC, the primary objective of the trial was not met, DCR at 6 months was 0%.

Studies show that patients with low variant allele frequencies (VAF) of *RAS/RAF* might still be candidates for anti-EGFR therapy. In a post hoc analysis of the CRYSTAL study, it was shown that patients with *RAS*-mutated CRC whose mutations had low VAF in the tumor (0.1%-5%) benefited from the addition of cetuximab to FOLFIRI [34]. Similar results were obtained in a phase II ULTRA trial. Based on the results of this study, the optimal threshold for VAF of *RAS/RAF* mutations was established to be 5%. Across patients with *RAS/BRAF* mutation whose mutations had VAF of 5% and less, the response rate as well as median overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were similar to the *RAS/BRAF* wt

patient cohort [35]. Noteworthy, this threshold is only used when tissue is analyzed and is not applicable for ctDNA analysis. When ctDNA is used, the tumor is considered *RAS*-mutant if the mutation is identified with any VAF.

Another member of the *RAS* oncogene family is *HRAS*. However, alterations in *HRAS* are rare in CRC [15], hence only anecdotal evidence points toward the association between *HRAS* mutations and resistance to anti-EGFR MABs [36].

In the case of *KRAS* G12C-mutated CRC, another treatment strategy is the combination of specific *KRAS* G12C inhibitors (i.e. sotorasib, adagrasib) to anti-EGFR MABs [37]. The combination treatment is preferable to *KRAS* G12C inhibitor monotherapy, as frequently observed mechanisms of acquired resistance to these drugs include new RTK pathway alterations, which can be targeted by EGFR inhibitors [38].

Finally, *KRAS* amplification is another alteration that can be found in CRC. *KRAS* amplifications are extremely rare among patients with CRC (<1%) and are usually mutually exclusive with other *KRAS* alterations [39]. *KRAS* amplification has been suggested to drive resistance to anti-EGFR treatment in a small patient cohort [18, 39, 40]. In vitro cetuximab could partially abrogate phosphorylation of MEK and ERK but, like in *KRAS* mutant cells, was unable to induce growth arrest in *KRAS* amplification-positive cells [18].

**1.2 De novo *RAS* mutations and neo*RAS*.** Another known mechanism of acquired resistance to anti-EGFR MABs is the emergence of de novo *RAS* mutations in the course of treatment [18, 41, 42, 43]. The emergence of *RAS* mutant subclones can be detected months prior to the radiographic documentation of disease progression via liquid biopsy [18, 43]. At the same time, the discontinuation of anti-EGFR MAB might be associated with a decrease of the level of acquired *RAS* mutations [44]. Thus, assessment of acquired *RAS* mutations in liquid biopsies is necessary not only for the timely detection of acquired resistance to

EGFR inhibitors, but also for when considering therapy re-challenge [45, 46, 47].

An opposite phenomenon known as ‘neo*RAS* wild-type’ is characterized by the conversion of *RAS*-mutant tumors to *RAS* wt, as detected in ctDNA in the course of treatment with standard therapies. However, this phenomenon is thought to be uncommon, occurring in only 1-8% of patients [48]. One patient in the case series by Osumi et al. [49] with neo*RAS* has been reported to exhibit a long-term partial response (PR) to panitumumab in combination with irinotecan. Results of the SCRUM-Japan GOZILA study reported an incidence of neo*RAS* of 9%. In this study, out of 6 patients with neo*RAS*, 1 patient had PR and another had SD for at least 6 months [50].

### 1.3 Non-V600 *BRAF* mutations.

Activating mutations in *BRAF* occur in 8-12% of patients with CRC, with the most common missense mutation *BRAF* V600E accounting for up to 95% of all *BRAF* mutations [51-54]. *BRAF* V600E is widely known to be one of the most common causes of primary resistance to EGFR therapy in CRC [55, 56]. *BRAF* V600E leads to constitutive activation of the MAPK pathway, and therefore inhibition of the MAPK pathway by EGFR inhibitors alone is not effective [57]. However, it has also been shown that monotherapy with *BRAF* inhibitors is also not effective in *BRAF* V600E CRC, which may be explained by EGFR-mediated feedback reactivation of MAPK signaling [58]. The addition of *BRAF* inhibitors in combination with EGFR inhibitors has been shown to restore the sensitivity of *BRAF*-mutant tumors [59-65]. A combination of encorafenib and cetuximab was approved by the FDA for the treatment of patients with *BRAF* V600E CRC based on the results of the BEACON trial [62].

Class II and III *BRAF* variants can be seen in about 2.2% of CRC patients. *BRAF* non-V600 mutations mostly affect codons 594 and 596 [66, 67, 68]. Class II mutations are activating and signal in dimers in a *RAS*-independent manner. Class III *BRAF* mutations typically exhibit reduced kinase activity or absence thereof, however can still

activate MAPK through signaling through increased RAS binding or CRAF activation, which is RAS-dependent [69].

The data on the effect of non-V600 *BRAF* mutations in terms of their influence on the efficacy of anti-EGFR therapy is conflicting [70]. Preclinical data as well as several case reports suggest that *BRAF* non-V600 mutations (specifically, class IIB and III mutations) may be sensitive to EGFR inhibition due to the dependency on upstream receptor tyrosine kinase signaling [51, 71].

However, clinical studies have suggested that *BRAF* non-V600 mutations might be implicated in the resistance to anti-EGFR MAb. In a retrospective study among 36 patients with *BRAF* class II and III mutations, the median survival of patients was significantly higher than for patients with *BRAF* V600E (36.1 months vs 21 months), however, among 11 patients receiving anti-EGFR therapy, no responses were observed, while 6 patients achieved stable disease as best response [72]. Similar results were obtained in another study, where among 4 CRC patients with non-V600 *BRAF* variants no one responded to cetuximab therapy [73]. Studies suggest that different non-V600 *BRAF* mutations might have a different effect on the efficacy of anti-EGFR MAb. In a study by Yaeger et al. [74] it has been suggested that response in CRCs with class II *BRAF* mutants is rare, while a large portion of CRCs with class III *BRAF* mutants might respond to therapy, based on the difference in objective response rate (ORR) in the two groups (8% vs 50%).

Differences in the effect of anti-EGFR MAbs on CRC with *BRAF* mutations of different classes may be attributed to differences in their biological properties. For instance, class III *BRAF* mutations are largely dependent on upstream EGFR signaling, and thus might be more sensitive to EGFR inhibition [71]. Additionally, non-V600 *BRAF* mutations in CRC are rare, and thus may be largely understudied.

**1.4 Other mutations in MAPK pathway genes.** Mutations in genes other than *RAS/BRAF* in the MAPK pathway may also be

associated with resistance to anti-EGFR MAbs in CRC.

For example, gain of function mutations of *MAP2K1* (encoding for *MEK1*) have been suggested as one of potential drivers of primary resistance but are not recommended for routine assessment due to insufficient validation in clinical trials [75]. *MAP2K1* mutations, especially p.Lys57, were found in CRC patients with shorter PFS [76, 77] and were also recently found to be implicated in acquired resistance to anti-EGFR agents [39, 75, 78].

*NFI*, another gene involved in the MAPK pathway, encodes for a negative regulator of *KRAS* and plays a negative regulatory role in signaling downstream of EGFR due to its function as a RAS GTPase activating protein [79, 80]. It was demonstrated that *NFI* loss might be one of the potential mechanisms of acquired resistance to EGFR inhibitors in CRC [76, 81, 82]. *NFI* inactivation has also been associated with decreased sensitivity of human lung cancer cells to EGFR inhibitors, which can be attributed to enhanced RAS signaling [83].

GTPase *RAC1* and its alternatively spliced isoform *RAC1B*, important components of the pathobiology of various tumor progression processes, were shown to be involved in anti-EGFR MAb resistance using CRC cell lines [84], as well as surgical specimen from head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients [85].

Mutations in *ARID1A*, the most frequently mutated subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in cancer, have been reported to be associated with a transcriptional signature predicting reduced efficacy of anti-EGFR MAbs. This effect can be partially attributed to the activation of PI3K/MAPK signaling and loss of SWI/SNF activity [86]. However, further studies are warranted to confirm these findings.

**2. PI3K pathway-mediated resistance.** The PI3K/AKT/mTOR (PI3K) pathway is the second most commonly upregulated intracellular signaling pathway in CRC. In CRC, the oncogenic activation of the PI3K pathway frequently occurs through gain of

function mutations of *PIK3CA*, as well as loss of function mutations, deletions or loss of expression of *PTEN* – all common events in CRC [87]. For instance, *PIK3CA* exon 20/*PTEN/AKT1* alterations were found in 10.9% of older patients receiving panitumumab plus FOLFOX or 5-FU/LV [88]. The PI3K pathway is an important signaling pathway downstream of EGFR, exhibiting crosstalk with other signaling pathways, including MAPK [89, 90]. It has been proposed that the oncogenic activation of the PI3K pathway might play a role in generating resistance to EGFR-targeting therapies in CRC due to the activation of signaling downstream of EGFR [89, 91]. However, since dysregulation of the PI3K pathway often coexists with *RAS/BRAF* mutations, the individual roles of PI3K alterations in terms of anti-EGFR resistance warrants further investigation [87].

**2.1 *PIK3CA*.** Oncogenic mutations in *PIK3CA* occur in *RAS*-mutant and in *RAS*-wt CRC, suggesting that they might possess both driver and passenger roles depending on the molecular context [92, 93]. *PIK3CA* is altered in up to 20% of CRCs [87, 92] (Fig.2). In over 1.5% of tumors, double-hit mutations are observed, which are associated with increased PI3K $\alpha$  signaling [94]. Activating mutations are predominantly located in exons 9 and 20 of the gene, affecting kinase and helical domains. However, recent studies suggest that less common activating mutations can occur in other exons of the gene [95, 96, 97].

Although molecular testing is routinely performed for patients with CRC, the data on the activity of anti-EGFR MAbs against *PIK3CA*-mutated tumors is limited. Although responses can be observed occasionally, *PIK3CA* mutations are generally associated with resistance to anti-EGFR MAbs, as shown by lower PFS and OS rates across patients with *PIK3CA* mutations [25, 91, 98, 99]. This effect appears to be especially pronounced in patients with exon 20 *PIK3CA* mutations, whereas exon 9 mutations do not seem to be predictive of response to anti-EGFR therapy [91, 99, 100]. This difference can be attributed to the domain-specific nature of activating

properties of various *PIK3CA* mutations [101]. However, some studies report no effect of *PIK3CA* mutations on OS in *RAS* wt tumors [98, 102]. Although potentially significant, these findings should be interpreted with caution, since no randomized controlled trials have been carried out.

**2.2 *PTEN*.** When compared to *PIK3CA*, *PTEN* is less frequently altered in CRC (~5-7%) [87]. *PTEN* is a negative regulator of the PI3K pathway, and its loss or loss of function leads to aberrant PI3K signaling [103]. *PTEN* loss of function (LoF) mutations, as well as loss of protein expression due to promoter hypermethylation are associated with features of the sessile-serrated pathway [104, 105]. *PTEN* mutations/loss of expression have been associated with reduced response rates to cetuximab [106, 107]. Lack of response to panitumumab has also been reported across patients with *PTEN* loss or LoF mutations [107]. Additionally, reduced *PTEN* copy number has also been implicated in resistance [106, 107]. However, the number of studies that investigated the individual effect of *PTEN* alterations is small, warranting further validation.

**2.3 Other components of the PI3K pathway.** Although mutations affecting *PIK3CA* or *PTEN* are the most common in CRC, impact of alterations in other genes encoding for the components of the PI3K/Akt/mTOR pathway has been reported. *PIK3R1* encodes the p85 $\alpha$  subunit of PI3K and acts as a regulator of the p110 $\alpha$  catalytic product of the *PIK3CA* locus. Additionally, it has been proposed that PIK3R1, together with PIK3R2, is involved in the regulation of PTEN protein stability [108, 109]. Interestingly, *PIK3R1* tends to be altered in *RAS/BRAF* wt tumors, albeit at low frequency [76]. In vitro studies have identified decrease of PIK3R1 expression as a potential mechanism of anti-EGFR resistance [110].

Point mutations in AKT1 occur at lower rates as compared to PIK3CA/PTEN alterations in CRC [86]. AKT1 oncogenic mutations, primarily E17K, had been identified in CRC patients initially resistant to anti-EGFR treatment [111, 112]. Additionally,

AKT1 mutations are associated with concurrent RAS/BRAF mutations [111].

The impact of *FBXW7* alterations on the resistance to anti-EGFR MAbs remains controversial. The F-box protein *FBXW7* is also implicated in the PI3K signaling [113]. Alterations of *FBXW7* have been identified in CRC patients displaying short PFS and lack of response to anti-EGFR treatment, however the small sample size and the retrospective nature of data do not allow to draw univocal conclusions [76, 114, 115].

Combinations of anti-EGFR MAbs with various targeted agents, such as mTOR inhibitors, have also resulted in high efficacy, warranting further validation in larger patient cohorts [116, 117, 118]. However, clinical evaluation of an experimental PI3K inhibitor combined with cetuximab for *KRAS* wt CRC patients unselected for the alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway, had limited activity [119].

**3. RTK.** Mutations in receptor tyrosine kinases (RTK) lead to the autophosphorylation of the tyrosine kinase domain resulting in conformation changes and activation of downstream signaling pathways. Alterations of different RTKs can be found in CRC, the majority of which have the potential to activate PI3K and MAPK signaling [120], highlighting that the oncogene addiction can be a driver of anti-EGFR therapy resistance.

**3.1 HER/ERBB family.** Amplifications of *ERBB2* occur in up to 3% of tumors, and outline a distinct patient population [87]. *RAS/BRAF/PIK3CA* quadruple wild-type tumors are especially enriched for *ERBB2* amplifications, which are observed in up to 20-30% of cases [121]. *ERBB2* amplifications have long been recognized as a mechanism of primary resistance to anti-EGFR mAbs, as they have been shown to be associated with worse PFS and ORR in various studies [122, 123]. However, the question of what threshold of *ERBB2* amplification should be taken into account when considering EGFR MAb requires further studies [124].

In a similar manner to *ERBB2* amplifications, *ERBB2* mutations result in downstream pathway activation, and thus

have the potential to mediate resistance to EGFR-targeting agents [125]. Consistently, various studies have validated the association between *ERBB2* mutations, particularly the ones occurring in the tyrosine kinase of the protein, and resistance to EGFR inhibitors. Interestingly, *ERBB2* mutations can be attributed to both primary and acquired resistance [126]. In the era of NGS, these findings have become more relevant than ever before due to the potential of NGS to identify not only *ERBB2* amplifications, but also mutations.

Preclinical studies suggest that *ERBB3* mutations may also influence the effectiveness of EGFR MAb in CRC, as well as in HNSCC. This effect can be explained by the activation of the PI3K pathway caused by *ERBB3* oncogenic mutations [127]. However, in a retrospective study by Loree et al. *ERBB3* mutations exhibited a less pronounced effect on the effects of EGFR MAb treatment when compared to *ERBB2* mutations [128].

For cancers with sustained ERBB signaling, the addition of ERBB TKIs has been investigated, resulting in promising antitumor activity [129, 130, 131]. Despite the promising activity of other agents, when combined with cetuximab or panitumumab, pan-ERBB TKI neratinib failed to produce any objective responses among patients with *RAS/BRAF/PIK3CA* wt CRC [132].

**3.2 EGFR ECD mutations.** In some cases, acquired resistance to anti-EGFR MAbs can be mediated by the emergence of *EGFR* ectodomain (ECD) point mutations [133]. *EGFR* ECD mutations may arise in up to 16% of patients treated with EGFR MAbs [133]. Several *EGFR* ECD mutations have been reported, including, among others, R451C, S492R, G465R, K467T [134-138]. Contrary to activating mutations of the *EGFR*, most of the *EGFR* ECD mutations lie in the surface recognized by EGFR MAbs and have the potential to affect complex formation. Some mutations (i.e. R451C) that are not specifically located in EGFR MAb binding sites introduce other critical structural changes [134]. Importantly, a subset of these mutations (such as S492R) may only affect the interaction with

cetuximab and not panitumumab [133, 134], which may be attributed to the presence of a large central cavity in panitumumab but not cetuximab [139].

Switching from cetuximab to panitumumab has been reported to be an effective strategy for treating cetuximab-resistant CRC patients with acquired *EGFR* ECD mutations, as a significant subset of these mutations does not prevent panitumumab binding [134]. Moreover, Sym004, a 1:1 mixture of cetuximab and panitumumab has been shown to be an effective treatment strategy for *EGFR* ECD-mutated CRC in vitro [140]. Therefore, for CRC patients with *EGFR* ECD mutations no additional agents might be needed apart from standard EGFR MAb.

**3.3 *MET* amplification.** Alterations of the *MET* are a well-established mechanism of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [141, 142]. Similarly to NSCLC, *MET* amplifications, albeit occurring at lower frequencies (around 1%), have been found to drive resistance to anti-EGFR mAb in CRC. Using patient-derived tumor xenografts, Badrelli et al. showed that *MET* amplification might be associated both with primary and acquired resistance in *KRAS* wt CRC, which was then supported by patient cases [143]. This effect can be attributed by the activation of the downstream PI3K and MAPK induced by *MET* [144].

In *MET*-amplified CRC, a combination of *MET* and EGFR targeting agents have resulted in the improvement of patients' outcomes, although the data on the combination of these drugs are limited [145].

**3.4 Kinase fusions.** Kinase fusions are rare in CRC, occurring in less than 1% of the patients [87, 146]. However, kinase gene fusions are estimated to be enriched in *RAS/BRAF* wt tumors in patients that will be potentially treated with EGFR MAbs [147], or mismatch repair deficient/microsatellite unstable (dMMR/MSI) tumors [148, 149]. Specifically, *ALK*, *BRAF*, *NTRK*, *RET* gene fusions have been reported in patients with CRC [88, 112, 147, 150]. Kinase gene fusions have been identified in EGFR MAb treatment

resistant CRC patients [112], however, their effect has been underexplored in large randomized studies due to low prevalence. Additionally, kinase fusions have been found to be enriched in dMMR/MSI colorectal cancer, which can further explain resistance [151].

**3.6 Other.** Other uncommon RTK-mediated mechanisms of resistance have been suggested. For instance, although rare in CRC, in vitro studies have identified *FGFR1* amplifications as mediating resistance to anti-EGFR mAbs, possibly due to the activation of compensatory pathways, however, these findings have not been further investigated to date [143].

Upon binding with growth factors and insulin, the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) activates the two most commonly upregulated signaling pathways in CRC, the PI3K and MAPK [152]. Elevated expression of IGF1R has been found to be a poor prognostic factor in CRC [153]. Low IGF1R expression has been found to correlate with better outcomes with cetuximab treatment [154]. However, the data regarding the effect of IGF1R expression on the efficacy of EGFR-targeting therapy is inconsistent [154, 155].

Persistent activation of the JAK/STAT pathway has also been linked to anti-EGFR therapy. Specifically, activation of STAT3 through phosphorylation correlated with the resistance to EGFR TKI gefitinib in CRC cell lines, suggesting that STAT3 phosphorylation may play a role in mediating resistance to EGFR inhibitors in CRC [156].

VEGF and EGFR signaling pathways are closely related, sharing multiple downstream effectors. VEGF signaling plays a crucial role in angiogenesis, and inhibition of angiogenesis is one of the mechanisms of action of anti-EGFR MAb. Increased expression of VEGF has been reported to be associated with decreased response to cetuximab [157]. Dual targeting of VEGF and EGFR represents a promising strategy for overcoming resistance mediated by either VEGF, or VEGF/EGFR crosstalk [158, 159].

**5. Wnt signaling and epithelial-to-mesenchymal transition.** The Wnt pathway is commonly divided into  $\beta$ -catenin dependent, or canonical, and independent, or non-canonical, signaling pathways [160]. The canonical Wnt signaling pathway plays one of the most important roles in CRC carcinogenesis [161]. Wnt activation in CRC occurs through inactivation of *APC* approximately in 50% of cases, or through mutation of  $\beta$ -catenin [160]. Wnt signaling pathway promotes the nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin, which contributes to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and increased tumor aggressiveness [162]. In CRC cell cultures, it was shown that the expression of E-cadherin, a marker of epithelial cells, may be associated with the effectiveness of EGFR inhibition. At the same time, mesenchymal cells were 7 times less sensitive to anti-EGFR MAb when compared to epithelial cells [163]. These findings were also validated in other tumor types. For instance, in treatment-naive patients with HNSCC who received cetuximab before surgery, upregulation of expression of genes implicated in CAF and EMT including markers of embryologic pathways like NOTCH and Wnt was demonstrated [164]. There is also supporting preclinical data for other cancer types besides CRC [165-168].

While some studies suggest that *APC* mutations might contribute to anti-EGFR MAb resistance, the data is inconsistent. For instance, Thota et al. reported that *APC* mutations in the context of *TP53* mutations may, in fact, predict cetuximab sensitivity [169].

**6. TP53.** Alterations in *TP53*, commonly referred to as ‘guardian of the genome’ can be found in the vast majority of CRC cases (>70%) [87]. Several studies have reported that *TP53* wild-type or *TP53*-expressing CRC tumors exhibit worse outcomes when treated with anti-EGFR MAb when compared to *TP53*-mutant tumors, however other factors, such as tumor sidedness, might contribute to this effect [170-173]. In vitro studies suggest that EGFR expression can be differently modulated

depending on the *TP53* mutational status, and *TP53*-mutant status is generally associated with increased EGFR expression, which can explain the differences in anti-EGFR MAb sensitivity [174, 175].

**7. TGF- $\beta$  pathway.** The transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling pathway is involved in many biologic cellular processes such as cell proliferation, differentiation, apoptosis, and extracellular matrix production [176]. In the early CRC carcinogenesis, activation of TGF- $\beta$  leads to tumor suppression [177]. However, in advanced stages, TGF- $\beta$  is believed to promote metastasis, angiogenesis, and EMT [178, 179].

SMAD4 is a common mediator in the transcriptional regulator complex in the TGF- $\beta$  pathway [180]. It has been demonstrated that *SMAD4* mutations can lead to cetuximab resistance in CRC patients. The modified PFS (mPFS) and ORR to cetuximab has been reported to be decreased for *SMAD4*-mutated patients when compared to *SMAD4* wt patients [81, 115]. Similar results have also been shown in other studies [181] and for other tumor types, specifically for HNSCC [182, 183].

**8. Non-genomic mechanisms of resistance.** Various other non-genomic mechanisms driving EGFR MAb resistance have been proposed. For instance, dMMR, caused by a dysfunction of mismatch repair and occurring in up to 15% of CRC patients, has been reported to play an important role in mediating resistance [184]. Although the mechanism underlying resistance in dMMR/MSI CRC cases remains largely unknown, it has been shown that in cases where dMMR/MSI is caused by the hypermethylation of *MLH1* promoter (commonly referred to as sporadic dMMR/MSI) increase in the expression of ERBB2, as well as PI3K signaling can be observed [185]. However, in this case, the increase in the ERBB2 expression might not be clinically significant, as *ERBB2* amplification-positivity and MSI are mutually exclusive in CRC [186]. Additionally,

sporadic dMMR/MSI is commonly associated with *BRAF* V600E mutations, whereas mutations in other oncogenes known to drive resistance to anti-EGFR MAb are frequently found in Lynch syndrome-associated CRC [187].

Apart from dMMR/MSI, the immune microenvironment by itself can be considered as an important modulator of anti-EGFR MAb efficacy. Specifically, increase in cancer-associated fibroblasts (CAFs), which produce mitogenic growth factors such as FGF1, FGF2, HGF, TGF- $\beta$  and others, as well as angiogenesis and abnormal functioning of various immune cells have been demonstrated to modulate resistance [82].

Additionally, metabolic reprogramming, which can occur following treatment with EGFR-targeting agents, can influence therapy efficacy [188]. Autophagy, a self-cannibalization biological process, is another factor that should be considered when discussing mechanisms of resistance to EGFR-targeting agents. It has also been proposed that autophagy acts as a protective response in cancer cells [189]. Finally, cancer stem cells, also known as tumor-initiating cells, have also been suggested to play a part in drug resistance, due to their ability to self-renew and differentiate into various cell lineages [190].

Furthermore, gut microbiota composition has been found to modulate therapy efficacy in various tumors, including CRC. However, data regarding the effect of gut microbiota on the efficacy of anti-EGFR MAbs is currently limited. A small study by Lewandowski et al. [191] found that patients with high diversity of gut microbiome may be better candidates for anti-EGFR MAb therapy, as compared to patients with non-diverse microbiome. However, these findings should be further validated, as diverse gut microbiomes have been linked to a good prognosis of CRC patients regardless of therapy [192].

Finally, non-coding RNAs (ncRNAs), including microRNAs, long non-coding RNAs, and circular RNAs have been reported to regulate resistance to anti-EGFR MAb in CRC. One of the suggested mechanisms explaining this phenomenon is that different ncRNAs can upregulate oncogenic signaling pathways promoting resistance to anti-EGFR therapy [193].

#### **Discussion and conclusions.**

Monoclonal antibodies that target EGFR blocking downstream signaling have emerged as important therapeutic agents in the treatment of CRC. The indication of drugs from this class, cetuximab and panitumumab, is currently based on the mutational statuses of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes [9, 10]. Until recently, the question of whether additional factors play a role in resistance to anti-EGFR MAb has not been widely investigated. However, the encouraging results of trials evaluating the role of the hyperselection have reopened the question of the optimal selection of CRC patients for the anti-EGFR MAbs once again [11, 12].

Here, we outline current knowledge on the mechanisms of resistance to anti-EGFR MAbs beyond traditional alterations in CRC. Specifically, we focus on the alterations of various genes involved in relevant signaling pathways downstream of EGFR that can be detected by genomic assays currently used in the real-world clinical practice. Despite the fact that some of the discussed biomarkers have been extensively studied, their individual use in the clinic is limited by the lack of randomized clinical studies. Therefore, it will be necessary to validate the clinical utility of these alterations in large cohort studies for optimal patient management. Future efforts should be directed at optimizing strategies to overcome resistance to anti-EGFR MAbs in patients with various genomic alterations. The most common mechanisms of intrinsic and acquired resistance are summarized in Figure 3.

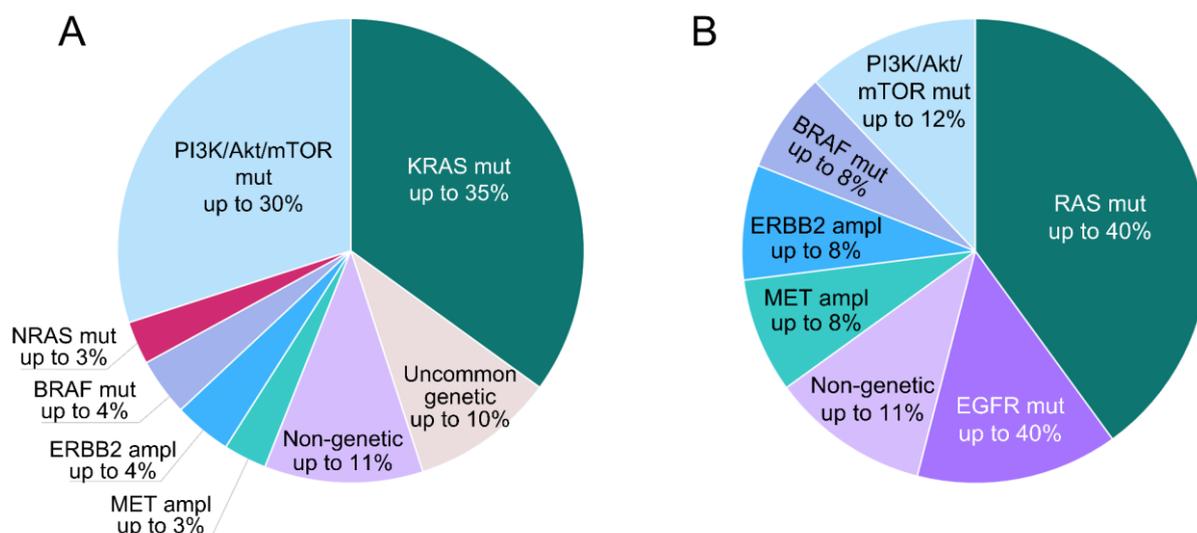


Fig. 3. The landscape of biomarkers validated in retrospective/prospective trials of primary (A) and acquired (B) resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies.

Abbreviations: ampl – amplification, mut – mutation

Many attempts have been made towards the development of strategies to overcome resistance to anti-EGFR MAb in CRC [194]. Combining anti-EGFR MAbs with targeted agents represents a promising strategy for overcoming treatment resistance arising from compensatory pathway activation, although further studies are warranted to improve patient outcomes. Additionally, novel agents may be used as standalone therapies for patients with various alterations, such as aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, for instance [195, 196].

Apart from genetically-driven resistance, growing evidence suggests that various non-genetic mechanisms might be implicated in the resistance to anti-EGFR MAbs in CRC. Although currently these findings are mostly of academic interest, with the advances of novel assays, it will be possible to incorporate their analysis into routine clinical practice.

In current clinical practice, tumor sidedness plays a crucial role in clinical decision making, which is largely driven by differences in their biology. For instance, right-sided tumors are more likely to have MSI, as well as display higher rates of oncogenic *EGFR* activation, *BRAF* and *PIK3CA* mutations, which factor into therapy resistance [197]. However, further efforts should be directed towards the

implementation of comprehensive genomic testing into routine clinical practice, which will allow to focus on genomic portraits of tumors, and not only their sidedness.

In conclusion, while many mechanisms affecting various signaling pathways beyond the traditional *RAS/BRAF* mutations are thought to be implicated in the resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, future efforts are needed to clarify their significance. Ongoing sequencing efforts will clarify the need for expanding the list of alterations routinely tested for the selection of candidates for anti-EGFR therapy.

### Financial support

This study was supported by a grant from the Moscow Center of Innovative Technologies in Healthcare (№2102-2/23).

### Conflict of interests

Alexandra Lebedeva, Alexandra Kavun, Ekaterina Belova, Olesya Kuznetsova, Tatiana Grigoreva, Egor Veselovsky, Anastasiia Taraskina, Maxim Ivanov, and Vladislav Mileyko are employees of OncoAtlas LLC. Other co-authors have no conflicts of interest to declare.

### References

1. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023. CA: A Cancer

- Journal for Clinicians. 2023;73(3):233-254. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21772>
2. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, et al. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;24:22(1):130. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010130>
  3. Zhou J, Ji Q, Li Q. Resistance to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer: underlying mechanisms and reversal strategies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2021;18;40(1):328. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02130-2>
  4. Sun H, Li Y, Su Y, et al. Efficacy and safety of anti-EGFR monoclonal antibodies combined with different chemotherapy regimens in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Journal of Evidence-Based Medicine*. 2019;12(4):300-312. DOI: <https://doi.org/10.1111/jebm.12360>
  5. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(10):1626-34. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.7116>. Corrected and republished in: *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(18):3278-3286
  6. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2009;360(14):1408-17. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805019>
  7. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4697-705. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4860>
  8. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4706-13. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.6055>
  9. Benson AB, Venook AP, Adam M, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Colon Cancer Version 2.2024 — April 30, 2024 [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/colon.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf)
  10. Cervantes A, Adam R, Roselló S, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2023;34(1):10-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>
  11. Morano F, Corallo S, Lonardi S, et al. Negative Hyperselection of Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Who Received Panitumumab-Based Maintenance Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(33):3099-3110. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01254>
  12. Watanabe J, Muro K, Shitara K, et al. Panitumumab vs Bevacizumab Added to Standard First-line Chemotherapy and Overall Survival Among Patients With RAS Wild-type, Left-Sided Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2023;329(15):1271-1282. Erratum in: *JAMA*. 2023;329(24):2196. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2023.4428>
  13. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-90. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
  14. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*. 1989;49(17):4682-9. Erratum in: *Cancer Research* 1990;50(4):1352
  15. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*. 2011 Mar;2(3):344-58. DOI: <https://doi.org/10.1177/1947601911411084>
  16. Patsar T. The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2019;18:189-198. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.004>
  17. Smith G, Bounds R, Wolf H, et al. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *British Journal of Cancer*. 2010;102(4):693-703. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605534>
  18. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486(7404):532-6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11156>
  19. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England*

- Journal of Medicine. 2013;369(11):1023-34. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305275>
20. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 2015;51(10):1243-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.04.007>
21. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(24):5469-79. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0526>
22. Kim TW, Elme A, Kusic Z, et al. A phase 3 trial evaluating panitumumab plus best supportive care vs best supportive care in chemorefractory wild-type KRAS or RAS metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2016;115(10):1206-1214. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.309>
23. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;317(23):2392-2401. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7105>
24. Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, et al. Activity and Safety of Cetuximab Plus Modified FOLFOXIRI Followed by Maintenance With Cetuximab or Bevacizumab for RAS and BRAF Wild-type Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncology*. 2018;4(4):529-536. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.5314>
25. Vidal J, Bellosillo B, Santos Vivas C, et al. Ultra-selection of metastatic colorectal cancer patients using next-generation sequencing to improve clinical efficacy of anti-EGFR therapy. *Annals of Oncology*. 2019;30(3):439-446. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz005>
26. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*. 2010;304(16):1812-20. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1535>
27. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, et al. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(29):3570-7. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.2592>
28. Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, et al. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Molecular Cancer Research*. 2015;13(9):1325-35. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>
29. McFall T, Diedrich JK, Mengistu M, et al. A systems mechanism for KRAS mutant allele-specific responses to targeted therapy. *Science Signaling*. 2019;12(600):eaaw8288. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw8288>
30. McFall T, Stites EC. A mechanism for the response of KRASG13D expressing colorectal cancers to EGFR inhibitors. *Molecular & Cellular Oncology*. 2020;7(2):1701914. DOI: <https://doi.org/10.1080/23723556.2019.1701914>
31. Gajate P, Sastre J, Bando I, et al. Influence of KRAS p.G13D mutation in patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Clinical Colorectal Cancer*. 2012;11(4):291-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2012.02.003>
32. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(6):759-65. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.1492>
33. Schirripa M, Loupakis F, Lonardi S, et al. Phase II study of single-agent cetuximab in KRAS G13D mutant metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2015;26(12):2503. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv385>
34. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(7):692-700. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>
35. Santos C, Azuara D, Viéitez JM, et al. Phase II study of high-sensitivity genotyping of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA to ultra-select metastatic colorectal cancer patients for panitumumab plus FOLFIRI: the ULTRA trial. *Annals of Oncology*. 2019;30(5):796-803. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz082>
36. Boidot R, Chevrier S, Julie V, et al. HRAS G13D, a new mutation implicated in the resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer, a case report. *Int J Colorectal Dis*.

- 2016;31(6):1245-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00384-015-2448-7>
37. Fakih MG, Salvatore L, Esaki T, et al. Sotorasib plus Panitumumab in Refractory Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *The New England Journal of Medicine*. 2023;389(23):2125-2139. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2308795>
38. Li BT, Velcheti V, Price TJ, et al. Largest evaluation of acquired resistance to sotorasib in KRAS p.G12C-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) and colorectal cancer (CRC): Plasma biomarker analysis of CodeBreaK100. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40:102-102 DOI: [https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16\\_suppl.102](https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.102)
39. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *International Journal of Cancer*. 2013;133(5):1259-65. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.28106>
40. Fang T, Liang T, Wang Y, et al. An Early-Onset Advanced Rectal Cancer Patient With Increased KRAS Gene Copy Number Showed A Primary Resistance to Cetuximab in Combination With Chemotherapy: A Case Report. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:755578. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.755578>
41. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature Medicine*. 2015;21(7):795-801. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.3870>. Epub 2015 Jun 1. Erratum in: *Nature Medicine*. 2015;21(7) DOI: <https://doi.org/10.1038/nm0715-827b>. Erratum in: *Nature Medicine*. 2015;21(7):827.
42. Parikh AR, Corcoran RB. Monitoring resistance through liquid biopsy. *Annals of Oncology*. 2018;29(1):8-11. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx650>
43. Siena S, Sartore-Bianchi A, Garcia-Carbonero R, et al. Dynamic molecular analysis and clinical correlates of tumor evolution within a phase II trial of panitumumab-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2018;29(1):119-126. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx504>
44. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, et al. Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Annals of Oncology*. 2019;30(2):243-249. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy509>
45. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, et al. Rechallenge for Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA Oncology*. 2019;5(3):343-350. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5080>
46. Ohhara Y, Shinozaki E, Osawa H, et al. Liquid biopsy for optimizing the rechallenge of cetuximab in metastatic colorectal cancer: Additional study of E-Rechallenge Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;37:585-585 DOI: [https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.4\\_suppl.585](https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.4_suppl.585)
47. Sunakawa Y, Nakamura M, Ishizaki M, et al. RAS Mutations in Circulating Tumor DNA and Clinical Outcomes of Rechallenge Treatment With Anti-EGFR Antibodies in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *JCO Precision Oncology*. 2020;4:898-911. DOI: <https://doi.org/10.1200/PO.20.00109>
48. Henry J, Willis J, Parseghian CM, et al. NeoRAS: Incidence of RAS reversion from RAS mutated to RAS wild type. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38:180-180 DOI: [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.4\\_suppl.180](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.180)
49. Osumi H, Vecchione L, Keilholz U, et al. NeoRAS wild-type in metastatic colorectal cancer: Myth or truth?-Case series and review of the literature. *European Journal of Cancer*. 2021;153:86-95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.05.010>
50. Osumi H, Shinozaki E, Nakamura Y, et al. NeoRAS wild-type metastatic colorectal cancer in the SCRUM-Japan GOZILA study. *Journal of Clinical Oncology*; 2023;Vol. 41, Issue 16\_suppl, pp. 3506-3506). *American Society of Clinical Oncology* (ASCO). [https://doi.org/10.1200/jco.2023.41.16\\_suppl.3506](https://doi.org/10.1200/jco.2023.41.16_suppl.3506)
51. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):753-62. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70130-3)
52. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature00766>

53. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011;10(3):385-94. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0799>
54. Barras D, Missiaglia E, Wirapati P, et al. BRAF V600E Mutant Colorectal Cancer Subtypes Based on Gene Expression. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(1):104-115. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0140>
55. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *European Journal of Cancer*. 2012;48(10):1466-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.057>
56. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *European Journal of Cancer*. 2015;51(5):587-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.01.054>
57. Xu T, Wang X, Wang Z, et al. Molecular mechanisms underlying the resistance of BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer to EGFR/BRAF inhibitors. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2022;14:17588359221105022. DOI: <https://doi.org/10.1177/17588359221105022>
58. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discovery*. 2012;2(3):227-35. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0341>
59. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(35):5705-12. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0786>
60. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM, et al. Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(6):1313-20. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2779>
61. van Geel RMJM, Tabernero J, Elez E, et al. A Phase Ib Dose-Escalation Study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in Metastatic BRAF-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discovery*. 2017;7(6):610-619. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0795>
62. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2019;381(17):1632-1643. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075>
63. Huijberts SC, van Geel RM, Bernards R, et al. Encorafenib, binimetinib and cetuximab combined therapy for patients with BRAFV600E mutant metastatic colorectal cancer. *Future Oncology*. 2020;16(6):161-173. DOI: <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0748>
64. Ros J, Baraibar I, Sardo E, et al. BRAF, MEK and EGFR inhibition as treatment strategies in BRAF V600E metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2021;13:1758835921992974. DOI: <https://doi.org/10.1177/1758835921992974>
65. Tabernero J, Grothey A, Van Cutsem E, et al. Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(4):273-284. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02088>
66. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Annals of Oncology*. 2015;26(10):2092-7. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv290>
67. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, et al. Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(23):2624-2630. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.4394>
68. Van Cutsem E, Dekervel J. Not All BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancers Are Identical: Distinct Clinical Consequences of non-V600 BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(23):2598-2599. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7057>
69. Owsley J, Stein MK, Porter J, et al. Prevalence of class I-III BRAF mutations among 114,662 cancer patients in a large genomic database. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.). 2021;246(1):31-39. DOI: <https://doi.org/10.1177/1535370220959657>

70. Caputo F, Santini C, Bardasi C, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(21):5369. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20215369>
71. Dankner M. Targeted Therapy for Colorectal Cancers With Non-V600 BRAF Mutations: Perspectives for Precision Oncology. *JCO Precision Oncology*. 2018;2:1-12. DOI: <https://doi.org/10.1200/PO.18.00195>
72. Johnson B, Loree JM, Jacome AA, et al. Atypical, Non-V600 BRAF Mutations as a Potential Mechanism of Resistance to EGFR Inhibition in Metastatic Colorectal Cancer. *JCO Precision Oncology*. 2019;3:PO.19.00102. DOI: <https://doi.org/10.1200/PO.19.00102>
73. Hsu HC, Thiam TK, Lu YJ, et al. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2016;7(16):22257-70. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8076>
74. Yaeger R, Kotani D, Mondaca S, et al. Response to Anti-EGFR Therapy in Patients with BRAF non-V600-Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(23):7089-7097. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2004>
75. Bertotti A, Papp E, Jones S, et al. The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature*. 2015;526(7572):263-7. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14969>
76. Rachiglio AM, Lambiase M, Fenizia F, et al. Genomic Profiling of KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Patients Reveals Novel Mutations in Genes Potentially Associated with Resistance to Anti-EGFR Agents. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):859. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11060859>
77. Chuang J, Wang C, Guo Y, et al. MAP2K1 Mutations in Advanced Colorectal Cancer Predict Poor Response to Anti-EGFR Therapy and to Vertical Targeting of MAPK Pathway. *Clinical Colorectal Cancer*. 2021;20(1):72-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.12.003>
78. Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, et al. Tumor Heterogeneity and Lesion-Specific Response to Targeted Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Discovery*. 2016;6(2):147-153. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1283>
79. Le LQ, Parada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene*. 2007;26(32):4609-16. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210261>
80. Yu HA, Arcila ME, Rekhman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(8):2240-7. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2246>
81. Mei Z, Shao YW, Lin P, et al. SMAD4 and NF1 mutations as potential biomarkers for poor prognosis to cetuximab-based therapy in Chinese metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2018;18(1):479. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4298-5>
82. Woolston A, Khan K, Spain G, et al. Genomic and Transcriptomic Determinants of Therapy Resistance and Immune Landscape Evolution during Anti-EGFR Treatment in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2019;36(1):35-50.e9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.05.013>
83. de Bruin EC, Cowell C, Warne PH, et al. Reduced NF1 expression confers resistance to EGFR inhibition in lung cancer. *Cancer Discovery*. 2014;4(5):606-19. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0741>
84. Gudiño V, Pohl SÖ, Billard CV, et al. RAC1B modulates intestinal tumorigenesis via modulation of WNT and EGFR signalling pathways. *Nature Communications*. 2021;12(1):2335. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22531-3>
85. Yao Y, Wang Y, Chen L, et al. Clinical utility of PDX cohorts to reveal biomarkers of intrinsic resistance and clonal architecture changes underlying acquired resistance to cetuximab in HNSCC. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):73. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00908-0>
86. Johnson RM, Qu X, Lin CF, et al. ARID1A mutations confer intrinsic and acquired resistance to cetuximab treatment in colorectal cancer. *Nature Communications*. 2022;13(1):5478. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33172-5>
87. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature Medicine*. 2017;23(6):703-713. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4333>
88. Pietrantonio F, Bergamo F, Rossini D, et al. Negative hyperselection of elderly patients with

RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer receiving initial panitumumab plus FOLFOX or 5-FU/LV. *European Journal of Cancer*. 2023;195:113396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.113396>

89. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011;36(6):320-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>

90. Vitiello PP, Cardone C, Martini G, et al. Receptor tyrosine kinase-dependent PI3K activation is an escape mechanism to vertical suppression of the EGFR/RAS/MAPK pathway in KRAS-mutated human colorectal cancer cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38(1):41. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1035-0>

91. Mao C, Yang ZY, Hu XF, et al. PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2012;23(6):1518-25. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr464>

92. Jin J, Shi Y, Zhang S, et al. PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-Analysis. *Acta Oncologica*. 2020;59(1):66-74. DOI: <https://doi.org/10.1080/0284186X.2019.1664764>

93. Voutsadakis IA. The Landscape of PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2021;20(3):201-215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2021.02.003>

94. Cecchini M, Sokol E, Vasan N, et al. Molecular characteristics of advanced colorectal cancer and multi-hit PIK3CA mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40:3535–3535. DOI: [https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16\\_suppl.3535](https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.3535)

95. Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2020;22(1):45. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01284-9>

96. Jia M, Liao N, Chen B, et al. PIK3CA somatic alterations in invasive breast cancers: different spectrum from Caucasians to Chinese detected by next generation sequencing. *Breast Cancer*. 2021;28(3):644-652. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01199-5>

97. Tharin Z, Richard C, Derangère V, et al. PIK3CA and PIK3R1 tumor mutational landscape

in a pan-cancer patient cohort and its association with pathway activation and treatment efficacy. *Scientific Reports*. 2023;13(1):4467. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31593-w>

98. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Research*. 2009;69(5):1851-7. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2466>

99. Huang L, Liu Z, Deng D, et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody-based therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of the effect of PIK3CA mutations in KRAS wild-type patients. *Archives of Medical Science*. 2014;10(1):1-9. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2014.40728>

100. Fu X, Lin H, Fan X, et al. The Spectrum, Tendency and Predictive Value of PIK3CA Mutation in Chinese Colorectal Cancer Patients. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:595675. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.595675>

101. Yau C, Benz S, Vaske C, et al. Abstract 4165: Differential pathway activation associated with domain-specific PIK3CA mutations. *Cancer Research*. 2014;74:4165–4165. DOI: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2014-4165>

102. Jonker DJ, Karapetis CS, O'Callaghan CJ, et al. BRAF, PIK3CA, and PTEN status and benefit from cetuximab (CET) in the treatment of advanced colorectal cancer (CRC): Results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30:3515–3515. DOI: [https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.15\\_suppl.3515](https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.3515)

103. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4:127-50. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311>

104. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Research*. 2004;64(9):3014-21. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-2401-2>

105. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(12):3285-96. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3614>

106. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Annals of Oncology*. 2009;20(1):84-90. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn541>
107. Mao C, Liao RY, Chen Q. Loss of PTEN expression predicts resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2010;102(5):940. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605575>
108. Cheung LW, Hennessy BT, Li J, et al. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discovery*. 2011;1(2):170-85. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0039>. Erratum in: *Cancer Discovery*. 2012;2(8):750-1. Erratum in: *Cancer Discovery*. 2021;11(10):2658.
109. Cheung LW, Mills GB. Targeting therapeutic liabilities engendered by PIK3R1 mutations for cancer treatment. *Pharmacogenomics*. 2016;17(3):297-307. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs.15.174>
110. Bray SM, Lee J, Kim ST, et al. Genomic characterization of intrinsic and acquired resistance to cetuximab in colorectal cancer patients. *Scientific Reports*. 2019;9(1):15365. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51981-5>
111. Hechtman JF, Sadowska J, Huse JT, et al. AKT1 E17K in Colorectal Carcinoma Is Associated with BRAF V600E but Not MSI-H Status: A Clinicopathologic Comparison to PIK3CA Helical and Kinase Domain Mutants. *Molecular Cancer Research*. 2015;13(6):1003-8. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0062-T>
112. Cremolini C, Morano F, Moretto R, et al. Negative hyper-selection of metastatic colorectal cancer patients for anti-EGFR monoclonal antibodies: the PRESSING case-control study. *Annals of Oncology*. 2017;28(12):3009-3014. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx546>
113. Shen W, Zhou Q, Peng C, et al. FBXW7 and the Hallmarks of Cancer: Underlying Mechanisms and Prospective Strategies. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:880077. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.880077>
114. Guinney J, Ferte C, Dry J, et al. Modeling RAS phenotype in colorectal cancer uncovers novel molecular traits of RAS dependency and improves prediction of response to targeted agents in patients. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(1):265-272. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1943>
115. Lupini L, Bassi C, Mlcochova J, et al. Prediction of response to anti-EGFR antibody-based therapies by multigene sequencing in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2015;15:808. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1752-5>
116. Vlahovic G, Meadows KL, Uronis HE, et al. A phase I study of bevacizumab, everolimus and panitumumab in advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2012;70(1):95-102. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00280-012-1889-8>
117. Townsend AR, Hardingham J, Tebbutt NC, et al. A phase Ib/II study of second-line therapy with panitumumab, irinotecan and everolimus (PIE) in metastatic colorectal cancer (mCRC) with KRAS wild type (WT): Biomarker substudy. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35:643-643. DOI: [https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.4\\_suppl.643](https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.4_suppl.643)
118. Townsend A, Tebbutt N, Karapetis C, et al. Phase IB/II Study of Second-Line Therapy with Panitumumab, Irinotecan, and Everolimus (PIE) in KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(16):3838-3844. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3590>
119. Bowles DW, Kochenderfer M, Cohn A, et al. A Randomized, Phase II Trial of Cetuximab With or Without PX-866, an Irreversible Oral Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor, in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma. *Clinical Colorectal Cancer*. 2016;15(4):337-344.e2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.03.004>
120. García-Aranda M, Redondo M. Targeting Receptor Kinases in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):433. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11040433>
121. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discovery*. 2011;1(6):508-23. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0109>
122. Ciardiello F, Normanno N. HER2 signaling and resistance to the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab: a further step

- toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer Discovery*. 2011;1(6):472-4. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0261>
123. Bekaii-Saab TS, Lach K, Hsu LI, et al. Impact of Anti-EGFR Therapies on HER2-Positive Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Clinical Outcomes. *Oncologist*. 2023;28(10):885-893. DOI: <https://doi.org/10.1093/oncolo/oyad200>
124. Ahcene Djaballah S, Daniel F, Milani A, et al. HER2 in Colorectal Cancer: The Long and Winding Road From Negative Predictive Factor to Positive Actionable Target. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2022;42:1-14. DOI: [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_351354](https://doi.org/10.1200/EDBK_351354)
125. Subramanian J, Katta A, Masood A, et al. Emergence of ERBB2 Mutation as a Biomarker and an Actionable Target in Solid Cancers. *Oncologist*. 2019;24(12):e1303-e1314. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0845>
126. Vaghi C, Mauri G, Agostara AG, et al. The predictive role of ERBB2 point mutations in metastatic colorectal cancer: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews*. 2023;112:102488. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102488>
127. Zhang L, Castanaro C, Luan B, et al. ERBB3/HER2 signaling promotes resistance to EGFR blockade in head and neck and colorectal cancer models. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(5):1345-55. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-1033>
128. Loree JM, Bailey AM, Johnson AM, et al. Molecular Landscape of ERBB2/ERBB3 Mutated Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(12):1409-1417. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djy067>
129. Hickish T, Cassidy J, Propper D, et al. A randomised, open-label phase II trial of afatinib versus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 2014;50(18):3136-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.08.008>
130. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discovery*. 2014;4(9):1036-45. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0326>
131. Deeken JF, Wang H, Subramanian D, et al. A phase 1 study of cetuximab and lapatinib in patients with advanced solid tumor malignancies. *Cancer*. 2015;121(10):1645-53. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.29224>
132. Jacobs SA, Lee JJ, George TJ, et al. Neratinib-Plus-Cetuximab in Quadruple-WT (KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA) Metastatic Colorectal Cancer Resistant to Cetuximab or Panitumumab: NSABP FC-7, A Phase Ib Study. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(6):1612-1622. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1831>
133. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2012;18(2):221-3. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2609>
134. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, et al. Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(9):2157-66. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2821>
135. Braig F, März M, Schieferdecker A, et al. Epidermal growth factor receptor mutation mediates cross-resistance to panitumumab and cetuximab in gastrointestinal cancer. *Oncotarget*. 2015;6(14):12035-47. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3574>
136. Bagchi A, Haidar JN, Eastman SW, et al. Molecular Basis for Necitumumab Inhibition of EGFR Variants Associated with Acquired Cetuximab Resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2018;17(2):521-531. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0575>
137. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG, et al. Genomic Landscape of Cell-Free DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Discovery*. 2018;8(2):164-173. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1009>
138. Tintelnot J, Baum N, Schultheiß C, et al. Nanobody Targeting of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Ectodomain Variants Overcomes Resistance to Therapeutic EGFR Antibodies. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019;18(4):823-833. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0849>
139. Sickmier EA, Kurzeja RJ, Michelsen K, et al. The Panitumumab EGFR Complex Reveals a Binding Mechanism That Overcomes Cetuximab Induced Resistance. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163366. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163366>

140. Sánchez-Martín FJ, Bellosillo B, Gelabert-Baldrich M, et al. The First-in-class Anti-EGFR Antibody Mixture Sym004 Overcomes Cetuximab Resistance Mediated by EGFR Extracellular Domain Mutations in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(13):3260-7. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2400>
141. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncology*. 2018;4(11):1527-1534. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2969>
142. Lai GGY, Lim TH, Lim J, et al. Clonal MET Amplification as a Determinant of Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(11):876-884. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00177>
143. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discovery*. 2013;3(6):658-73. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0558>
144. Martinelli E, Ciardiello D, Martini G, et al. Implementing anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in metastatic colorectal cancer: challenges and future perspectives. *Annals of Oncology*. 2020;31(1):30-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.10.007>
145. Delord JP, Argilés G, Fayette J, et al. A phase 1b study of the MET inhibitor capmatinib combined with cetuximab in patients with MET-positive colorectal cancer who had progressed following anti-EGFR monoclonal antibody treatment. *Investigational New Drugs*. 2020;38(6):1774-1783. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00928-z>
146. Pagani F, Randon G, Guarini V, et al. The Landscape of Actionable Gene Fusions in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(21):5319. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20215319>
147. Kloosterman WP, Coebergh van den Braak RRJ, Pieterse M, et al. A Systematic Analysis of Oncogenic Gene Fusions in Primary Colon Cancer. *Cancer Research*. 2017;77(14):3814-3822. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3563>
148. Madison R, Pietrantonio F, Juckett L, et al. Kinase fusions in colorectal cancers: A unique biologic subset. *Annals of Oncology*. 2018;29:viii152. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy281.005>
149. Wang J, Li R, Li J, et al. Comprehensive analysis of oncogenic fusions in mismatch repair deficient colorectal carcinomas by sequential DNA and RNA next generation sequencing. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):433. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03108-6>
150. Yakirevich E, Resnick MB, Mangray S, et al. Oncogenic ALK Fusion in Rare and Aggressive Subtype of Colorectal Adenocarcinoma as a Potential Therapeutic Target. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(15):3831-40. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-3000>
151. Hua H, He W, Chen N, et al. Genomic and transcriptomic analysis of MSI-H colorectal cancer patients with targetable alterations identifies clinical implications for immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2023;13:974793. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.974793>
152. Wang Q, Zhang Y, Zhu J, et al. IGF-1R inhibition induces MEK phosphorylation to promote survival in colon carcinomas. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):153. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0204-0>
153. Qiao C, Huang W, Chen J, et al. IGF1-mediated HOXA13 overexpression promotes colorectal cancer metastasis through upregulating ACLY and IGF1R. *Cell Death & Disease*. 2021;12(6):564. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03833-2>
154. Huang F, Xu LA, Khambata-Ford S. Correlation between gene expression of IGF-1R pathway markers and cetuximab benefit in metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(4):1156-66. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1135>
155. Inno A, Di Salvatore M, Cenci T, et al. Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer? *Clinical Colorectal Cancer*. 2011;10(4):325-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2011.03.028>
156. Yar Saglam AS, Alp E, Elmazoglu Z, et al. Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT

- pathway in human colorectal cancer cell lines. *Human & Experimental Toxicology*. 2016;35(5):526-43. DOI: <https://doi.org/10.1177/0960327115595686>
157. Vallböhmer D, Zhang W, Gordon M, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(15):3536-44. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.100>
158. Subbiah V, Khawaja MR, Hong DS, et al. First-in-human trial of multikinase VEGF inhibitor regorafenib and anti-EGFR antibody cetuximab in advanced cancer patients. *JCI Insight*. 2017;2(8):e90380. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90380>
159. Deng L, Wang L, Zhang J, et al. The mechanism of action and biodistribution of a novel EGFR/VEGF bispecific fusion protein that exhibited superior antitumor activities. *Heliyon*. 2023;9(6):e16922. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16922>
160. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461-1473. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
161. Zhao H, Ming T, Tang S, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer*. 2022;21(1):144. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01616-7>
162. Kim WK, Kwon Y, Jang M, et al.  $\beta$ -catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Scientific Reports*. 2019;9(1):18440. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54890-9>
163. Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, et al. Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(2):532-41. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0462>
164. Schmitz S, Bindea G, Albu RI, et al. Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer. *Oncotarget*. 2015;6(33):34288-99. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5924>
165. Skvortsova I, Skvortsov S, Raju U, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and c-myc expression are the determinants of cetuximab-induced enhancement of squamous cell carcinoma radioresponse. *Radiotherapy and Oncology*. 2010;96(1):108-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.04.017>
166. Holz C, Niehr F, Boyko M, et al. Epithelial-mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*. 2011;101(1):158-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.042>
167. Byers LA, Diao L, Wang J, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(1):279-90. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1558>
168. Boeckx C, Blockx L, de Beeck KO, et al. Establishment and characterization of cetuximab resistant head and neck squamous cell carcinoma cell lines: focus on the contribution of the AP-1 transcription factor. *American Journal of Cancer Research*. 2015;5(6):1921-38
169. Thota R, Yang M, Pflieger L, et al. APC and TP53 Mutations Predict Cetuximab Sensitivity across Consensus Molecular Subtypes. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5394. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13215394>
170. Oden-Gangloff A, Di Fiore F, Bibeau F, et al. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. *British Journal of Cancer*. 2009;100(8):1330-5. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605008>
171. Huang S, Benavente S, Armstrong EA, et al. p53 modulates acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Research*. 2011;71(22):7071-9. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0128>
172. Huemer F, Thaler J, Piringer G, et al. Sidedness and TP53 mutations impact OS in anti-EGFR but not anti-VEGF treated mCRC - an analysis of the KRAS registry of the AGMT (Arbeitsgemeinschaft Medikamentöse Tumortherapie). *BMC Cancer*. 2018;18(1):11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3955-4>
173. Ziranu P, Lai E, Schirripa M, et al. The Role of p53 Expression in Patients with RAS/BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Receiving Irinotecan and Cetuximab as Later Line Treatment. *Targeted Oncology*. 2021;16(4):517-527. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11523-021-00816-3>
174. Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV, et al. Transcriptional activation

- of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(11):6009-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.16.11.6009>
175. Bheda A, Creek KE, Pirisi L. Loss of p53 induces epidermal growth factor receptor promoter activity in normal human keratinocytes. *Oncogene*. 2008;27(31):4315-23. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.65>
176. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
177. Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(6):415-24. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2853>
178. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF-β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012;31(3-4):553-68. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9375-7>
179. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(11):788-99. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3603>
180. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(10):790-811. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd3810>
181. Mehrvarz Sarshekeh A, Advani S, Overman MJ, et al. Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173345. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173345>
182. Cheng H, Fertig EJ, Ozawa H, et al. Decreased SMAD4 expression is associated with induction of epithelial-to-mesenchymal transition and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*. 2015;16(8):1252-8. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1056418>
183. Ozawa H, Ranaweera RS, Izumchenko E, et al. SMAD4 Loss Is Associated with Cetuximab Resistance and Induction of MAPK/JNK Activation in Head and Neck Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(17):5162-5175. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1686>
184. Innocenti F, Ou FS, Qu X, et al. Mutational Analysis of Patients With Colorectal Cancer in CALGB/SWOG 80405 Identifies New Roles of Microsatellite Instability and Tumor Mutational Burden for Patient Outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(14):1217-1227. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01798>
185. Han Y, Peng Y, Fu Y, et al. MLH1 Deficiency Induces Cetuximab Resistance in Colon Cancer via Her-2/PI3K/AKT Signaling. *Advanced Science*. 2020;7(13):2000112. DOI: <https://doi.org/10.1002/adv.202000112>
186. Qiu MZ, He CY, Yang XH, et al. Relationship of HER2 Alteration and Microsatellite Instability Status in Colorectal Adenocarcinoma. *Oncologist*. 2021;26(7):e1161-e1170. DOI: <https://doi.org/10.1002/onco.13786>
187. Kloth M, Ruessler V, Engel C, et al. Activating ERBB2/HER2 mutations indicate susceptibility to pan-HER inhibitors in Lynch and Lynch-like colorectal cancer. *Gut*. 2016;65(8):1296-305. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309026>
188. Zaal EA, Berkers CR. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2018;8:500. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00500>
189. Koustas E, Karamouzis MV, Mihailidou C, et al. Co-targeting of EGFR and autophagy signaling is an emerging treatment strategy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Letters*. 2017;396:94-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.023>
190. Phi LTH, Sari IN, Yang YG, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International*. 2018;2018:5416923. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>
191. Lewandowski T, Stelmasiak P, Stefańska J, et al. P-255 The clinical significance of the gut microbiota in RAS wild-type metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies in combination with chemotherapy – preliminary results. *Annals of Oncology*. 2021;32:S185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.309>
192. Wang Y, Wan X, Hou S. Editorial: Gut microbiota and chemotherapy resistance of colorectal cancer. *Frontiers in Gastroenterology* 2023;2. doi:10.3389/fgstr.2023.1167322
193. Chu J, Fang X, Sun Z, et al. Non-Coding RNAs Regulate the Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2022;11:801319. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.801319>
194. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Overcoming Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *American Society of Clinical*

Oncology Educational Book. 2015:e149-56. DOI: [https://doi.org/10.14694/EdBook\\_AM.2015.35.e149](https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e149)

195. Sansom OJ, Meniel V, Wilkins JA, et al. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(38):14122-7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604130103>

196. Choi JK, Cho H, Moon BS. Small Molecule Destabilizer of  $\beta$ -Catenin and Ras Proteins Antagonizes Growth of K-Ras Mutation-Driven Colorectal Cancers Resistant to EGFR Inhibitors. *Targeted Oncology*. 2020;15(5):645-657. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11523-020-00755-5>

197. Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, et al. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(49):86356-86368. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21169>

Received 22 March 2024

Revised 30 May 2024

Accepted 24 June 2024

#### Information about the authors

**Alexandra A. Lebedeva**, Head of the Interpretation Group, OncoAtlas LLC; Researcher, Laboratory for Applied Genomic Technologies, Institute for personalized oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, E-mail: [lebedeva\\_a\\_a\\_1@staff.sechenov.ru](mailto:lebedeva_a_a_1@staff.sechenov.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1920-5076>.

**Alexandra I. Kavun**, Senior Data Interpretation Specialist, OncoAtlas LLC, Moscow, Russia, E-mail: [kavun@oncoatlas.ru](mailto:kavun@oncoatlas.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3861-5281>.

**Ekaterina V. Belova**, PhD, Project Manager, OncoAtlas LLC; Researcher, Laboratory for Applied Genomic Technologies, Institute for personalized oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; Senior Researcher, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, E-mail: [belova@oncoatlas.ru](mailto:belova@oncoatlas.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7701-8765>.

**Tatiana G. Antonova**, Head of the Chemotherapy Day Center, City Clinical Oncological Hospital №1, Moscow, Russia, E-mail: [tattg@mail.ru](mailto:tattg@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6646-7454>.

**Anna B. Semenova**, Doct. Sci. (Medicine), Head of the Center for Pathological Diagnostics and

Molecular Genetics, City Clinical Oncological Hospital №1, Moscow, Russia, E-mail: [gkob1@zdrav.mos.ru](mailto:gkob1@zdrav.mos.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8433-0837>.

**Olesya A. Kuznetsova**, Doctor, Researcher, Department of Antitumor Drug Therapy №2, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Clinical Project Manager, OncoAtlas LLC, Moscow, Russia, E-mail: [lessya.kuznetsova@gmail.com](mailto:lessya.kuznetsova@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7753-3081>.

**Tatiana V. Grigoreva**, Lead Expert in Development and Clinical Support, OncoAtlas LLC; Researcher, Laboratory for Applied Genomic Technologies, Institute for personalized oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, E-mail: [grigoreva@oncoatlas.ru](mailto:grigoreva@oncoatlas.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9054-1481>.

**Egor M. Veselovsky**, Technology Integration Specialist, OncoAtlas LLC, Moscow, Russia, E-mail: [egor.veselovsky@gmail.com](mailto:egor.veselovsky@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3631-6537>.

**Anastasiia N. Taraskina**, Bioinformatician, OncoAtlas LLC, Moscow, Russia, E-mail: [taraskina@oncoatlas.ru](mailto:taraskina@oncoatlas.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1952-9783>.

**Maxim V. Ivanov**, PhD, Head of Research and Bioinformatics, OncoAtlas LLC; Researcher, Laboratory for Applied Genomic Technologies, Institute for personalized oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; Researcher, School of Living Systems, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia, E-mail: [maxim.ivanov@oncoatlas.ru](mailto:maxim.ivanov@oncoatlas.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9961-0129>.

**Vladislav A. Mileyko**, Director, OncoAtlas LLC; Deputy Head of the Applied Genomic Technologies Laboratory, Laboratory for Applied Genomic Technologies, Institute for personalized oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, E-mail: [mileyko@oncoatlas.ru](mailto:mileyko@oncoatlas.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0272-1747>.

**Alexey A. Tryakin**, Doct. Sci. (Medicine), Head of the Chemotherapy Department, Department of Antitumor Drug Therapy №2, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia, E-mail: [atryakin@mail.ru](mailto:atryakin@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2245-214X>.

**Mikhail Y. Fedyanin**, Doct. Sci. (Medicine), Head of the Chemotherapy Department, Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka”;

Senior Researcher at the Chemotherapy Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Head of the Department, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: fedyaninmu.ronc@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>.

**Ilya A. Pokataev**, Doct. Sci. (Medicine), Head of the Chemotherapy Department, City Clinical Oncological Hospital №1, Moscow, Russia, E-mail: [pokia@mail.ru](mailto:pokia@mail.ru), ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-9864-3837>.

**Mariya M. Byakhova**, Doct. Sci. (Medicine), Head of the Genetics Laboratory, City Clinical Oncological Hospital №1, Moscow, Russia, E-mail: [biakhovamm@gmail.com](mailto:biakhovamm@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5296-0068>.

**Vsevolod N. Galkin**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Chief Physician, City Clinical Oncological Hospital №1, Moscow, Russia, E-mail: [galkin\\_v\\_n\\_1@staff.sechenov.ru](mailto:galkin_v_n_1@staff.sechenov.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6619-6179>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-2

УДК 616.13-004.6

# Взаимосвязь мобильных генетических элементов с некодирующими РНК в развитии атеросклероза (обзор)

Р.Н. Мустафин<sup>1</sup> , Э.К. Хуснутдинова<sup>2,3</sup> 

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

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

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

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

## Резюме

**Актуальность:** Атеросклероз является ведущей причиной сердечно-сосудистой патологии взрослого населения всего мира. Ассоциация болезни с возрастом свидетельствует о наличии общих механизмов развития старения и атеросклероза. В научной литературе появляется все больше данных о роли некодирующих РНК и мобильных генетических элементов в механизмах старения и атеросклероза. Поиск молекулярных механизмов болезни на эпигенетическом уровне позволит разрабатывать новые методы терапии. **Цель исследования:** Определить роль транспозонов и некодирующих РНК в этиопатогенезе атеросклероза и их взаимосвязь между собой в данных процессах. **Материалы и методы:** Использованы базы данных Scopus, WoS, PubMed для анализа роли микроРНК, длинных некодирующих РНК, транспозонов в развитии старения и атеросклероза. **Результаты:** Согласно проанализированной литературе, важным фактором развития атеросклероза является патологическая активация транспозонов при старении, вызывающая интерфероновый ответ и асептическое воспаление в организме, в том числе в стенках сосудов. Определена роль эпигенетических факторов, в этиопатогенезе атеросклероза, включая микроРНК и длинные некодирующие РНК, которые изменяют экспрессию специфических генов в макрофагах, гладкомышечных клетках сосудов и эндотелиоцитах. Активация транспозонов отражается в изменении экспрессии произошедших от них в эволюции или образующихся при процессинге их транскриптов длинных некодирующих РНК и микроРНК. Анализ научной литературы позволил обнаружить 64 произошедших от транспозонов микроРНК, изменения экспрессии которых характерны для атеросклероза. Из 64 выявленных микроРНК 34 ассоциированы со старением, что свидетельствует о роли патологически активированных при старении транспозонов в инициации развития атеросклероза. **Заключение:** Поскольку транспозоны являются драйверами эпигенетической регуляции в онтогенезе, полученные результаты впервые в научной литературе описывают наиболее вероятные механизмы влияния

механизмов старения на развитие атеросклероза на эпигенетическом уровне. Это обусловлено патологической активацией транспозонов с возрастом, что оказывает влияние на изменение экспрессии произошедших от них некодирующих РНК за счет наличия комплементарных последовательностей и участия в общих эпигенетических сетях регуляции функционирования генома. Полученные данные о роли произошедших от транспозонов микроРНК в развитии как атеросклероза, так и старения, подтверждают предложенные механизмы патогенеза болезни.

**Ключевые слова:** атеросклероз; воспаление; длинные некодирующие РНК; микроРНК; старение; транспозоны

**Для цитирования:** Мустафин РН, Хуснутдинова ЭК. Взаимосвязь мобильных генетических элементов с некодирующими РНК в развитии атеросклероза (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):31-56. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-2

# Relationship of transposable elements with non-coding RNAs in the development of atherosclerosis (review)

Rustam N. Mustafin<sup>1</sup> , Elza K. Khusnutdinova<sup>2,3</sup> 

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University,  
3 Lenin St., Ufa, 450008, Russia

<sup>2</sup> Ufa Scientific Center, RAS,  
71 Oktyabrya Ave., Ufa, 450054, Russia

<sup>3</sup> Ufa University of Science and Technology,  
32 Zaki Validi St., Ufa, 450076, Russia

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

## Abstract

**Background:** Atherosclerosis is the leading cause of cardiovascular pathology in adults around the world. Association of the disease with age indicates the presence of common mechanisms for the development of aging and atherosclerosis. More data is emerging in the scientific literature on the role of non-coding RNAs and transposable elements in the mechanisms of aging and atherosclerosis. The search for the exact molecular mechanisms of atherosclerosis at the epigenetic levels will allow the development of new therapeutic methods. **The aim of the study:** To determine the role of transposable elements and non-coding RNAs in the etiopathogenesis of atherosclerosis and their relationship with each other. **Materials and methods:** We used the Scopus, WoS, PubMed databases to analyze the role of miRNAs, long non-coding RNAs, and retroelements in the development of aging and atherosclerosis. **Results:** According to the analyzed literature, an important factor in the development of atherosclerosis is the pathological activation of transposable elements during aging, causing an interferon response and aseptic inflammation in the walls of blood vessels. The role of epigenetic factors in the etiopathogenesis of atherosclerosis has been determined, including microRNAs and long non-coding RNAs that change the expression of specific genes in macrophages, vascular smooth muscle cells and endothelial cells. Activation of transposable elements is reflected in changes in the expression of long non-coding RNAs and microRNAs that originate from them in evolution or are formed during the processing of their transcripts. An analysis of the scientific

literature revealed 64 microRNAs derived from transposable elements, changes in the expression of which are specific to atherosclerosis. Of the 64 identified microRNAs, 34 are associated with aging, which indicates the role of activation transposable elements during aging in the initiation of the development of atherosclerosis. **Conclusion:** Since transposable elements are drivers of epigenetic regulation in ontogenesis, the results obtained for the first time in the scientific literature describe the most likely mechanisms of the influence of aging mechanisms on the development of atherosclerosis at the epigenetic level. This is due to the pathological activation of transposable elements during aging, which affects changes in the expression of non-coding RNAs derived from them due to the presence of complementary sequences and participation in general epigenetic networks regulating genome functioning. The data obtained on the role of microRNAs derived from transposable elements in the development of both atherosclerosis and aging confirm the proposed mechanisms of disease pathogenesis.

**Keywords:** atherosclerosis; inflammation; long non-coding RNA; microRNA; aging; transposable elements

**For citation:** Mustafin RN, Khusnutdinova EK. Relationship of transposable elements with non-coding RNAs in the development of atherosclerosis (review). Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):31-56. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-2

**Введение.** Атеросклероз (АС) является ведущей причиной сердечно-сосудистых заболеваний в мире. Его основные клинические проявления включают ишемическую болезнь сердца и головного мозга и АС периферических артерий. Независимым фактором риска развития АС является старение и ассоциированное с ним воспаление стенок сосудов [1]. Одним из ключевых факторов старения является патологическая активация мобильных генетических элементов (МГЭ), таких как ретроэлементы (РЭ) HERV (Human Endogenous Retroviruses) и LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Elements-1) [2]. Продукты экспрессии РЭ при старении стимулируют гиперпродукцию интерферона и способствуют вторичным хроническим воспалительным процессам в организме [3]. Для макрофагов характерна экспрессия HERV-K HML-2, коррелирующая с иммунной активацией макрофагов (поляризация в М1-клетки) и ответом на интерферон-1 [4]. Согласно новой парадигме иммуностарения, дисфункциональные ЛВ-пенистые макрофаги (CD14+CD16+) продуцируют частицы HERV-K102, высвобождаемые для стимуляции обучаемого врожденного иммунитета [5], что может быть причиной

нарушенной экспрессии генов при АС, в том числе активации гена *ERVp1*, произошедшего от *Env* эндогенных РЭ HERV-P [6].

МГЭ – это последовательности ДНК, способные к перемещению в новый локус генома путем «вырезания и вставки» (ДНК-транспозоны) или «копирования и вставки» (РЭ). К автономным РЭ (кодирующим собственные ферменты, необходимые для перемещений) относятся содержащие длинные концевые повторы (LTR) HERV и не содержащие LTR элементы LINE. Неавтономные РЭ используют обратную транскриптазу и эндонуклеазу автономных РЭ для транспозиций, к ним относятся SINE (в том числе Alu) и SVA. РЭ занимают значительную часть генома человека: 8,3% – HERV, 35% – LINE1 и SINE [7]. Роль МГЭ в инициации и развитии АС обусловлена не только опосредованным интерфероном воспалением, но и участием в функционировании иммунной системы. Об этом свидетельствует возникновение необходимых для V(D)J рекомбинации RAG1 и RAG2 от ДНК-транспозонов [8]. Поскольку с возрастом происходит дисбаланс в активации РЭ [2], способствующий старению и воспалению стенок сосудов [1, 3], это может отражаться также на дисрегуляции ДНК-транспозонов

и происходящих от них генов V(D)J рекомбинации с последующим дисбалансом иммунной системы при старении [8], что также вероятно отражается на развитии АС (Рис. 1). Активация РЭ при старении может

приводить к иммунной патологии также в связи с использованием ERV как энхансеров генов HLA-G и интерферон-индуцибельных генов (формируя транскрипционные сети интерферонного ответа [9]).

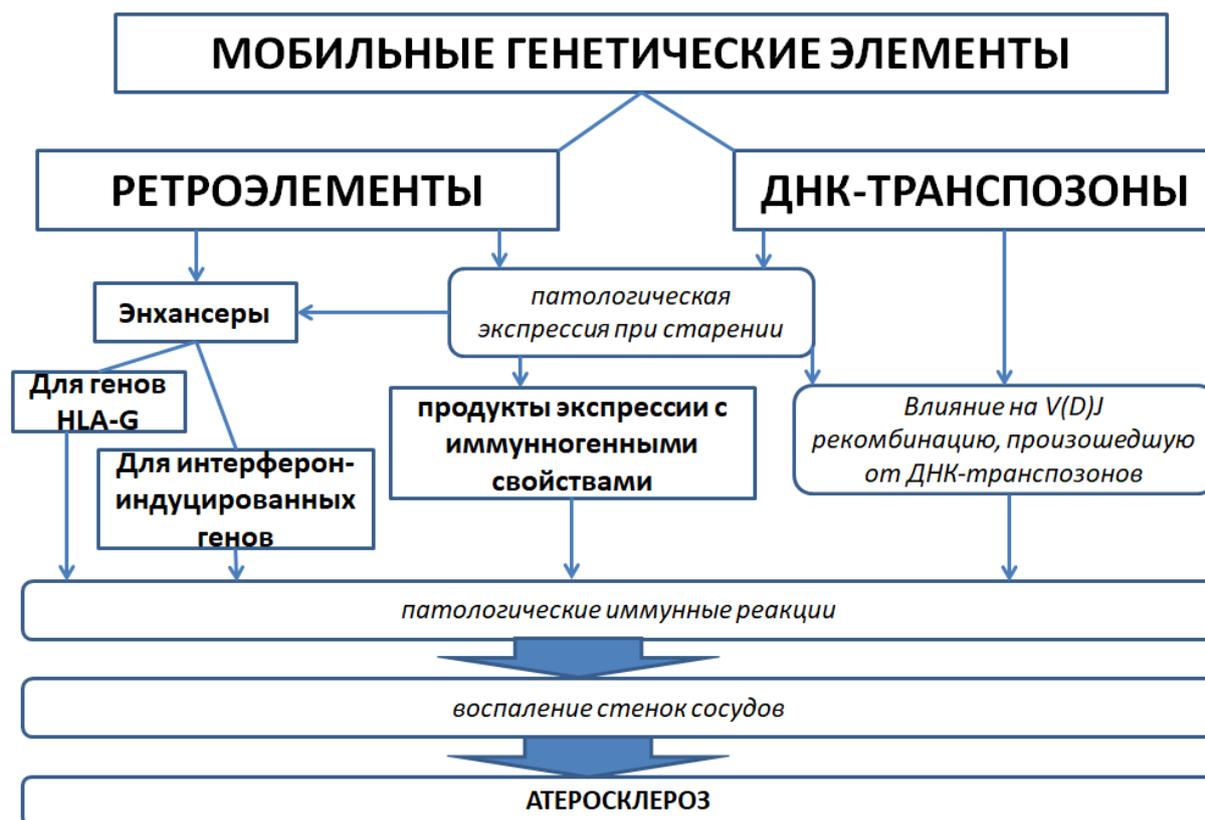


Рис. 1. Схема путей влияния МГЭ на развитие атеросклероза

Fig. 1. Scheme of MGE pathways of influence on the development of atherosclerosis

Важную роль в развитии АС играют эпигенетические факторы, изменение которых под влиянием активации РЭ характерно для старения [2]. Под влиянием эпигенетических факторов происходит поляризация ассоциированных с АС макрофагов из противовоспалительных (M2-подобных) в провоспалительные (M1-подобные) и развивается устойчивое воспаление стенок сосудов [10]. Для активированных моноцитов характерна активация HERV-K102 с выходом их продуктов экспрессии в вакуоли, связанные с поверхностями этих клеток, которые превращаются таким образом в «пенистые». Высвобождение HERV-K102 происходит только при лизисе макрофагов.

HERV-K102 защищают клетки человека от вирусных инфекций [5], роль которых в развитии АС доказана для вирусов ВИЧ, простого герпеса, гепатита С и В, цитомегаловируса, Т-клеточного лейкоза, папилломы, гриппа [11].

РЭ характеризуются противовирусными свойствами [5] и активацией в ответ на экзогенные вирусы [12], поэтому можно предположить, что одним из механизмов влияния вирусных инфекций на развитие АС может быть изменение экспрессии РЭ. В результате, несмотря на активацию МГЭ в качестве защитного механизма, РЭ могут служить триггерами дальнейшего дисбаланса иммунной системы, в особенности при

наличии имеющейся дисрегуляции РЭ, например, при старении [3]. Поскольку МГЭ служат регуляторами экспрессии генов на протяжении всего онтогенеза человека [2, 7], а также драйверами эпигенетических факторов [13], изменение которых обратимо и может быть скорректировано с помощью микроРНК, подробное исследование роли МГЭ и эпигенетических факторов в этиопатогенезе АС определяет возможные новые пути воздействия на эпигенетическую дисрегуляцию с помощью некодирующих РНК (нкРНК), комплементарных МГЭ.

**Цель исследования.** Определить роль транспозонов и некодирующих РНК в этиопатогенезе атеросклероза и их взаимосвязь между собой в данных процессах.

**Материалы и методы исследования.** Использованы базы данных Scopus, WoS, PubMed для анализа роли микроРНК, длинных некодирующих РНК, транспозонов в развитии старения и атеросклероза.

#### Результаты и их обсуждение

#### Роль некодирующих РНК в патогенезе атеросклероза

К основным эпигенетическим факторам относятся метилирование ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференция при помощи нкРНК. При этом нкРНК не только участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, но и являются ключевыми драйверами модификаций ДНК и гистонов в онтогенезе [13]. Изменения экспрессии микроРНК описаны как патогенетические факторы развивающегося при старении АС [1]. Механизмы участия микроРНК в патогенезе АС связаны с различными механизмами, в том числе с регуляцией метаболизма липидов и воспаления. Эндотелиальное воспаление ассоциировано с повышенными уровнями miR-126, miR-221/222 и низкими уровнями miR10a, miR-155, miR-181a, что ведет к апоптозу, остановке клеточного цикла,

выработке активных форм кислорода. При старении эндотелия наблюдается усиление экспрессии miR-217, miR-34; снижение выработки miR-92a, miR-216a, что сопровождается повышением концентраций VCAM (vascular cell adhesion protein), ICAM (intercellular adhesion molecule), MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1), CXCL12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12) [14].

Проведенный в 2018 году систематический обзор научной литературы показал, что микроРНК способны контролировать воспаление сосудистой стенки, регулируя ее инфильтрацию активированными лейкоцитами. К ним относятся miR-19a, miR-19b, miR-21. Ключевой микроРНК в данных механизмах АС является miR-126, которая ингибирует VCAM-1 и провоспалительный TNF- $\alpha$ . В связи с этим снижение экспрессии miR-126 повышает активность NF- $\kappa$ B, усиливая взаимодействие лейкоцитов с эндотелиальными клетками (ЭК) и способствуя АС. Влиянием на гладкомышечные клетки сосудов (ГМКС) в патогенезе АС охарактеризованы miR-1 (мишенями являются мРНК генов *KLF4*, *PIM1*), miR10a (мРНК гена *HDAC4*), miR-126 (мРНК генов *BCL2*, *IRS1*, *FOXO3*), miR-22 (ингибирует гены *MECP2*, *HDAC4*, *EVII*), miR-143 и miR-145 (воздействуют на *ACE*, *ELK1*, *KLF4/5*), miR-21 (мишени – мРНК генов *DOCK*, *PDCD4*), miR-26a, miR-34a, miR-130a, miR-221. Воспалительные макрофаги секретируют везикулы, содержащие специфические РНК, липиды и белки, которые используются для коммуникации, в том числе микроРНК между клетками атеросклеротических сосудов (такие как miR-28, miR-146a, miR-185, miR-365, miR-503) [15]. Аномальная пролиферация и миграция ГМКС вовлечены в формирование неинтимы и способствует рестенозу и образованию бляшек при АС [16].

К эпигенетическим факторам относятся также длинные нкРНК, которые также участвуют в патогенезе АС.

Например, длинная нкРНК VINAS [17] влияет на развитие АС за счет регуляции сигнальных путей MAPK и NF-κB, участвующих в воспалении. Нокдаун VINAS снижает экспрессию ключевых воспалительных маркеров, таких как MCP-1, COX-2, TNF-α, IL-1β в ЭК [17]. В плазме крови и в бляшках больных АС определен повышенный уровень длинной нкРНК AK136714, ингибирование которой в экспериментах подавляет формирование АС, воспаление ЭК и защищает эндотелиальный барьер. AK136714 стимулирует транскрипцию *Vim*, а также напрямую связывается с HuR, повышая стабильность мРНК генов *TNF-α*, *IL-1β* и *IL-6* [18]. Наблюдаемые изменения уровней длинных нкРНК в патогенезе АС могут быть отражением особенностей экспрессии РЭ, которые служат источниками нкРНК [7]. Это обусловлено высокой чувствительностью РЭ к влиянию средовых воздействий [2, 7, 13], которыми могут служить и экзогенные вирусы.

ANRIL взаимодействует непосредственно с последовательностями ретроэлементов *Alu* в геноме, которые оказывают проатерогенный эффект, располагаясь в областях промоторов генов-мишеней, кодирующих белки группы поликомб PRC-1 и PRC-2. Данные белки рекрутируются с помощью ANRIL и используются для модификации эпигенетических факторов с ингибированием генной экспрессии в цис-регуляции апоптоза, пролиферации и адгезии клеток, воспаления и развития АС [19]. Также выявлено, что модифицированные путем аденозининозинового редактирования транскрипты *Alu*-элементов контролируют стабильность

провоспалительной длинной нкРНК NEAT1 при АС. Экспрессия NEAT1, индуцируемая TNF-α, более чем в 2 раза выше в моноцитах крови больных АС коронарных артерий (КА). Подавление NEAT1 приводило к ослаблению вызванной TNF-α провоспалительной реакции эндотелиоцитов, что проявлялось экспрессией CXCL8, CCL2, VCAM1 и ICAM1 [20]. Экспрессия ассоциированной с инфарктом миокарда длинной нкРНК MIAT значительно повышается в сыворотке больных с симптомами нестабильной атеросклеротической бляшки. MIAT действует в качестве губки для miR-149-5p, способствуя экспрессии антифагоцитарной молекулы CD47 [21]. То есть механизм влияния длинных нкРНК на развитие АС может быть связан с регуляцией микроРНК. Данный механизм вероятно обусловлен происхождением в эволюции от МГЭ как длинных нкРНК, так и микроРНК [7, 11, 22] (общее происхождение способствует наличию комплементарных последовательностей). Поэтому логично предположить, что наблюдаемые изменения экспрессии нкРНК при АС являются следствием патологической активации МГЭ при старении [2], которые оказывают не только прямое влияние на развитие АС [1], но и опосредованное, за счет взаимодействий произошедших от них микроРНК и длинных нкРНК (Рис. 2). Доказательство данных механизмов АС может стать основой для таргетного воздействия на патогенез болезни с использованием микроРНК и их миметиков в качестве инструментов, регулирующих патологическую активность МГЭ.

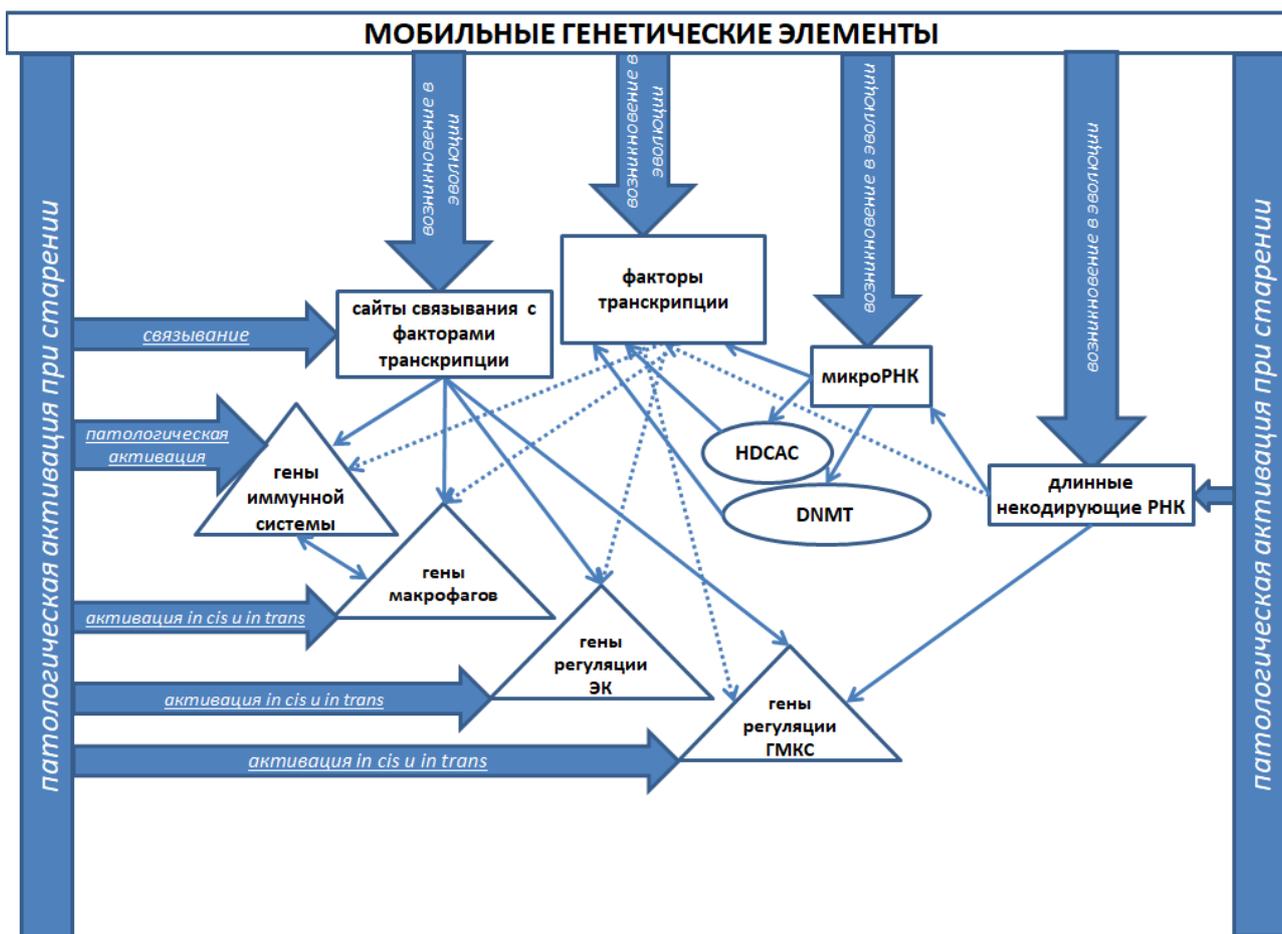


Рис. 2. Схема влияния МГЭ на изменение экспрессии некодирующих РНК в патогенезе атеросклероза

Fig. 2. Scheme of the effect of transposable elements on changes in the expression of non-coding RNAs in the pathogenesis of atherosclerosis

### Роль произошедших от мобильных генетических элементов микроРНК в развитии атеросклероза

В базу данных MDTE DB (miRNAs derived from transposable elements database) включены 661 специфических микроРНК, произошедших от МГЭ [22]. Анализ научной литературы позволил нам выявить изменение экспрессии 64 произошедших от МГЭ микроРНК, экспрессия которых изменяется при АС, что связано с различными механизмами их вовлечения в патогенез болезни. У больных АС в экзосомах определены повышенные уровни miR-1202 [23], произошедшей от LTR-ERV1 (полностью соответствует последовательности) [22]. Потенциальной терапевтической мишенью АС может стать miR-1246, возникшая от LTR-ERV1 и

частично комплементарная его последовательности [22], которая способствует пролиферации, инвазии и дифференцировке ГМКС [24]. Ассоциированная со старением (снижение уровня) [25] miR-1248 подавляет экспрессию тромбомодулина в предшественниках ЭК, что свидетельствует о ее возможном участии в патогенезе АС [26]. MiR-1248 произошла в эволюции от SINE/Alu [22].

У больных АС определено значительное снижение уровня miR-1253, мишенью которой является FOXC2-AS1 (способствует пролиферации ГМКС и ингибирует их апоптоз) [27]. MiR-1253 возникла от LINE2 и от SINE/MIR [22]. MiR-1257, участвующая в путях сборки белков главного комплекса гистосовместимости МНС, регулирует

различные гены-мишени, главным образом *CALR*, а также *POMC*, *TLR4*, *IL10*, *ATF6*, способствуя прогрессированию АС [28]. Данная микроРНК произошла от ERVL [22]. У пациентов молодого возраста с ишемическим инсультом, обусловленным АС, выявлены повышенные уровни miR-1261 (произошла от ДНК-транспозона Tc-Mar [22]), miR-1290 и miR-891a [29], возникших от SINE/MiR [22]. Низкие уровни miR-1264, сопровождающиеся повышенной экспрессией DNMT1 и фосфорилированного STAT3, определяются при нестабильном АС [30]. У больных инфарктом миокарда в экзосомах, полученных из макрофагов, определены высокие уровни miR-1271 [31], произошедшей от LINE2 [22]. При исследовании образцов коронарных артерий больных АС определено значительное повышение экспрессии miR-1273 [32], семейство которой произошло в эволюции от РЭ LINE, SINE, ERVL [22]. Экспрессия возникшей от SINE/MiR miR-1278 подавляет стимулированную PDGF-BB пролиферацию и миграцию ГМКС при АС [33].

У больных с АС крупных сосудов определено достоверное снижение экспрессии miR-1296 и miR-493 по сравнению с контролем [34]. Данные микроРНК возникли от LINE2. Произошедшая от LINE1 miR-147 [22], обладает атерогенными свойствами, индуцируя экспрессию *ICAM-1*. С данной микроРНК взаимодействует вовлеченная в АС длинная нкРНК MEG3, действующая как губка для miR-147 [35]. LINE2 является источником miR-151 [22], которая подавляет апоптоз ЭК при АС. Мишенью miR-151 являются IL-17A, а также белок BAX, с-каспазы 3 и 9 [36]. Экспрессия miR-192 (возникла от LINE2 [22]) значительно выше в сыворотке крови больных АС. Данная микроРНК способствует пролиферации и миграции ГМКС [37]. В сыворотке больных АС выявлено значительное снижение уровня miR-211 [38], произошедшей от LINE2. От ДНК-транспозона MER-135 в эволюции

возникла miR-224 [22], для которой определена обратная корреляция с АС коронарных артерий у человека [39]. В плазме крови пациентов с нестабильной стенокардией определено значительное повышение уровней miR-28, которая усиливает экспрессию *ABCA1*, что коррелирует с активацией трансляции мРНК гена *LXRα* в макрофагах [40]. Данная микроРНК, произошедшая от LINE2 [22], считается потенциальным биомаркером нестабильной стенокардии [40]. В моноцитах периферической крови больных стенокардией выявлено повышение экспрессии miR-2909 (возникшей от LTR-ERVL [22]) при утяжелении окклюзии коронарных артерий с положительной корреляцией. MiR-2909 регулирует гены, вовлеченные в воспаление и иммунитет [41]. Повышенный уровень miR-31 (произошла от LINE2 [22]) вызывает АС за счет воздействия на NOX4 [42]. В плазме крови больных АС определены повышенные уровни miR-3168 [43], возникшей от ДНК-TE hAT Charlie [22].

У больных АС коронарных артерий значительно повышена экспрессия miR-320b, которая регулирует отток холестерина из макрофагов. Введение miR-320b экспериментальным животным увеличивало размеры атеросклеротических бляшек, содержание поврежденных макрофагов и уровни провоспалительных цитокинов за счет усиления фосфорилирования NF-κB [44]. Источником miR-320b в эволюции является LINE2 [22]. Произошедшая от LINE2 miR-325 [22] способствует развитию АС за счет подавления экспрессии *KDM1A*, снижая уровни SREBF1 и ингибируя активацию пути PPARγ-LXR-ABCA1 [45]. В образовании окисленных пенных клеток при АС определена роль miR-326 (произошла от ДНК-транспозона hAT-Tip100 [22]), вовлеченная в сеть взаимодействий кольцевых РНК с длинными нкРНК [46]. Концентрация возникшей от SINE/MiR miR-335 [22], повышена в плазме крови больных АС [43]. В макрофагах, ГМКС и ЭК при атерогенезе

определяется повышение экспрессии miR-340 [47], произошедшей от ДНК-транспозона TcMar-Mariner [22]. В периферических мононуклеарах определены высокие уровни miR-342 [48] (возникшей от SINE/tRNA-RTE [22]), которые положительно коррелировали с концентрациями в сыворотке крови IL-6 и TNF- $\alpha$  [47].

В сыворотке больных АС определено значительное повышение экспрессии miR-3646 [49] (произошедшей от SINE/MIR [22]) и miR-374 (произошла от LINE2 [22]), которая стимулирует пролиферацию и миграцию ГМКС [50]. Снижение оттока свободного холестерина из макрофагов и усиленный приток окисленных липопротеинов низкой плотности является важным фактором развития АС. В метаболических путях, регулирующих эти процессы, участвует произошедшая от SINE/MIR и LINE2 [22] miR-378 [51]. Ускоряет развитие АС за счет влияния на макрофаги (нарушая их аутофагию) также miR-384 [52], произошедшая от LINE-Dong-R4 [22]. Низкая экспрессия miR-421 (произошла от LINE2 [22]) в сыворотке, бляшках и ГМКС у больных АС коронарных артерий повышает уровни CXCL2 [53]. При АС определяется также снижение концентрации miR-4286, возникшей от ERVL [22] и ингибирующей TGF- $\beta$ 1 (способствует повреждению ЭК) [54]. Возникшая от ДНК-транспозонов hAT Charlie miR-4463 [22], препятствует переключению фенотипа ГМКС, способствуя АС [55]. MiR-4487 (произошла от LINE1 [22]) при АС стимулирует миграцию и выживаемость ГМКС и ингибирует их апоптоз путем целевого воздействия на RASA1 [56]. MiR-4731 (источник – LINE-CR1 [22]) вызывает пролиферацию и миграцию ГМКС, взаимодействуя с транскрипционным фактором FOXO3 и длинной нкРНК SENCN (которая обладает противоположным эффектом) [57].

MiR-487 (произошедшая от SINE/MIR [22]) предложена в качестве молекулярной мишени для лечения АС.

Данная микроРНК ингибирует p53 и CBP, усиливая пролиферацию ЭК [58]. MiR-495 (источник – ERVL [22]) участвует в патогенезе АС путем связывания с кольцевой РНК hsa\_circ\_0126672 [59]. MiR-498 (произошла от LINE1 [22]) оказывает посттранскрипционное ингибирование на ген *SCD* (stearoyl-CoA desaturase), который в норме снижает уровень холестерина в сыворотке. У людей с полиморфизмом rs41290540CC в 3'UTR этого гена, нарушающий связывание с miR-498, определен низкий риск АС КА [60]. Уровень произошедшей от LINE2 miR-502 [22] значительно повышен в сыворотке больных АС коронарных артерий [61]. MiR-511 (источник – LINE1 [22]) является одним из «связующих» компонентов мультисубъединичного комплекса, участвующего в терминальных стадиях синтеза холестерина с регуляцией семейства белков GPCR, которые вовлечены в трансформацию патологических фенотипов ГМКС при АС [62]. MiR-520d (произошла от SINE/Alu [22]) ингибирует экспрессию гена *PCSK9*, вызывающего деградацию рецепторов липопротеинов низкой плотности, подавляя развитие АС [63].

MiR-544 (источник в эволюции – hAT Charlie [22]) участвует в патогенезе АС за счет регуляции формирования и репарации ЭК, способствуя созреванию и антиоксидантным свойствам ЭК путем регулирования сигнальных путей YY1/TET2 [64]. У пациентов с АС в жировой ткани вокруг коронарных артерий определено снижение экспрессии miR-548. Представители семейства данной микроРНК произошли в эволюции от различных РЭ (LINE1, LINE2, LTR-ERVL, LTR-Gypsy, LTR-ERV1, SINE/MIR) и ДНК-транспозонов (TcMar, hAT Charlie) [22]. MiR-548 регулирует экспрессию гена *HMGB1* (кодирует негистоновый белок, связывающий хроматин и участвующий в контроле транскрипции, репликации и репарации ДНК) [65]. Повышенная экспрессия miR-552 (произошла от LINE1 [22]) под влиянием PDGF-bb определена в

ГМКС, что ведет к стимуляции их пролиферации, инвазии и миграции. Мишенями miR-552 являются мРНК генов *SKI* и *ATF4* [66]. MiR-575, произошедшая от ДНК-транспозона hAT Charlie [22], предложена в качестве биомаркера и клинической мишени у больных АС. Данная микроРНК ингибирует миграцию и пролиферацию ЭК и стимулирует их апоптоз. MiR-575 подавляет экспрессию мРНК гена *Rab5B* [67]. Кольцевая РНК circ\_0086296 индуцирует АС через петлю обратной связи IFIT1/STAT1, действуя как губка для miR-576 (возникла от LINE1 [22]), которая ингибирует экспрессию *IFIT1-STAT1*, препятствуя развитию АС [68]. Hsa\_circ\_0031891 подавляет miR-579, усиливая экспрессию HMGB1 и PDGF-BB-индуцированную пролиферацию, миграцию и нарушение дифференцировки ГМКС аорты человека. Экспрессия miR-579 снижена у больных АС коронарных артерий [69]. Произошедшая от LINE-CR1 [22] miR-582 определяется на высоком уровне в сыворотке больных АС [43].

При воспалительных реакциях снижается уровень эндотелиальной синтетазы оксида азота (eNOS), которая является главным регулятором гомеостаза ЭК. При АС отсутствие OASL1 (2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1), необходимой для поддержания стабильности мРНК eNOS ускоряет прогрессирование бляшек. OASL1 взаимодействует с miR-584 (произошедшей от ДНК-транспозона hAT-Blackjack [22]), которая ингибирует мРНК eNOS, связываясь с ее 3'UTR [70]. Сверхэкспрессия miR-612 (произошла от SINE/MIR [22]) ингибирует миграцию и инвазию ГМКС, вызывая остановку клеточного цикла на стадии G1. Под влиянием PDGF-BB, который способствует пролиферации и миграции ГМКС, снижается экспрессия miR-612 [16]. В сыворотке больных АС снижен уровень PON1 и длинной нкРНК, действующей как конкурентная эндогенная РНК для miR-616 (произошла от LINE2 [22]). Было определено, что miR-616 ингибирует

экспрессию *PON1*, способствуя развитию АС [71].

Кольцевая РНК circARHGAP12 в экспериментах на мышах способствовала АС за счет стимуляции пролиферации и миграции ГМКС аорты. CircARHGAP12 также напрямую связывалась с miR-630 (возникла от SINE/MIR [22]), мишенью которой является метилтрансфераза гистонов EZH2, модулирующая транскрипцию TIMP2 в регуляции миграции ГМКС и вызывающая развитие АС [72]. Сходным механизмом действия обладает hsa\_circ\_0008896, влияющая на ГМКС посредством взаимодействия с miR-633 (произошедшая от SINE/MIR [22] и регулирующая CDC20B) [73]. MiR-637 (источник – LINE1 [22]) ингибирует экспрессию TRAF6 и способствует пролиферации ЭК и ангиогенезу, ингибируя апоптоз и воспаление. Взаимодействующая с ней circ\_0003575 вызывает обратный эффект, а также активирует путь NF-κB [74]. Экспрессия miR-641 (произошла от SINE/MIR [22]) снижена в индуцированных окисленными липопротеинами низкой плотности ГМКС. С данной микроРНК взаимодействует длинная нкРНК MIAT [75]. Источником miR-652 в эволюции является ДНК-транспозон hAT-Tip100 [22]. Ингибирование этой микроРНК уменьшает прогрессирование АС и усиливает восстановление эндотелия за счет стимуляции экспрессии циклина D2 [76].

У больных АС определена пониженная экспрессия miR-664a (произошла от LINE1 [22]) [77]. Длинная нкРНК Punisher регулирует апоптоз и митохондриальный гомеостаз ГМКС посредством взаимодействия с miR-664a [77]. Произошедшая от LINE2 miR-708 [22] экспрессируется на высоком уровне в ЭК неинтимы в поврежденных сосудах при физиологическом потоке крови и не экспрессируются при застое. MiR-708 обладает противовоспалительным свойством, подавляя экспрессию связанной с рецептором интерлейкина-1 киназы, рецептора интерлейкина-6, консервативной

спираль-петля-спираль вездесущей киназы и ингибитора субъединицы-γ киназы ядерного фактора κВ [78]. В тканях артерий у больных АС определены повышенные уровни произошедшей от LINE/CR1 [22] miR-769, мишенью которой являются мРНК генов киназы *GSK3B* и *TRAPPC2B* [43]. MiR-7975, произошедшая от LTR-ERV1 [22], предложена в качестве потенциального биомаркера и мишени для лечения АС [79]. Уровни экспрессии miR-942 (произошедшей от LINE2 [22]) оказались достоверно снижены у больных в постбифуркационных каротидных АС. miR-942 подавляет экспрессию гена

семейства адгезинов *GPR56* [80]. Таким образом, произошедшие от МГЭ микроРНК могут влиять на развитие АС посредством изменения экспрессии генов в ГМКС (способствуя патологической пролиферации, дифференцировке, инвазии и апоптозу клеток), в ЭК (вызывая патологическую экспрессию генов в клетках) и макрофагах, а также влияя на иммунные процессы (miR-1257 [28]; miR-28 [40]; miR-2909 [41]), эпигенетические факторы (miR-1264 [30], miR-630 [72], взаимодействуя с длинными нкРНК [46, 57, 71, 75, 77] и кольцевыми РНК [59, 68, 69, 72, 73, 80] (Рис. 3).

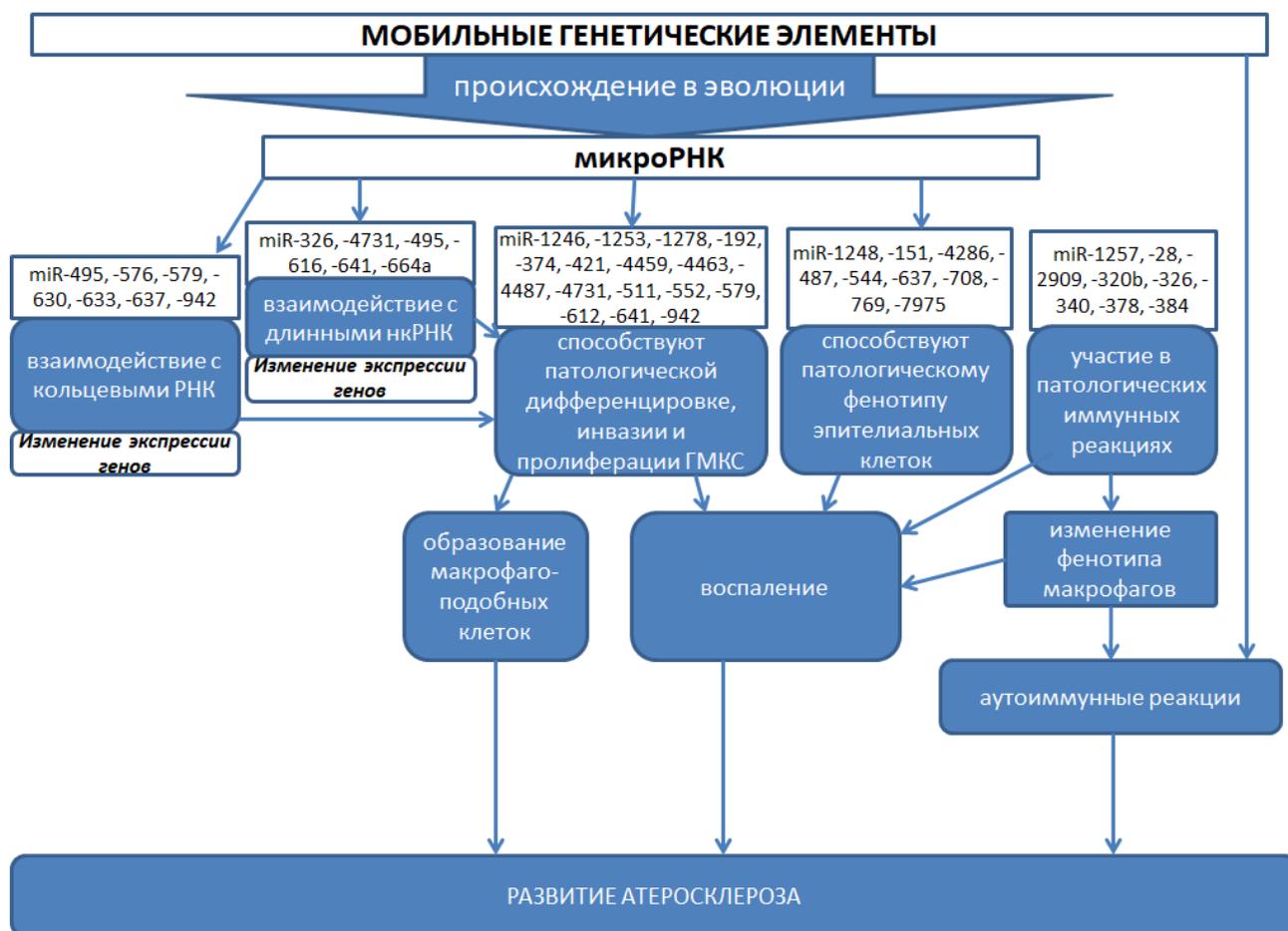


Рис. 3. Механизмы участия произошедших от мобильных генетических элементов микроРНК в патогенезе атеросклероза

Fig. 3. Mechanisms of participation of microRNAs derived from transposable elements in the pathogenesis of atherosclerosis

### Роль ассоциированных с атеросклерозом произошедших от мобильных генетических элементов микроРНК в старении

Поскольку АС связан со старением и воспалением стенок сосудов [1], активацией МГЭ [2, 3] при старении, проведен анализ научной литературы об ассоциации произошедших от МГЭ микроРНК одновременно с АС и старением. В фибробластах человека при старении определено повышение уровней miR-1246, miR-1271 [81, 82], miR-1273 [81], miR-1290 [82], а также снижение уровней miR-1257 [81], miR-1261 [82]. При старении определено снижение экспрессии miR-1248, miR-151 [25] и miR-147 [83], повышение экспрессии miR-192 [84]. Уровень miR-211 значительно выше у долгожителей по сравнению с людьми с короткой продолжительностью жизни (низкая экспрессия), обратная корреляция определена для miR-340 и miR-374 [85].

MiR-224 ассоциирована со старением головного мозга. Ее мишенью является мРНК гена *SNOR*, вовлеченного в регуляцию митохондриальных белков [86]. В ранних стадиях старения ЭК определено транзиторное снижение концентрации miR-28 в данных клетках [87]. MiR-31 действует как ключевой драйвер старения фолликулярных стволовых клеток волос путем прямого нацеливания на мРНК гена *Clock* (основной ген циркадных часов, нарушение регуляции которого активирует каскад MAPK/ERK), вызывая истощение HFSC посредством трансэпидермальной элиминации. Условная абляция miR-31 обеспечивает эффективную защиту кожи от старения [88]. Повышенная экспрессия miR-320b ассоциирована со старением [89]. Снижение уровней miR-325 способствует старению хондроцитов за счет активации путей p53/p21 [90]. Повышенная экспрессия miR-326 определяется в фибробластах кожи при старении [91].

Повышенная экспрессия miR-335 способствует старению ЭК, ингибируя экспрессию гена *sKlotho* [92]. При старении в мононуклеарах периферической крови определено снижение экспрессии miR-342, нацеленной на мРНК гена *SIRT6* [93]. Повышение экспрессии miR-378 определено у людей старческого возраста при регенерации мышц. Мишенями miR-378 являются мРНК генов сигнальных путей инсулино-подобного фактора роста (IGF-1) [94]. Было выявлено, что miR-384 негативно регулирует возрастную остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, что свидетельствует о роли данной микроРНК в старении [95]. Со старением кожи определена ассоциация повышения экспрессии miR-4487 [96].

В экспериментах на клеточных линиях человека miR-495 способствовала старению мезенхимальных стволовых клеток за счет воздействия на мРНК протоонкогена *BMI1* [97]. MiR-520d способствует старению скелетной мускулатуры за счет влияния на регуляторные факторы *MyoD*, *MyoG*, *Mef2c*, *Myf5*. Длинная нкРНК GPRC5D-AS1, ингибирующая miR-520d, предложена в качестве терапевтической мишени для лечения саркопении [98]. При старении у людей определено увеличение экспрессии miR-552 в 124 раза большее в сравнении с молодыми людьми [99]. Со старением фибробластов человека ассоциировано снижение уровней miR-548, miR-576 и повышение – miR-584 [81, 82], miR-633 [83], miR-641 [81]. В экспериментах при старении суставов было определено снижение уровней miR-652 и miR-708 [100]. В таблице представлены данные об изменениях экспрессии специфических микроРНК, произошедших от МГЭ при атеросклерозе и об их ассоциации со старением.

Таблица (начало)

## Ассоциация произошедших от МГЭ микроРНК с атеросклерозом и старением

Beginning of Table

## Association of transposable elements-derived microRNAs with atherosclerosis and ageing

№	МикроРНК	Мобильный генетический элемент-источник	Изменение экспрессии микроРНК при атеросклерозе (повышение - ↑, снижение - ↓) [автор]	Изменение экспрессии микроРНК при старении (повышение - ↑, снижение - ↓) [автор]
1	miR-1202	ERV1	↑ [23]	
2	miR-1246	ERV1	↑ [24]	↑ [81, 82]
3	miR-1248	SINE/Alu	↑ [26]	↓ [25]
4	miR-1253	LINE2, SINE/MIR	↓ [27]	
5	miR-1257	ERV1	↑ [28]	↓ [81]
6	miR-1261	Tc-Mar	↑ [29]	↓ [82]
7	miR-1264	LINE2	↓ [30]	
8	miR-1271	LINE2	↑ [31]	↑ [81]
9	miR-1273	LINE, SINE, ERV1	↑ [32]	↑ [81]
10	miR-1278	SINE/MIR	↓ [33]	
11	miR-1290	SINE/MIR	↑ [29]	↑ [82]
12	miR-1296	LINE2	↓ [34]	
13	miR-147	LINE1	↑ [35]	↓ [83]
14	miR-151	LINE2	↓ [36]	↓ [25]
15	miR-192	LINE2	↑ [37]	↑ [84]
16	miR-211	LINE2	↓ [38]	↓ [85]
17	miR-224	MER-135	↓ [39]	↓ [86]
18	miR-28	LINE2	↑ [40]	↓ [87]
19	miR-2909	ERV1	↑ [41]	
20	miR-31	LINE2	↑ [42]	↑ [88]
21	miR-3168	hAT-Charlie	↑ [43]	
22	miR-320b	LINE2	↑ [44]	↑ [89]
23	miR-325	LINE2	↑ [45]	↓ [90]
24	miR-326	hAT-Tip100	↑ [46]	↑ [91]
25	miR-335	SINE/MIR	↑ [43]	↑ [92]
26	miR-340	TcMar-Mariner	↑ [47]	↑ [85]
27	miR-342	SINE/tRNA-RTE	↓ [48]	↓ [93]
28	miR-3646	SINE/MIR	↑ [49]	
29	miR-374	LINE2	↑ [50]	↑ [85]
30	miR-378	SINE/MIR, LINE2	↑ [51]	↑ [94]
31	miR-384	LINE-Dong-R4	↑ [52]	↑ [95]
32	miR-421	LINE2	↓ [53]	
33	miR-4286	ERV1	↓ [54]	
34	miR-4463	hAT Charlie	↓ [55]	
35	miR-4487	LINE1	↑ [56]	↑ [96]
36	miR-4731	LINE-CR1	↑ [57]	
37	miR-487	SINE/MIR	↑ [58]	
38	miR-493	LINE2	↓ [34]	
39	miR-495	ERV1	↓ [59]	↑ [97]
40	miR-498	LINE1	↑ [60]	
41	miR-502	LINE2	↑ [61]	
42	miR-511	LINE1	↑ [62]	
43	miR-520d	SINE/Alu	↓ [63]	↑ [98]
44	miR-544	hAT Charlie	↑ [64]	
45	miR-548	LINE, LTR-РЭ, SINE, TcMar, hAT Charlie	↓ [65]	↓ [81, 82]
46	miR-552	LINE1	↑ [66]	↑ [99]
47	miR-575	hAT Charlie	↑ [67]	
48	miR-576	LINE1	↓ [68]	↓ [81]

Таблица (окончание)

## Ассоциация произошедших от МГЭ микроРНК с атеросклерозом и старением

End of Table

## Association of transposable elements-derived microRNAs with atherosclerosis and ageing

№	МикроРНК	Мобильный генетический элемент-источник	Изменение экспрессии микроРНК при атеросклерозе (повышение - ↑, снижение - ↓) [автор]	Изменение экспрессии микроРНК при старении (повышение - ↑, снижение - ↓) [автор]
49	miR-579	LINE1	↓ [69]	
50	miR-582	LINE-CR1	↑ [43]	
51	miR-584	hAT-Blackjack	↑ [70]	↑ [81, 82]
52	miR-612	SINE/MIR	↓ [16]	
53	miR-616	LINE2	↑ [71]	
54	miR-630	SINE/MIR	↓ [72]	
55	miR-633	SINE/MIR	↓ [73]	↑ [83]
56	miR-637	LINE1	↓ [74]	
57	miR-641	SINE/MIR	↓ [75]	↑ [81]
58	miR-652	hAT-Tip100	↑ [76]	↓ [100]
59	miR-664a	LINE1	↓ [77]	
60	miR-708	LINE2	↓ [78]	↓ [100]
61	miR-769	LINE/CR1	↑ [43]	
62	miR-7975	LTR-ERV1	↑ [79]	
63	miR-891a	SINE/MIR	↑ [29]	
64	miR-942	LINE2	↓ [80]	

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что активация МГЭ при старении может служить инициирующим событием в нарушении регуляции эпигенетических генных сетей, что отражается в изменениях уровней специфических микроРНК, способствуя атеросклерозу. При АС может быть сходное со старением возрастание уровней произошедших от МГЭ микроРНК (miR-1246, -1271, -1273, -192, -31, -320b, -326, -335, -340, -374, -378, -384, -4487, -552, -584) или их снижение (miR-151, -211, -224, -342, -421, -493, -548, -576, -708). Для нескольких микроРНК определено разное изменение экспрессии при старении и атеросклерозе (miR-1248, -1257, -1261, -1290, -147, -28, -325, -495, -520d, -633, -641, -652), что логично, поскольку старение является не единственным фактором, способствующим развитию болезни. Активация МГЭ также происходит под влиянием различных причин, в том числе вирусов [11] и стресса [7], как было отмечено в статье.

**Заключение.** Увеличение заболеваемости атеросклерозом с возрастом можно объяснить ролью в старении активации МГЭ, которые

вызывают патологическую активацию микроРНК и длинных нкРНК, генов иммунной системы, макрофагов, ЭК, ГМКС. Кроме того, продукты экспрессии РЭ являются триггерами интерферонового ответа и развития асептического воспаления в организме, характерного для АС. Анализ научной литературы позволил выявить 64 произошедших от МГЭ микроРНК (30 – от LINE, 13 – от SINE, 10 – от ДНК-транспозонов, 7 – от LTR-содержащих РЭ, 2 – одновременно от LINE и SINE, 1 – от LINE, SINE, LTR, 1 – от РЭ и ДНК-транспозонов), изменения экспрессии которых ассоциированы с атеросклерозом. Механизм их участия в патогенезе АС обусловлен влиянием на экспрессию генов в эндотелиоцитах, в гладкомышечных клетках сосудистой стенки, в макрофагах; воздействием на метаболизм липопротеинов; изменением функционирования длинных нкРНК и кольцевых РНК. Из 64 ассоциированных с атеросклерозом произошедших от МГЭ микроРНК при старении определено изменение экспрессии 34 микроРНК. Это свидетельствует о наличии общих эпигенетических механизмов старения и

атеросклероза, обусловленных патологической активацией МГЭ.

### 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. de Yebenes VG, Briones AM, Martos-Folgado I, et al. Aging-Associated miR-217 Aggravates Atherosclerosis and Promotes Cardiovascular Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2020;40(10):2408-2424. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314333>
2. Gorbunova V, Seluanov A, Mita P, et al. The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature*. 2021;596:43-53. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03542-y>
3. de Cecco M, Ito T, Petrashen AP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*. 2019;566(7742):73-78. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>
4. Russ E, Mikhalkovich N, Iordanskiy S. Expression of Human Endogenous Retrovirus Group K (HERV-K) HML-2 Correlates with Immune Activation of Macrophages and Type I Interferon Response. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(2):e0443822. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04438-22>
5. Laderoute MP. The paradigm of immunosenescence in atherosclerosis-cardiovascular disease (ASCVD). *Discovery Medicine*. 2020;29(156):41-51.
6. Matsuzawa A, Lee J, Nakagawa S, et al. HERV-Derived Ervpb1 Is Conserved in Simiiformes, Exhibiting Expression in Hematopoietic Cell Lineages Including Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4504. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22094504>
7. Mustafin RN, Khusnutdinova E. Perspective for studying the relationship of miRNAs with transposable elements. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023;45(4):3122-3145. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb45040204>
8. Rivera-Munoz P, Malivert L, Derdouch S, et al. DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 2007;37(S1):S71-S82. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200737396>
9. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*. 2016;351(6277):1083-1087. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5497>
10. Yang H, Sun Y, Li Q, et al. Diverse Epigenetic Regulations of Macrophages in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:868788. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.868788>
11. Мустафин РН. Перспективы применения статинов в противовирусной терапии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2023;25(1):56-67. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2023.1.56-67>
12. Badarinarayan SS, Sauter D. Switching Sides: How Endogenous Retroviruses Protect Us from Viral Infections. *Journal of Virology*. 2021;95(12):e02299-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02299-20>
13. Мустафин РН, Хуснутдинова ЭК. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(6):742-749. DOI: <https://doi.org/10.18699/10.18699/VJ17.30-0>
14. Menghini R, Stohr R, Federici M. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis. *Ageing Research Reviews*. 2014;17:68-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.005>
15. Lu Y, Thavarajah T, Gu W, et al. Impact of miRNA in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2018;38(9):e159-e170. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310227>
16. Chen C, Yan Y, Liu X. microRNA-612 is downregulated by platelet-derived growth factor-BB treatment and has inhibitory effects on vascular smooth muscle cell proliferation and migration via directly targeting AKT2. *Experimental and Therapeutic Medicine*.

- 2018;15(1):159-165. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5428>
17. Simion V, Zhou H, Haemming S, et al. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus. *Nature Communications*. 2020;11:6135. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19664-2>
18. Bai J, Liu J, Fu Z, et al. Silencing lncRNA AK136714 reduces endothelial cell damage and inhibits atherosclerosis. *Aging*. 2021;13(10):14159-14169. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.203031>
19. Chi JS, Li JZ, Jia JJ, et al. Long non-coding RNA ANRIL in gene regulation and its duality in atherosclerosis. *Current Medical Science*. 2017;37:816-822. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1812-y>
20. Vlachogiannis NI, Sachse M, Georgiopoulos G, et al. Adenosine-to-inosine Alu RNA editing controls the stability of the pro-inflammatory long noncoding RNA NEAT1 in atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2021;160:111-120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.07.005>
21. Ye ZM, Yang S, Xia Y, et al. LncRNA MIAT sponges miR-149-5p to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation. *Cell Death and Disease*. 2019;10:138. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1409-4>
22. Wei G, Qin S, Li W, et al. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2016;13(6):1155-1160. DOI: <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2511767>
23. Sorrentino TA, Duong P, Bouchareychas L, et al. Circulating exosomes from patients with peripheral artery disease influence vascular cell migration and contain distinct microRNA cargo. *JVS-Vascular Science*. 2020;1:28-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jvssci.2020.02.001>
24. Pan D, Liu G, Li B, et al. MicroRNA-1246 regulates proliferation, invasion, and differentiation in human vascular smooth muscle cells by targeting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2021;473:231-240. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02498-8>
25. Hooten NN, Fitzpatrick M, Wood WH, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging*. 2013;5(10):725-740. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.100603>
26. Lin FY, Tsai YT, Huang CY, et al. GroEL of *Porphyromonas gingivalis*-induced microRNAs accelerate tumor neovascularization by downregulating thrombomodulin expression in endothelial progenitor cells. *Molecular Oral Microbiology*. 2023;39(2):47-61. DOI: <https://doi.org/10.1111/omi.12415>
27. Wang YQ, Xu XM, Wang XL, et al. LncRNA FOXC2-AS1 regulated proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell through targeting miR-1253/FOXF1 axis in atherosclerosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020;24:3302-3314. DOI: [https://doi.org/10.26355/eurev\\_202003\\_20698](https://doi.org/10.26355/eurev_202003_20698)
28. Xu X, Li H. Integrated microRNA-gene analysis of coronary artery disease based on miRNA and gene expression profiles. *Molecular Medicine Reports*. 2016;13(4):3063-3073. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4936>
29. Tan KS, Armugam A, Sreparamaniam S, et al. Expression profile of microRNAs in young stroke patients. *PLoS ONE*. 2009;4:e7689. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007689>
30. Wen Y, Chun Y, Lian ZQ, et al. circRNA-0006896-miR1264-DNMT1 axis plays an important role in carotid plaque destabilization by regulating the behavior of endothelial cells in atherosclerosis. *Molecular Medicine Reports*. 2021;23(5):311. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11950>
31. Long R, Gao L, Li Y, et al. M2 macrophage-derived exosomes carry miR-1271-5p to alleviate cardiac injury in acute myocardial infarction through down-regulating SOX6. *Molecular Immunology*. 2021;136:26-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.05.006>
32. Wang R, Dong LD, Meng XB, et al. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;464(2):574-579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.010>
33. Ma W, Wei D, Li X, et al. CircPCNX Promotes PDGF-BB-Induced Proliferation and Migration of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells Through Regulating miR-1278/DNMT1 Axis. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2023;37:877-889. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10557-022-07342-y>

34. Niu M, Li H, Li X, et al. Circulating Exosomal miRNAs as Novel Biomarkers Perform Superior Diagnostic Efficiency Compared With Plasma miRNAs for Large-Artery Atherosclerosis Stroke. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:791644. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.791644>
35. Xu D, Liu T, He L, et al. LncRNA *MEG3* inhibits HMEC-1 cells growth, migration and tube formation via sponging miR-147. *Biological Chemistry*. 2020;401(5):601-615. DOI: <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0230>
36. Chen F, Ye X, Jiang H, et al. MicroRNA-151 Attenuates Apoptosis of Endothelial Cells Induced by Oxidized Low-density Lipoprotein by Targeting Interleukin-17A (IL-17A). *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2021;14:400-408. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10065-w>
37. Zhao L, Wang B, Sun L, et al. Association of miR-192-5p with Atherosclerosis and its Effect on Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Molecular Biotechnology*. 2021;63:1244-1251. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00376-x>
38. Zhang Y, Wang H, Xia Y. The expression of miR-211-5p in atherosclerosis and its influence on diagnosis and prognosis. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2021;21:371. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02187-z>
39. Miller CL, Haas U, Diaz R, et al. Coronary heart disease-associated variation in TCF21 disrupts a miR-224 binding site and miRNA-mediated regulation. *PLoS Genetics*. 2014;10:e1004263. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004263>
40. Liu J, Liu Y, Sun YN, et al. miR-28-5p Involved in LXR-ABCA1 Pathway is Increased in the Plasma of Unstable Angina Patients. *Heart, Lung and Circulation*. 2015;24(7):724-730. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.12.160>
41. Arora M, Kaul D, Sharma YP. Human coronary heart disease: importance of blood cellular miR-2909 RNomics. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014;392:49-63. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2017-3>
42. Liu D, Sun X, Ye P. miR-31 Overexpression Exacerbates Atherosclerosis by Targeting NOX4 in apoE(-/-) Mice. *Clinical Laboratory*. 2015;61(11):1617-1624. DOI: <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2015.150322>
43. Hildebrandt A, Kirchner B, Meidert AS, et al. Detection of Atherosclerosis by Small RNA-Sequencing Analysis of Extracellular Vesicle Enriched Serum Samples. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:729061. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.729061>
44. Lu X, Yang B, Yang H, et al. MicroRNA-320b Modulates Cholesterol Efflux and Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2022;29(2):200-220. Chinese. DOI: <https://doi.org/10.5551/jat.57125>
45. Pu Y, Zhao Q, Men X, et al. MicroRNA-325 facilitates atherosclerosis progression by mediating the SREBF1/LXR axis via KDM1A. *Life Sciences*. 2021;277:119464. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119464>
46. Wang L, Zheng Z, Feng X, et al. circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA Network in Oxidized, Low-Density, Lipoprotein-Induced Foam Cells. *DNA and Cell Biology*. 2019;38:1499-1511. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4865>
47. Schiano C, Benincasa G, Franzese M, et al. Epigenetic-sensitive pathways in personalized therapy of major cardiovascular diseases. *Pharmacology and Therapeutics*. 2020;210:107514. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107514>
48. Ahmadi R, Heidarian E, Fadaei R, et al. miR-342-5p Expression Levels in Coronary Artery Disease Patients and its Association with Inflammatory Cytokines. *Clinical Laboratory*. 2018;64:603-609. DOI: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.171208>
49. Fan JL, Zhang L, Bo XH. MiR-126 on mice with coronary artery disease by targeting S1PR2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020;24:893-904. DOI: [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202001\\_20074](https://doi.org/10.26355/eurrev_202001_20074)
50. Wang W, Ma F, Zhang H. MicroRNA-374 is a potential diagnostic biomarker for atherosclerosis and regulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 2020;10(4):687-694. DOI: <https://doi.org/10.21037/cdt-20-444>
51. Shao D, Lian Z, Di Y, et al. Dietary compounds have potential in controlling atherosclerosis by modulating macrophage cholesterol metabolism and inflammation via miRNA. *Npj Science of Food*. 2018;2:13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0022-8>
52. Wang B, Zhong Y, Huang D, et al. Macrophage autophagy regulated by miR-384-5p-mediated control of Beclin-1 plays a role in the development of atherosclerosis. *American Journal of Translational Research*. 2016;8(2):606-614.

53. Yang J, Liu H, Cao Q, et al. Characteristics of *CXCL2* expression in coronary atherosclerosis and negative regulation by microRNA-421. *Journal of International Medical Research*. 2020;48:300060519896150. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300060519896150>
54. He Z, Xue H, Liu P, et al. miR-4286/TGF- $\beta$ 1/Smad3-Negative Feedback Loop Ameliorated Vascular Endothelial Cell Damage by Attenuating Apoptosis and Inflammatory Response. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2020;75(5):446-454. DOI: <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000813>
55. Wang X, Li H, Zhang Y, et al. Suppression of miR-4463 promotes phenotypic switching in VSMCs treated with Ox-LDL. *Cell and Tissue Research*. 2021;383:1155-1165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03338-y>
56. Liang X, Hu M, Yuan W, et al. MicroRNA-4487 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis by targeting RAS p21 protein activator 1. *Pathology - Research and Practice*. 2022;234:153903. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153903>
57. Ye F, Zhang J, Zhang Q, et al. Preliminary study on the mechanism of long noncoding RNA SENCRC regulating the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(12):9635-9643. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.29775>
58. Wang WL, Chen LJ, Wei SY, et al. Mechanoresponsive Smad5 Enhances MiR-487a Processing to Promote Vascular Endothelial Proliferation in Response to Disturbed Flow. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:647714. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.647714>
59. Rafiq M, Dandare A, Javed A, et al. Competing Endogenous RNA Regulatory Networks of hsa\_circ\_0126672 in Pathophysiology of Coronary Heart Disease. *Genes*. 2023;14(3):550. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14030550>
60. Liu Z, Yin X, Mai H, et al. *SCD* rs41290540 single-nucleotide polymorphism modifies miR-498 binding and is associated with a decreased risk of coronary artery disease. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2020;8(3):e1136. DOI: <https://doi.org/10.1002/mgg3.1136>
61. Wang J, Pei Y, Zhong Y, et al. Altered serum microRNAs as novel diagnostic biomarkers for atypical coronary artery disease. *PLoS ONE*. 2014;9:e107012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107012>
62. Karragiannis GS, Weile J, Bader GD, et al. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2013;13:4. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-4>
63. Salerno AG, van Solingen C, Scotti E, et al. LDL Receptor Pathway Regulation by miR-224 and miR-520d. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7:81. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00081>
64. Guo J, Xiang Q, Xin Y, et al. miR-544 promotes maturity and antioxidation of stem cell-derived endothelial like cells by regulating the YY1/TET2 signalling axis. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18:35. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0504-6>
65. Konwerski M, Gromadka A, Arendarczyk A, et al. Atherosclerosis Pathways are Activated in Pericoronary Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. *Journal of Inflammation Research*. 2021;14:5419-5431. DOI: <https://doi.org/10.2147/JIR.S326769>
66. Fang M, Zhou Q, Tu W, et al. ATF4 promotes brain vascular smooth muscle cells proliferation, invasion and migration by targeting miR-552-SKI axis. *PLoS ONE*. 2022;17:e0270880. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270880>
67. Zhao X, Yi Y, Meng C, et al. MiRNA-575 suppresses angiogenesis by targeting Rab5-MEK-ERK pathway in endothelial cells. *Bioscience Reports*. 2019;39:BSR20181218. DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20181218>
68. Zhang M, Zhu Y, Zhu J, et al. circ\_0086296 induced atherosclerotic lesions via the IFIT1/STAT1 feedback loop by sponging miR-576-3p. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2022;27:80. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00372-2>
69. Wang L, Li H, Zheng Z, et al. Hsa\_circ\_0031891 targets miR-579-3p to enhance HMGB1 expression and regulate PDGF-BB-induced human aortic vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and dedifferentiation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024;397(2):1093-1104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02663-7>
70. Kim TK, Jeon S, Park S, et al. 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 (OASL1) protects against atherosclerosis by maintaining endothelial

nitric oxide synthase mRNA stability. *Nature Communications*. 2022;13:6647. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34433-z>

71. Chen H, Song X, Wu Y, et al. Linc-OIP5 working as a ceRNA of miR-616 promotes PON1 expression in HUEVC cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2020;13(4):730-737.

72. Miao R, Qi C, Fu Y, et al. Silencing of circARHGAP12 inhibits the progression of atherosclerosis via miR-630/EZH2/TIMP2 signal axis. *Journal of Cellular Physiology*. 2022;237(1):1057-1069. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.30598>

73. Hou X, Dai H, Zheng Y. Circular RNA hsa\_circ\_0008896 accelerates atherosclerosis by promoting the proliferation, migration and invasion of vascular smooth muscle cells via hsa-miR-633/CDC20B (cell division cycle 20B) axis. *Bioengineered*. 2022;13:5987-5998. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2039467>

74. Zhang Z, Qin S, Wang R, et al. Circ\_0003575 knockdown alleviates ox-LDL-induced human aortic endothelial cell dysfunction in atherosclerosis by miR-637/TRAF6 axis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2023;85(2):173-187. DOI: <https://doi.org/10.3233/CH-231858>

75. Ma G, Bi S, Zhang P. Long non-coding RNA MIAT regulates ox-LDL-induced cell proliferation, migration and invasion by miR-641/STIM1 axis in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2021;21:248. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02048-9>

76. Huang R, Hu Z, Cao Y, et al. MiR-652-3p inhibition enhances endothelial repair and reduces atherosclerosis by promoting Cyclin D2 expression. *EBioMedicine*. 2019;40:685-694. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.032>

77. Yang Y, Li M, Liu Y, et al. The lncRNA Punisher Regulates Apoptosis and Mitochondrial Homeostasis of Vascular Smooth Muscle Cells via Targeting miR-664a-5p and OPA1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:5477024. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5477024>

78. Chen LJ, Chuang L, Huang YH, et al. MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress. *Circulation Research*. 2015;116(7):1157-1169. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.30598>

79. Karere GM, Glenn JP, Li G, et al. Potential miRNA biomarkers and therapeutic targets for early atherosclerotic lesions. *Scientific Reports*. 2023;13:3467. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29074-1>

80. Caparosa EM, Sedgewick AJ, Zenonos G, et al. Regional Molecular Signature of the Symptomatic Atherosclerotic Carotid Plaque. *Neurosurgery*. 2019;85(2):E284-E293. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuros/nyy470>

81. Marasa BS, Srikantan S, Martindale JL, et al. MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence. *Aging*. 2010;2(6):333-343. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.100159>

82. Dhahbi JM, Atamna H, Boffelli D, et al. Deep sequencing reveals novel microRNAs and regulation of microRNA expression during cell senescence. *PLoS ONE*. 2011;6:e20509. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020509>

83. Maes OC, Sarojini H, Wang E. Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;221(1):109-119. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.21834>

84. Tsukamoto H, Kouwaki T, Oshiumi H. Aging-Associated Extracellular Vesicles Contain Immune Regulatory microRNAs Alleviating Hyperinflammatory State and Immune Dysfunction in the Elderly. *iScience*. 2020;23:101520. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101520>

85. Smith-Vikos T, Liu Z, Parsons C. A serum miRNA profile of human longevity: findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Aging*. 2016;8(11):2971-2987. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.101106>

86. Francisco S, Martinho V, Ferreira M, et al. The Role of MicroRNAs in Proteostasis Decline and Protein Aggregation during Brain and Skeletal Muscle Aging. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):3232. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23063232>

87. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Kraemer A, et al. Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *Journal of Proteomics*. 2015;126:12-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.023>

88. Yu Y, Zhang X, Liu F, et al. A stress-induced miR-31-CLOCK-ERK pathway is a key driver and therapeutic target for skin aging. *Nature*

- Aging. 2021;1:795-809. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00094-8>
89. Dalmaso B, Hatse S, Brouwers B, et al. Age-related microRNAs in older breast cancer patients: biomarker potential and evolution during adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2018;18:1014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4920-6>
90. Zhao J, Li C, Qin T, et al. Mechanical overloading-induced miR-325-3p reduction promoted chondrocyte senescence and exacerbated facet joint degeneration. *Arthritis Research and Therapy*. 2023;25:54. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13075-023-03037-3>
91. Yang X, Tan J, Shen J, et al. Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles Target TLR4 via miRNA-326-3p to Regulate Skin Fibroblasts Senescence. *Journal of Immunology Research*. 2022;2022:3371982. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/3371982>
92. Liu Y, Lai P, Deng J, et al. Micro-RNA335-5p targeted inhibition of sKlotho and promoted oxidative stress-mediated aging of endothelial cells. *Biomarkers in Medicine*. 2019;13:457-466. DOI: <https://doi.org/10.2217/bmm-2018-0430>
93. Owczarż M, Polosak J, Domaszewska-Szostek A, et al. Age-related epigenetic drift deregulates SIRT6 expression and affects its downstream genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Epigenetics*. 2020;15(12):1336-1347. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1780081>
94. Proctor CJ, Goljanek-Whysall K. Using computer simulation models to investigate the most promising microRNAs to improve muscle regeneration during ageing. *Scientific Reports*. 2017;7:12314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12538-6>
95. Li X, Wu J, Zhang K, et al. miR-384-5p Targets *Gli2* and Negatively Regulates Age-Related Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2019;28(12):791-798. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0044>
96. Wang L, Si X, Chen S, et al. A comprehensive evaluation of skin aging-related circular RNA expression profiles. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(4):e23714. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.23714>
97. Li X, Song Y, Liu D, et al. MiR-495 Promotes Senescence of Mesenchymal Stem Cells by Targeting Bmi-1. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;42:780-796. DOI: <https://doi.org/10.1159/000478069>
98. Yu M, He X, Liu T, et al. lncRNA GPRC5D-AS1 as a ceRNA inhibits skeletal muscle aging by regulating miR-520d-5p. *Aging*. 2023;15(23):13980-13997. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.205279>
99. Breunig S, Wallner V, Kobler K, et al. The life in a gradient: calcium, the lncRNA SPRR2C and mir542/mir196a meet in the epidermis to regulate the aging process. *Aging*. 2021;13(15):19127-19144. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.203385>
100. Castanheira CIGD, Anderson JR, Fang Y, et al. Mouse microRNA signatures in joint ageing and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage Open*. 2021;3(4):100186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2021.100186>

## References

1. de Yebenes VG, Briones AM, Martos-Folgado I, et al. Aging-Associated miR-217 Aggravates Atherosclerosis and Promotes Cardiovascular Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2020;40(10):2408-2424. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314333>
2. Gorbunova V, Seluanov A, Mita P, et al. The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature*. 2021;596:43-53. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03542-y>
3. de Cecco M, Ito T, Petrashen AP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*. 2019;566(7742):73-78. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>
4. Russ E, Mikhailkevich N, Iordanskiy S. Expression of Human Endogenous Retrovirus Group K (HERV-K) HML-2 Correlates with Immune Activation of Macrophages and Type I Interferon Response. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(2):e0443822. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04438-22>
5. Laderoute MP. The paradigm of immunosenescence in atherosclerosis-cardiovascular disease (ASCVD). *Discovery Medicine*. 2020;29(156):41-51.
6. Matsuzawa A, Lee J, Nakagawa S, et al. HERV-Derived *Erypb1* Is Conserved in Simiiformes, Exhibiting Expression in Hematopoietic Cell Lineages Including Macrophages. *International Journal of Molecular*

- Sciences. 2021;22(9):4504. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22094504>
7. Mustafin RN, Khusnutdinova E. Perspective for studying the relationship of miRNAs with transposable elements. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023;45(4):3122-3145. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb45040204>
8. Rivera-Munoz P, Malivert L, Derdouch S, et al. DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 2007;37(S1):S71-S82. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200737396>
9. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*. 2016;351(6277):1083-1087. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5497>
10. Yang H, Sun Y, Li Q, et al. Diverse Epigenetic Regulations of Macrophages in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:868788. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.868788>
11. Mustafin RN. Prospects for the use of statins in antiviral therapy. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2023;25(1):56-67. Russian. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmac.2023.1.56-67>
12. Badarinarayan SS, Sauter D. Switching Sides: How Endogenous Retroviruses Protect Us from Viral Infections. *Journal of Virology*. 2021;95(12):e02299-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02299-20>
13. Mustafin RN, Khusnutdinova EK. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(6):742-749. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18699/10.18699/VJ17.30-o>
14. Menghini R, Stohr R, Federici M. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis. *Ageing Research Reviews*. 2014;17:68-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.005>
15. Lu Y, Thavarajah T, Gu W, et al. Impact of miRNA in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2018;38(9):e159-e170. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310227>
16. Chen C, Yan Y, Liu X. microRNA-612 is downregulated by platelet-derived growth factor-BB treatment and has inhibitory effects on vascular smooth muscle cell proliferation and migration via directly targeting AKT2. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;15(1):159-165. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5428>
17. Simion V, Zhou H, Haemming S, et al. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus. *Nature Communications*. 2020;11:6135. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19664-2>
18. Bai J, Liu J, Fu Z, et al. Silencing lncRNA AK136714 reduces endothelial cell damage and inhibits atherosclerosis. *Aging*. 2021;13(10):14159-14169. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.203031>
19. Chi JS, Li JZ, Jia JJ, et al. Long non-coding RNA ANRIL in gene regulation and its duality in atherosclerosis. *Current Medical Science*. 2017;37:816-822. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1812-y>
20. Vlachogiannis NI, Sachse M, Georgiopoulos G, et al. Adenosine-to-inosine Alu RNA editing controls the stability of the pro-inflammatory long noncoding RNA NEAT1 in atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2021;160:111-120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.07.005>
21. Ye ZM, Yang S, Xia Y, et al. lncRNA MIAT sponges miR-149-5p to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation. *Cell Death and Disease*. 2019;10:138. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1409-4>
22. Wei G, Qin S, Li W, et al. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2016;13(6):1155-1160. DOI: <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2511767>
23. Sorrentino TA, Duong P, Bouchareychas L, et al. Circulating exosomes from patients with peripheral artery disease influence vascular cell migration and contain distinct microRNA cargo. *JVS-Vascular Science*. 2020;1:28-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jvsc.2020.02.001>
24. Pan D, Liu G, Li B, et al. MicroRNA-1246 regulates proliferation, invasion, and differentiation in human vascular smooth muscle cells by targeting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2021;473:231-240. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02498-8>
25. Hooten NN, Fitzpatrick M, Wood WH, et al. Age-related changes in microRNA levels in

- serum. *Aging*. 2013;5(10):725-740. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.100603>
26. Lin FY, Tsai YT, Huang CY, et al. GroEL of *Porphyromonas gingivalis*-induced microRNAs accelerate tumor neovascularization by downregulating thrombomodulin expression in endothelial progenitor cells. *Molecular Oral Microbiology*. 2023;39(2):47-61. DOI: <https://doi.org/10.1111/omi.12415>
27. Wang YQ, Xu XM, Wang XL, et al. LncRNA FOXC2-AS1 regulated proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell through targeting miR-1253/FOXF1 axis in atherosclerosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020;24:3302-3314. DOI: [https://doi.org/10.26355/eurev\\_202003\\_20698](https://doi.org/10.26355/eurev_202003_20698)
28. Xu X, Li H. Integrated microRNA-gene analysis of coronary artery disease based on miRNA and gene expression profiles. *Molecular Medicine Reports*. 2016;13(4):3063-3073. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4936>
29. Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of microRNAs in young stroke patients. *PLoS ONE*. 2009;4:e7689. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007689>
30. Wen Y, Chun Y, Lian ZQ, et al. circRNA-0006896-miR1264-DNMT1 axis plays an important role in carotid plaque destabilization by regulating the behavior of endothelial cells in atherosclerosis. *Molecular Medicine Reports*. 2021;23(5):311. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11950>
31. Long R, Gao L, Li Y, et al. M2 macrophage-derived exosomes carry miR-1271-5p to alleviate cardiac injury in acute myocardial infarction through down-regulating SOX6. *Molecular Immunology*. 2021;136:26-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.05.006>
32. Wang R, Dong LD, Meng XB, et al. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;464(2):574-579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.010>
33. Ma W, Wei D, Li X, et al. CircPCNX Promotes PDGF-BB-Induced Proliferation and Migration of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells Through Regulating miR-1278/DNMT1 Axis. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2023;37:877-889. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10557-022-07342-y>
34. Niu M, Li H, Li X, et al. Circulating Exosomal miRNAs as Novel Biomarkers Perform Superior Diagnostic Efficiency Compared With Plasma miRNAs for Large-Artery Atherosclerosis Stroke. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:791644. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.791644>
35. Xu D, Liu T, He L, et al. LncRNA *MEG3* inhibits HMEC-1 cells growth, migration and tube formation via sponging miR-147. *Biological Chemistry*. 2020;401(5):601-615. DOI: <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0230>
36. Chen F, Ye X, Jiang H, et al. MicroRNA-151 Attenuates Apoptosis of Endothelial Cells Induced by Oxidized Low-density Lipoprotein by Targeting Interleukin-17A (IL-17A). *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2021;14:400-408. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10065-w>
37. Zhao L, Wang B, Sun L, et al. Association of miR-192-5p with Atherosclerosis and its Effect on Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Molecular Biotechnology*. 2021;63:1244-1251. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00376-x>
38. Zhang Y, Wang H, Xia Y. The expression of miR-211-5p in atherosclerosis and its influence on diagnosis and prognosis. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2021;21:371. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02187-z>
39. Miller CL, Haas U, Diaz R, et al. Coronary heart disease-associated variation in TCF21 disrupts a miR-224 binding site and miRNA-mediated regulation. *PLoS Genetics*. 2014;10:e1004263. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004263>
40. Liu J, Liu Y, Sun YN, et al. miR-28-5p Involved in LXR-ABCA1 Pathway is Increased in the Plasma of Unstable Angina Patients. *Heart, Lung and Circulation*. 2015;24(7):724-730. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.12.160>
41. Arora M, Kaul D, Sharma YP. Human coronary heart disease: importance of blood cellular miR-2909 RNomics. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014;392:49-63. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2017-3>
42. Liu D, Sun X, Ye P. miR-31 Overexpression Exacerbates Atherosclerosis by Targeting NOX4 in apoE(-/-) Mice. *Clinical Laboratory*. 2015;61(11):1617-1624. DOI: <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2015.150322>
43. Hildebrandt A, Kirchner B, Meidert AS, et al. Detection of Atherosclerosis by Small RNA-Sequencing Analysis of Extracellular Vesicle Enriched Serum Samples. *Frontiers in Cell and*

- Developmental Biology. 2021;9:729061. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.729061>
44. Lu X, Yang B, Yang H, et al. MicroRNA-320b Modulates Cholesterol Efflux and Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2022;29(2):200-220. Chinese. DOI: <https://doi.org/10.5551/jat.57125>
45. Pu Y, Zhao Q, Men X, et al. MicroRNA-325 facilitates atherosclerosis progression by mediating the SREBF1/LXR axis via KDM1A. *Life Sciences*. 2021;277:119464. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119464>
46. Wang L, Zheng Z, Feng X, et al. circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA Network in Oxidized, Low-Density, Lipoprotein-Induced Foam Cells. *DNA and Cell Biology*. 2019;38:1499-1511. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4865>
47. Schiano C, Benincasa G, Franzese M, et al. Epigenetic-sensitive pathways in personalized therapy of major cardiovascular diseases. *Pharmacology and Therapeutics*. 2020;210:107514. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107514>
48. Ahmadi R, Heidarian E, Fadaei R, et al. miR-342-5p Expression Levels in Coronary Artery Disease Patients and its Association with Inflammatory Cytokines. *Clinical Laboratory*. 2018;64:603-609. DOI: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.171208>
49. Fan JL, Zhang L, Bo XH. MiR-126 on mice with coronary artery disease by targeting S1PR2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020;24:893-904. DOI: [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202001\\_20074](https://doi.org/10.26355/eurrev_202001_20074)
50. Wang W, Ma F, Zhang H. MicroRNA-374 is a potential diagnostic biomarker for atherosclerosis and regulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 2020;10(4):687-694. DOI: <https://doi.org/10.21037/cdt-20-444>
51. Shao D, Lian Z, Di Y, et al. Dietary compounds have potential in controlling atherosclerosis by modulating macrophage cholesterol metabolism and inflammation via miRNA. *Npj Science of Food*. 2018;2:13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0022-8>
52. Wang B, Zhong Y, Huang D, et al. Macrophage autophagy regulated by miR-384-5p-mediated control of Beclin-1 plays a role in the development of atherosclerosis. *American Journal of Translational Research*. 2016;8(2):606-614.
53. Yang J, Liu H, Cao Q, et al. Characteristics of *CXCL2* expression in coronary atherosclerosis and negative regulation by microRNA-421. *Journal of International Medical Research*. 2020;48:300060519896150. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300060519896150>
54. He Z, Xue H, Liu P, et al. miR-4286/TGF- $\beta$ 1/Smad3-Negative Feedback Loop Ameliorated Vascular Endothelial Cell Damage by Attenuating Apoptosis and Inflammatory Response. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2020;75(5):446-454. DOI: <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000813>
55. Wang X, Li H, Zhang Y, et al. Suppression of miR-4463 promotes phenotypic switching in VSMCs treated with Ox-LDL. *Cell and Tissue Research*. 2021;383:1155-1165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03338-y>
56. Liang X, Hu M, Yuan W, et al. MicroRNA-4487 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis by targeting RAS p21 protein activator 1. *Pathology - Research and Practice*. 2022;234:153903. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153903>
57. Ye F, Zhang J, Zhang Q, et al. Preliminary study on the mechanism of long noncoding RNA SENCN regulating the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(12):9635-9643. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.29775>
58. Wang WL, Chen LJ, Wei SY, et al. Mechanoresponsive Smad5 Enhances MiR-487a Processing to Promote Vascular Endothelial Proliferation in Response to Disturbed Flow. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:647714. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.647714>
59. Rafiq M, Dandare A, Javed A, et al. Competing Endogenous RNA Regulatory Networks of hsa\_circ\_0126672 in Pathophysiology of Coronary Heart Disease. *Genes*. 2023;14(3):550. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14030550>
60. Liu Z, Yin X, Mai H, et al. *SCD* rs41290540 single-nucleotide polymorphism modifies miR-498 binding and is associated with a decreased risk of coronary artery disease. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2020;8(3):e1136. DOI: <https://doi.org/10.1002/mgg3.1136>
61. Wang J, Pei Y, Zhong Y, et al. Altered serum microRNAs as novel diagnostic biomarkers

- for atypical coronary artery disease. *PLoS ONE*. 2014;9:e107012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107012>
62. Karragiannis GS, Weile J, Bader GD, et al. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2013;13:4. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-4>
63. Salerno AG, van Solingen C, Scotti E, et al. LDL Receptor Pathway Regulation by miR-224 and miR-520d. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7:81. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00081>
64. Guo J, Xiang Q, Xin Y, et al. miR-544 promotes maturity and antioxidation of stem cell-derived endothelial like cells by regulating the YY1/TET2 signalling axis. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18:35. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0504-6>
65. Konwerski M, Gromadka A, Arendarczyk A, et al. Atherosclerosis Pathways are Activated in Pericoronary Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. *Journal of Inflammation Research*. 2021;14:5419-5431. DOI: <https://doi.org/10.2147/JIR.S326769>
66. Fang M, Zhou Q, Tu W, et al. ATF4 promotes brain vascular smooth muscle cells proliferation, invasion and migration by targeting miR-552-SKI axis. *PLoS ONE*. 2022;17:e0270880. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270880>
67. Zhao X, Yi Y, Meng C, et al. MiRNA-575 suppresses angiogenesis by targeting Rab5-MEK-ERK pathway in endothelial cells. *Bioscience Reports*. 2019;39:BSR20181218. DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20181218>
68. Zhang M, Zhu Y, Zhu J, et al. circ\_0086296 induced atherosclerotic lesions via the IFIT1/STAT1 feedback loop by sponging miR-576-3p. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2022;27:80. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00372-2>
69. Wang L, Li H, Zheng Z, et al. Hsa\_circ\_0031891 targets miR-579-3p to enhance HMGB1 expression and regulate PDGF-BB-induced human aortic vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and dedifferentiation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024;397(2):1093-1104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02663-7>
70. Kim TK, Jeon S, Park S, et al. 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 (OASL1) protects against atherosclerosis by maintaining endothelial nitric oxide synthase mRNA stability. *Nature Communications*. 2022;13:6647. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34433-z>
71. Chen H, Song X, Wu Y, et al. Linc-OIP5 working as a ceRNA of miR-616 promotes PON1 expression in HUEVC cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2020;13(4):730-737.
72. Miao R, Qi C, Fu Y, et al. Silencing of circARHGAP12 inhibits the progression of atherosclerosis via miR-630/EZH2/TIMP2 signal axis. *Journal of Cellular Physiology*. 2022;237(1):1057-1069. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.30598>
73. Hou X, Dai H, Zheng Y. Circular RNA hsa\_circ\_0008896 accelerates atherosclerosis by promoting the proliferation, migration and invasion of vascular smooth muscle cells via hsa-miR-633/CDC20B (cell division cycle 20B) axis. *Bioengineered*. 2022;13:5987-5998. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2039467>
74. Zhang Z, Qin S, Wang R, et al. Circ\_0003575 knockdown alleviates ox-LDL-induced human aortic endothelial cell dysfunction in atherosclerosis by miR-637/TRAF6 axis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2023;85(2):173-187. DOI: <https://doi.org/10.3233/CH-231858>
75. Ma G, Bi S, Zhang P. Long non-coding RNA MIAT regulates ox-LDL-induced cell proliferation, migration and invasion by miR-641/STIM1 axis in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2021;21:248. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02048-9>
76. Huang R, Hu Z, Cao Y, et al. MiR-652-3p inhibition enhances endothelial repair and reduces atherosclerosis by promoting Cyclin D2 expression. *EBioMedicine*. 2019;40:685-694. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.032>
77. Yang Y, Li M, Liu Y, et al. The lncRNA Punisher Regulates Apoptosis and Mitochondrial Homeostasis of Vascular Smooth Muscle Cells via Targeting miR-664a-5p and OPA1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:5477024. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5477024>
78. Chen LJ, Chuang L, Huang YH, et al. MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress. *Circulation Research*. 2015;116(7):1157-1169. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305987>

79. Karere GM, Glenn JP, Li G, et al. Potential miRNA biomarkers and therapeutic targets for early atherosclerotic lesions. *Scientific Reports*. 2023;13:3467. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29074-1>
80. Caparosa EM, Sedgewick AJ, Zenonos G, et al. Regional Molecular Signature of the Symptomatic Atherosclerotic Carotid Plaque. *Neurosurgery*. 2019;85(2):E284-E293. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuros/nyy470>
81. Marasa BS, Srikantan S, Martindale JL, et al. MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence. *Aging*. 2010;2(6):333-343. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.100159>
82. Dhahbi JM, Atamna H, Boffelli D, et al. Deep sequencing reveals novel microRNAs and regulation of microRNA expression during cell senescence. *PLoS ONE*. 2011;6:e20509. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020509>
83. Maes OC, Sarojini H, Wang E. Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;221(1):109-119. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.21834>
84. Tsukamoto H, Kouwaki T, Oshiumi H. Aging-Associated Extracellular Vesicles Contain Immune Regulatory microRNAs Alleviating Hyperinflammatory State and Immune Dysfunction in the Elderly. *iScience*. 2020;23:101520. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101520>
85. Smith-Vikos T, Liu Z, Parsons C. A serum miRNA profile of human longevity: findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Aging*. 2016;8(11):2971-2987. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.101106>
86. Francisco S, Martinho V, Ferreira M, et al. The Role of MicroRNAs in Proteostasis Decline and Protein Aggregation during Brain and Skeletal Muscle Aging. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):3232. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23063232>
87. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Kraemer A, et al. Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *Journal of Proteomics*. 2015;126:12-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.023>
88. Yu Y, Zhang X, Liu F, et al. A stress-induced miR-31-CLOCK-ERK pathway is a key driver and therapeutic target for skin aging. *Nature Aging*. 2021;1:795-809. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00094-8>
89. Dalmasso B, Hatse S, Brouwers B, et al. Age-related microRNAs in older breast cancer patients: biomarker potential and evolution during adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2018;18:1014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4920-6>
90. Zhao J, Li C, Qin T, et al. Mechanical overloading-induced miR-325-3p reduction promoted chondrocyte senescence and exacerbated facet joint degeneration. *Arthritis Research and Therapy*. 2023;25:54. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13075-023-03037-3>
91. Yang X, Tan J, Shen J, et al. Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles Target TLR4 via miRNA-326-3p to Regulate Skin Fibroblasts Senescence. *Journal of Immunology Research*. 2022;2022:3371982. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/3371982>
92. Liu Y, Lai P, Deng J, et al. MicroRNA335-5p targeted inhibition of sKlotho and promoted oxidative stress-mediated aging of endothelial cells. *Biomarkers in Medicine*. 2019;13:457-466. DOI: <https://doi.org/10.2217/bmm-2018-0430>
93. Owczarz M, Polosak J, Domaszewska-Szostek A, et al. Age-related epigenetic drift deregulates SIRT6 expression and affects its downstream genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Epigenetics*. 2020;15(12):1336-1347. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1780081>
94. Proctor CJ, Goljanek-Whysall K. Using computer simulation models to investigate the most promising microRNAs to improve muscle regeneration during ageing. *Scientific Reports*. 2017;7:12314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12538-6>
95. Li X, Wu J, Zhang K, et al. miR-384-5p Targets *Gli2* and Negatively Regulates Age-Related Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2019;28(12):791-798. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0044>
96. Wang L, Si X, Chen S, et al. A comprehensive evaluation of skin aging-related circular RNA expression profiles. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(4):e23714. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.23714>
97. Li X, Song Y, Liu D, et al. MiR-495 Promotes Senescence of Mesenchymal Stem Cells by Targeting Bmi-1. *Cellular Physiology and*

Biochemistry. 2017;42:780-796. DOI:  
<https://doi.org/10.1159/000478069>

98. Yu M, He X, Liu T, et al. lncRNA GPRC5D-AS1 as a ceRNA inhibits skeletal muscle aging by regulating miR-520d-5p. *Aging*. 2023;15(23):13980-13997. DOI:  
<https://doi.org/10.18632/aging.205279>

99. Breunig S, Wallner V, Kobler K, et al. The life in a gradient: calcium, the lncRNA SPRR2C and mir542/mir196a meet in the epidermis to regulate the aging process. *Aging*. 2021;13(15):19127-19144. DOI:  
<https://doi.org/10.18632/aging.203385>

100. Castanheira CIGD, Anderson JR, Fang Y, et al. Mouse microRNA signatures in joint ageing and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage Open*. 2021;3(4):100186. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2021.100186>

Статья поступила в редакцию 25 января 2024 г.  
Поступила после доработки 4 марта 2024 г.  
Принята к печати 2 апреля 2024 г.

Received 25 January 2024

Revised 4 March 2024

Accepted 2 April 2024

#### Информация об авторах

**Рустам Наилевич Мустафин**, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail:

[ruji79@mail.ru](mailto:ruji79@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-382X>.

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

#### Information about the authors

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

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



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-3

УДК 575.162

# Ассоциация полиморфного локуса rs4880 гена супероксиддисмутазы 2 (*SOD2*) с синдромом поликистозных яичников: мета-анализ

Р.М. Али<sup>1</sup> , С.В. Ломтева<sup>2</sup> , А.А. Александрова<sup>1</sup> , М.Н. Аммар<sup>1</sup> ,  
И.Г. Буланов<sup>1</sup> , Т.П. Шкурят<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет», ул. Большая Садовая, д. 105/42, г. Ростов-на-Дону, 344006, Российская Федерация

<sup>2</sup> Центр репродукции человека и ЭКО, ул. Бодрая, д. 90, г. Ростов-на-Дону, 344068, Российская Федерация

Автор для переписки: Р.М. Али (*rubam.ali@mail.ru*)

## Резюме

**Актуальность:** По данным ВОЗ примерно 8-13% женщин репродуктивного возраста страдают синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), при этом до 70% женщин во всем мире с СПКЯ остаются не диагностированными. СПКЯ является наиболее распространенной причиной ановуляции и основной причиной бесплодия. Для СПКЯ характерны окислительный стресс и снижение антиоксидантного статуса. Активность антиоксидантных ферментов генетически детерминирована и зависит от наличия полиморфных аллелей. Показано, что полиморфный вариант Ala16Val гена *SOD2* может приводить к истощению фермента и быть ассоциированным с риском развития СПКЯ. В литературе присутствуют противоречивые данные об ассоциации полиморфного локуса rs4880 гена *SOD2* с СПКЯ. **Цель исследования:** Исследовать ассоциацию полиморфного локуса Val16Ala гена митохондриальной супероксиддисмутазы (*SOD2*) с синдромом поликистоза яичников по протоколу проведения систематических обзоров и мета-анализов PRISMA в исследованиях «случай-контроль». **Материалы и методы** Проведен всесторонний поиск по электронным базам данных, включая PubMed, eLibrary, Science Direct, Google Scholar, EMBASE, Scopus и Кокрановскую библиотеку исследований, опубликованных до декабря 2022 года и посвященных поиску ассоциаций между полиморфизмом rs4880 в гене *SOD2* и СПКЯ. Поиск проводился по следующим ключевым словам: «Синдром поликистозных яичников» или «СПКЯ», «супероксиддисмутазы 2» или «SOD2» или «MnSOD», «полиморфизм» или «SNP» или «вариант» или «rs4880» или Ala16Val или C47T на английском, арабском и русском языках. Из 95 релевантных публикаций критериям соответствовали 6 подходящих исследований «случай-контроль» с 1606 случаями СПКЯ и 1333 контролями для включения в данный мета-анализ. Большинство отобранных исследований были проведены в Западной Азии. Мета-анализ проводился в соответствии с протоколом PRISMA и использованием Review Manager версии 5.4. **Результаты:** Показано, что наличие, по крайней мере, одной

копии T-аллеля в полиморфном локусе rs4880 у пациентов с СПКЯ увеличивает риск развития синдрома в трех генетических моделях: доминантной, аллельной и гетерозиготной. **Заключение:** Результаты мета-анализа демонстрируют, что полиморфизм rs4880 гена *SOD2* может быть фактором риска развития СПКЯ, и предполагается, что аллель Val может повышать риск развития СПКЯ.

**Ключевые слова:** мета-анализ; СПКЯ; rs4880; *SOD2*; Ala16Val; PRISMA; бесплодие

**Для цитирования:** Али РМ, Ломтева СВ, Александрова АА, и др. Ассоциация полиморфного локуса rs4880 гена супероксиддисмутазы 2 (*SOD2*) с синдромом поликистозных яичников: мета-анализ. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):57-74 DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-3

# Association of polymorphic locus rs4880 of superoxide dismutase 2 gene (*SOD2*) with Polycystic Ovary Syndrome: A meta-analysis

Ruba M. Ali<sup>1</sup> , Svetlana V. Lomteva<sup>2</sup> , Anzhela A. Alexandrova<sup>1</sup> ,  
Manar N. Ammar<sup>1</sup> , Igor G. Bulanov<sup>1</sup> , Tatyana P. Shkurat<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Southern Federal University,  
105/42 Bolshaya Sadovaya St., Rostov-on-Don, 344006, Russia

<sup>2</sup> Center for Human Reproduction and IVF,  
90 Bodraya St., Rostov-on-Don, 344068, Russia

Corresponding author: Ruba M. Ali (ruba.m.ali@mail.ru)

## Abstract

**Background:** According to WHO, approximately 8-13% of women of reproductive age suffer from polycystic ovary syndrome (PCOS), while up to 70% of women worldwide with PCOS remain undiagnosed. PCOS is the most common cause of anovulation and the main cause of infertility. PCOS is characterized by oxidative stress and a decrease in antioxidant status. The activity of antioxidant enzymes is genetically determined and depends on the presence of polymorphic alleles, and it has been shown that the polymorphic variant Ala16Val of the *SOD2* gene can lead to enzyme depletion and be associated with the risk of PCOS. There are contradictory data in the literature on the association of the polymorphic locus rs4880 of the *SOD2* gene with PCOS. **The aim of the study:** To investigate the association of the polymorphic locus Val16Ala of the mitochondrial superoxide dismutase (*SOD2*) gene with polycystic ovarian syndrome according to the PRISMA protocol of systematic reviews and meta-analyses in case-control studies. **Materials and methods:** A comprehensive search was conducted on electronic databases, including PubMed, eLibrary, Science Direct, Google Scholar, EMBASE, Scopus and the Cochrane Library of studies published before December 2022 and devoted to the search for associations between rs4880 polymorphism in the *SOD2* gene and PCOS. The search was conducted by the following keywords: "Polycystic ovary syndrome" or "PCOS", "superoxide dismutase 2" or "SOD2" or "MnSOD", "polymorphism" or "SNP" or "variant" or "rs4880" or Ala16Val or C47T in English, Arabic and Russian. Out of 95 relevant publications, 6 suitable case-control studies with 1,606 cases of PCOS and 1,333 controls

met the criteria for inclusion in this meta-analysis. Most of the selected studies were conducted in Western Asia. The meta-analysis was carried out in accordance with the PRISMA protocol and using Review Manager version 5.4. **Results:** It has been shown that the presence of at least one copy of the T-allele in the polymorphic locus rs4880 in patients with PCOS was shown to increase the risk of developing the syndrome in three genetic models: dominant, allelic and heterozygous. **Conclusion:** The results of the meta-analysis demonstrate that the rs4880 polymorphism of the *SOD2* gene may be a risk factor for the development of PCOS, and it is assumed that the Val allele may increase the risk of developing PCOS.

**Keywords:** meta-analysis; PCOS; rs4880; SOD2; Ala16Val; PRISMA; infertility

**For citation:** Ali RM, Lomteva SV, Alexandrova AA, et al. Association of polymorphic locus rs4880 of superoxide dismutase 2 gene (SOD2) with Polycystic Ovary Syndrome: A meta-analysis. Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):57-74. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-3

**Введение.** Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) – одно из самых распространенных патологических состояний среди женщин репродуктивного возраста: По данным ВОЗ примерно 8-13% женщин репродуктивного возраста страдают синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), при этом до 70% женщин во всем мире с СПКЯ остаются недиагностированными. СПКЯ является наиболее распространенной причиной ановуляции и основной причиной бесплодия [1, 2]. СПКЯ – хроническое системное заболевание со многими гетерогенными клиническими проявлениями, наиболее распространенными из которых являются гирсутизм, гиперандрогения, хронические нарушения менструального цикла или овуляции и морфология поликистозных яичников [3, 4]. Показано, что в 40% случаев СПКЯ приводит к бесплодию [5]. Это часто связано с метаболическими нарушениями, такими как дислипидемия [6], нарушение толерантности к глюкозе и резистентности к инсулину [7], что, в свою очередь, приводит к развитию ожирения, диабета 2 типа [8, 9], сердечно-сосудистым заболеваниям, раку эндометрия [10, 11] и метаболическим нарушениям [12], которые действуют синергически. Вариабельность клинических проявлений СПКЯ обуславливает наличие значительных трудностей при постановке диагноза.

Появляется все больше доказательств того, что в патогенезе участвуют хроническое воспаление и окислительный стресс [13, 14]. Недавно было обнаружено, что окислительный стресс и хроническое воспаление низкой степени активности сопровождаются снижением антиоксидантной способности у пациенток с СПКЯ [3, 15]. В то же время активные формы кислорода играют важную физиологическую роль в процессах женской репродукции, таких как оогенез, фолликулогенез, стероидогенез, эмбриональное развитие и беременность [16]. Избыточные уровни активных форм кислорода обладают достаточно разрушительным эффектом. Окислительный стресс изменяет овариальный стероидогенез в сторону увеличения выработки андрогенов, что приводит к атрезии фолликулов. Кроме того, это состояние сильно ассоциировано с хроническим воспалением. Таким образом, окислительный стресс может повлиять на созревание яйцеклеток и исход беременности [17]. СПКЯ имеет сложную этиологию, вызванную сочетанием генетических, эпигенетических факторов и факторов окружающей среды. Высокая интенсивность хронического воспаления и ассоциированная с ним повышенная интенсивность свободно-радикальных процессов влияют на развитие СПКЯ [13, 18, 19]. При изучении патогенеза СПКЯ

появляется все больше информации о повреждающем влиянии окислительного стресса на антиоксидантные свойства организма [20]. Биомаркеры окислительного стресса значительно повышены в сыворотке крови и фолликулярной жидкости, а общий уровень антиоксидантов в сыворотке крови снижен у женщин с СПКЯ, по сравнению со здоровыми женщинами [21, 22, 23]. Среди различных детерминант СПКЯ, ассоциированных с окислительным стрессом, важнейшая роль отводится генетическим факторам: полиморфизму генов, регулирующих окислительный стресс, и эпигенетической регуляции.

Супероксиддисмутаза 2 (SOD2) является митохондриальной изоформой SOD, или марганцевой SOD (MnSOD), которая является ведущим антиоксидантным ферментом в митохондриях и находится во всех клетках, потребляющих кислород. SOD2 детоксицирует супероксидные анион-радикалы ( $O_2^{\cdot-}$ ), превращая их в перекись водорода ( $H_2O_2$ ), которая затем восстанавливается каталазой (CAT) и глутатионпероксидазами (GPx) до воды [24]. По данным геномного браузера UCSC [25], структурная организация гена *SOD2* представлена пятью экзонами, расположенными на хромосоме 6q25.3. По данным проекта GTEx, экспрессия гена демонстрируется в 54 тканях человека. Суммарное медианное количество транскриптов на миллион пар оснований (TPM) – 3058. Наибольшее медианное значение отмечается в скелетной мышечной ткани – 496.1 TPM [26]. Было показано, что наличие полиморфизмов в гене *SOD2* ассоциировано с наличием ряда многофакторных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, диабет и его осложнения, ожирение, рак простаты и рак молочной железы [27-30]. SOD2 является важным ферментом, который играет центральную роль в ответе на окислительный стресс. Полиморфный

локус rs4880 (Ala16Val или C47T) гена *SOD2*, приводит к замене аланина на валин, что приводит к накоплению супероксида в митохондриальном матриксе и, соответственно, большей выраженности окислительных повреждений мтДНК [31]. Ранее ассоциация полиморфизма rs4880 гена *SOD2* с СПКЯ была изучена в различных популяциях мира [13, 24, 32-35], однако результаты остаются противоречивыми.

**Цель исследования.** Исследовать ассоциацию полиморфного локуса Val16Ala гена митохондриальной супероксиддисмутазы (*SOD2*) с синдромом поликистоза яичников по протоколу проведения систематических обзоров и мета-анализов PRISMA в исследованиях «случай-контроль».

#### **Материалы и методы исследования** *Стратегия поиска исследований*

В течение декабря 2022 года мы систематически проводили всесторонний поиск по электронным базам данных, включая PubMed, eLibrary, Science Direct, Google Scholar, EMBASE, Scopus и Кокрановскую библиотеку исследований, выявив значимые ассоциации между полиморфизмом rs4880 в гене *SOD2* и СПКЯ. Поиск проводился по следующим ключевым словам: "Синдром поликистозных яичников" или "СПКЯ", "супероксиддисмутаза 2" или "SOD2" или "MnSOD", "полиморфизм" или "SNP" или "вариант" или "rs4880" или Ala16Val или C47T на английском, арабском и русском языках. Также был проведен ручной поиск в списке литературы для выявления других потенциальных публикаций. Данный систематический обзор был проведен в соответствии с основными требованиями к систематическим обзорам и мета-анализам PRISMA [36].

#### *Критерии включения и исключения*

Отбор работ для мета-анализа проводился в соответствии со следующими критериями: (i) исследования с дизайном «случай-контроль»; (ii) исследования, в

которых оценивалась ассоциация локуса rs4880 (Ala16Val или C47T) гена *SOD2* с СПКЯ; (iii) оригинальные исследования с генотипическими данными для расчета отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ). Критерии исключения: (i) исследования, в которых не рассматривалась ассоциация rs4880 с СПКЯ; (ii) повторяющиеся публикации; (iii) рефераты, мета-анализы или обзорные статьи;

#### *Отбор исследований*

Извлечение данных из оригинальных публикаций и их методологическая оценка были проведены тремя исследователями независимо друг от друга. Для каждого исследования были определены следующие основные характеристики: (i) имя первого автора; (ii) год публикации; (iii) место проведения исследования; (iv) количество участников в экспериментальной и контрольной группах; (v) методы генотипирования; (vi) генотипические и аллельные распределения (Табл. 1).

#### *Статистический анализ*

Для каждого исследования в контрольных группах соблюдалось уравнение Харди–Вайнберга (HWE). Для проведения мета-анализа использовали программное обеспечение Review Manager версии 5.4 [37]. Величина ассоциации между полиморфизмом rs4880 гена *SOD2* и риском СПКЯ оценивалась с использованием критерия отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ). Изучалась общая ассоциация в рамках доминантной модели

(СС + СТ против ТТ), рецессивной модели (ТТ против ТС + СС), аллельной модели (С против Т), гомозиготной модели (СС против ТТ) и гетерозиготной модели (СТ против ТТ). Важность комбинированного ОШ оценивалась с использованием Z-значений, а р-значение <0,05 было установлено статистически значимым.

Статистическая неоднородность между исследованиями оценивалась с помощью Q-критерия на основе хи-квадрат и статистики  $I^2$ . Если  $I^2$  превышал 50%, неоднородность считалась высокой, и для объединения ОШ использовалась модель случайного эффекта. В противном случае, если  $I^2$  составлял менее 50%, использовалась модель с фиксированным эффектом.

#### **Результаты**

##### *Характеристика включенных исследований*

В результате поиска литературы было отобрано в общей сложности 95 релевантных публикаций. После исключения повторяющихся и нерелевантных публикаций, в мета-анализ были включены 6 оригинальных работ, исследующих ассоциацию rs4880 гена *SOD2* с СПКЯ (Рис. 1). Большинство отобранных исследований было проведено на популяциях, проживающих в Турции, Иране, Саудовской Аравии [32-35]. Две работы были проведены на китайской и словенской популяциях [13, 24]. Отобранные исследования и их основные характеристики представлены в таблице 1.

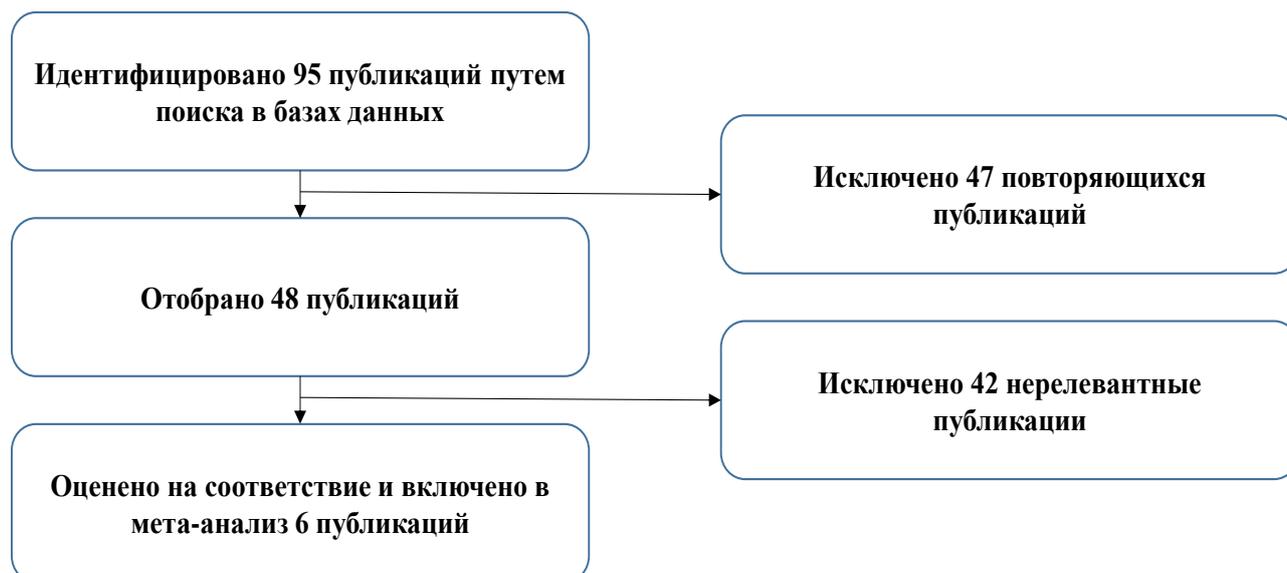


Рис. 1. Блок-схема отбора публикаций для мета-анализа  
Fig. 1. Block diagram of the selection of publications for meta-analysis

Таблица 1

Характеристика опубликованных исследований, включенных в мета-анализ

Table 1

Characteristics of published studies included in the meta-analysis

Первый автор, год	Страна	Размер выборки (n)		Метод генотипирования	Генотип					
		СПКЯ	Контроль		СПКЯ			Контроль		
					ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ	СС
Alkhuriji, 2021	Саудовская Аравия	99	98	ПЦР-РВ TaqMan	7	60	32	10	42	46
Arslan, 2019	Турция	100	100	ПДРФ	36	45	19	44	39	17
Herman, 2020	Словения	168	82	ПЦР-РВ TaqMan	42	91	35	18	37	27
Liu, 2019	Китай	932	745	ПДРФ	687	22 3	22	589	14 7	9
Polat, 2020	Турция	132	133	ПДРФ	63	51	18	44	74	15
Salahshoor, 2018	Иран	175	175	ПДРФ	36	80	59	30	75	70

Результат мета-анализа

Данный мета-анализ был основан на 6 исследованиях, посвященных поиску ассоциаций полиморфного локуса rs4880 гена *SOD2* с СПКЯ, которые были опубликованы в период с 2018 по 2021 год. В общей сложности 1606 случая и 1333 контрольных исследований были оценены для поиска ассоциации между полиморфизмом rs4880 гена *SOD2* и СПКЯ. Аллель Т рассматривался как аллель риска. Мета-анализ продемонстрировал, что отсутствует статистически значимая ассоциация, как показано на рисунках 2, 3, 4, 5, 6 и таблице 2. Однако, за исключением

исследования [24], которое проводилось на китайской популяции, результаты показали значимую ассоциацию с СПКЯ при трех генетических моделях: доминантной, аллельной и гетерозиготной ( $p = 0,03$ , ОШ = 1,34, 95% ДИ 0,85 – 2,03;  $p = 0,03$ , ОШ = 1,19, 95% ДИ 1,01 – 1,40;  $p = 0,04$ , ОШ = 1,33, 95% ДИ 0,79 – 1,75), соответственно (Рис. 2, 3, 4; Табл. 2). Не было выявлено значимой связи между rs4880 и риском СПКЯ с использованием рецессивной и гомозиготной моделей ( $p = 0,24$ , OR = 1,17, 95% ДИ 0,90–1,53;  $p = 0,22$ , ОШ = 1,23, 95% ДИ 0,88–1,73), соответственно (Рис. 5, 6; Табл. 2).

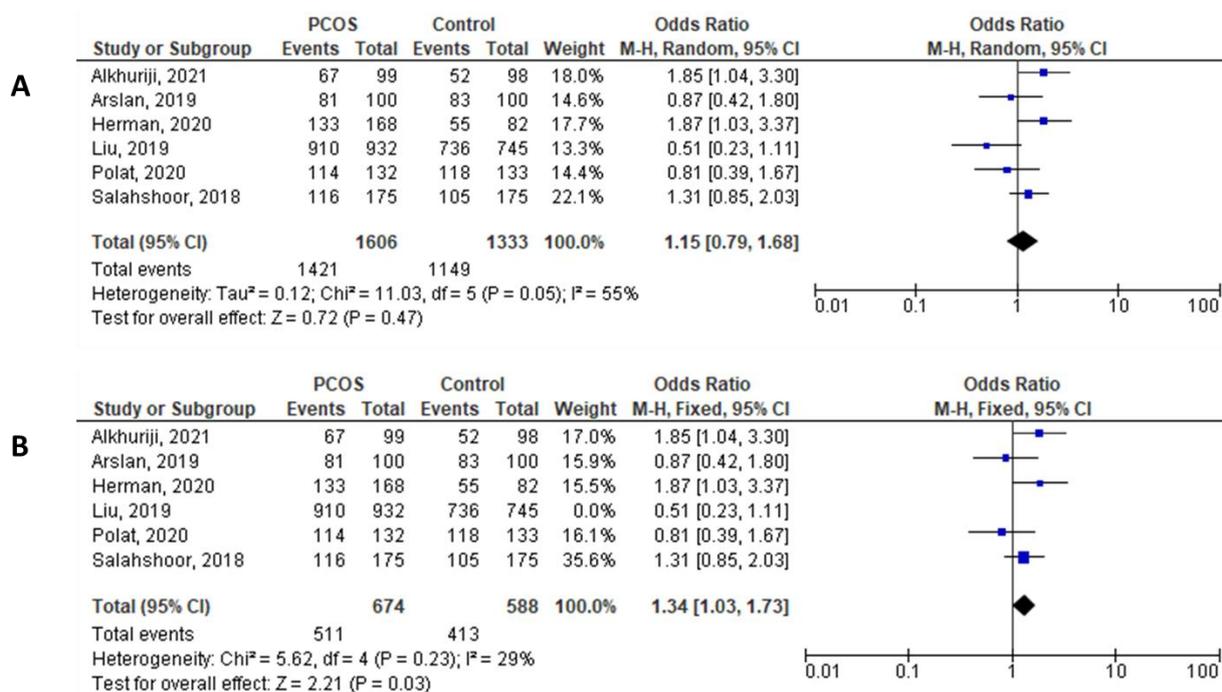


Рис. 2. Форест-график: ассоциация полиморфизма rs4880 с риском СПКЯ для доминантной модели (CC + CT против TT). А, В: с исследованием Liu и без него, соответственно  
Fig. 2. Forest plot: the association of rs4880 polymorphism with PCOS risk for the dominant model (CC + CT vs. TT). A, B: with and without Liu's study, respectively

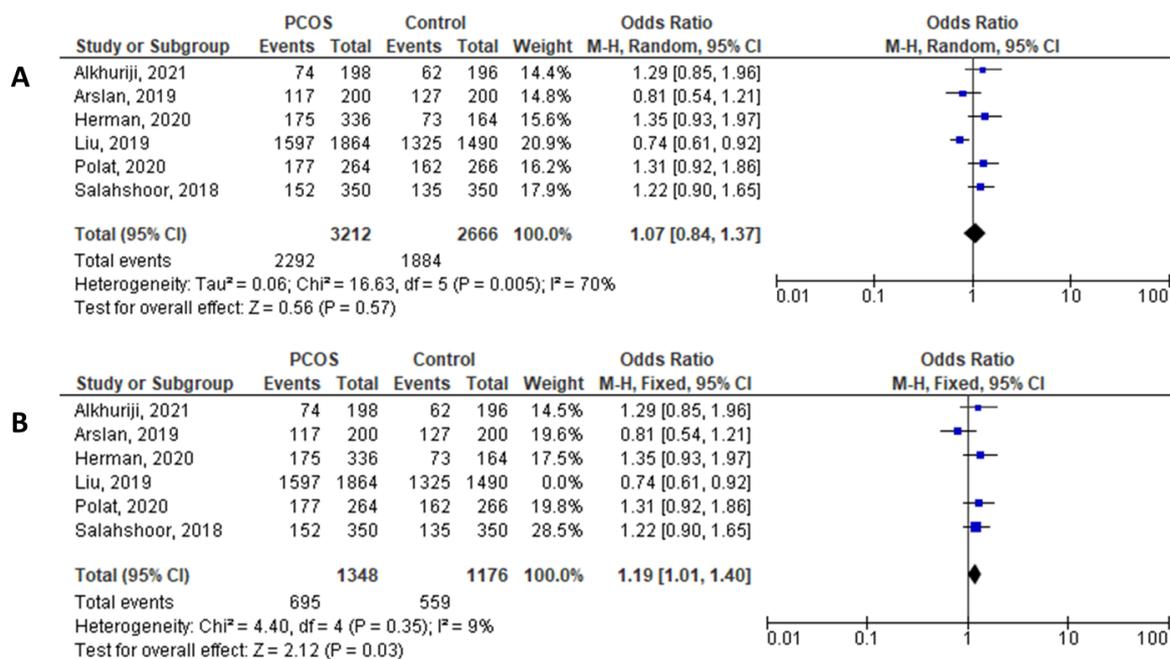


Рис. 3. Форест-график: ассоциация полиморфизма rs4880 с риском СПКЯ для аллельной модели (C против T). А, В: с исследованием Liu и без него, соответственно  
Fig. 3. Forest plot: the association of rs4880 polymorphism with PCOS risk for the allelic model (C vs. T). A, B: with and without Liu's study, respectively

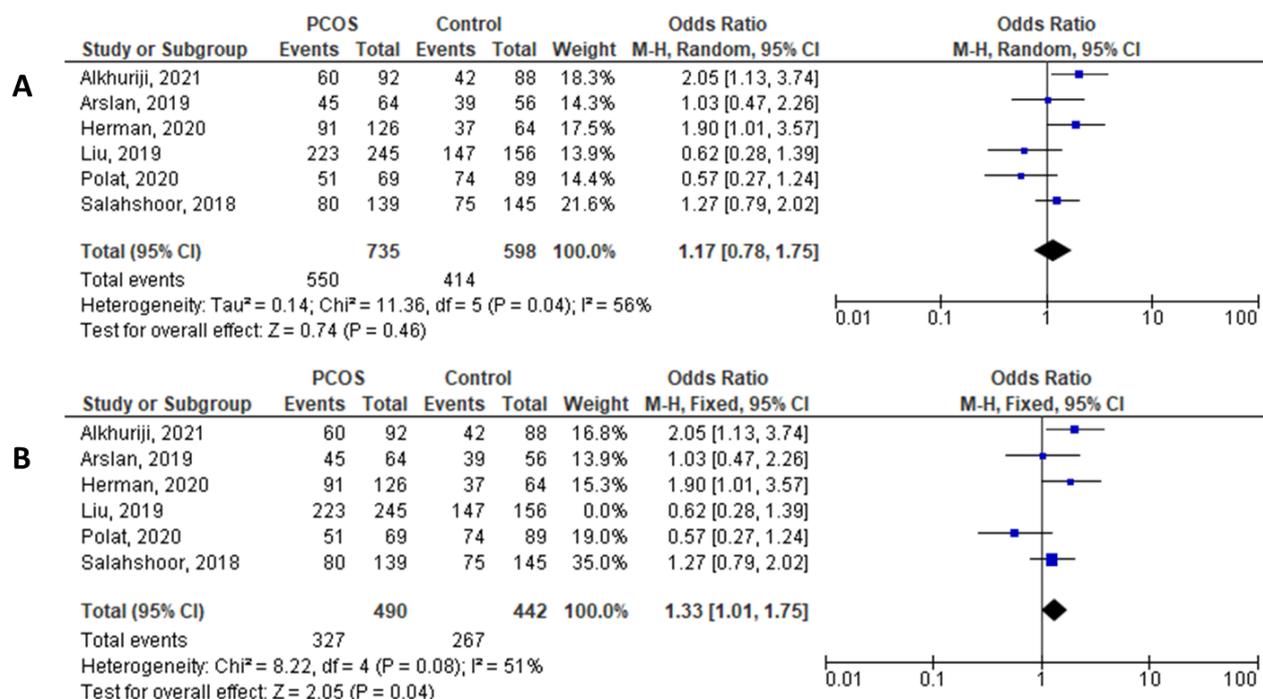


Рис. 4. Форест-график: ассоциация полиморфизма rs4880 с риском СПКЯ для гетерозиготной модели (СТ против ТТ). А, В: с исследованием Liu и без него, соответственно

Fig. 4. Forest plot: the association of rs4880 polymorphism with PCOS risk for the heterozygous model (CT vs. TT). A, B: with and without Liu's study, respectively

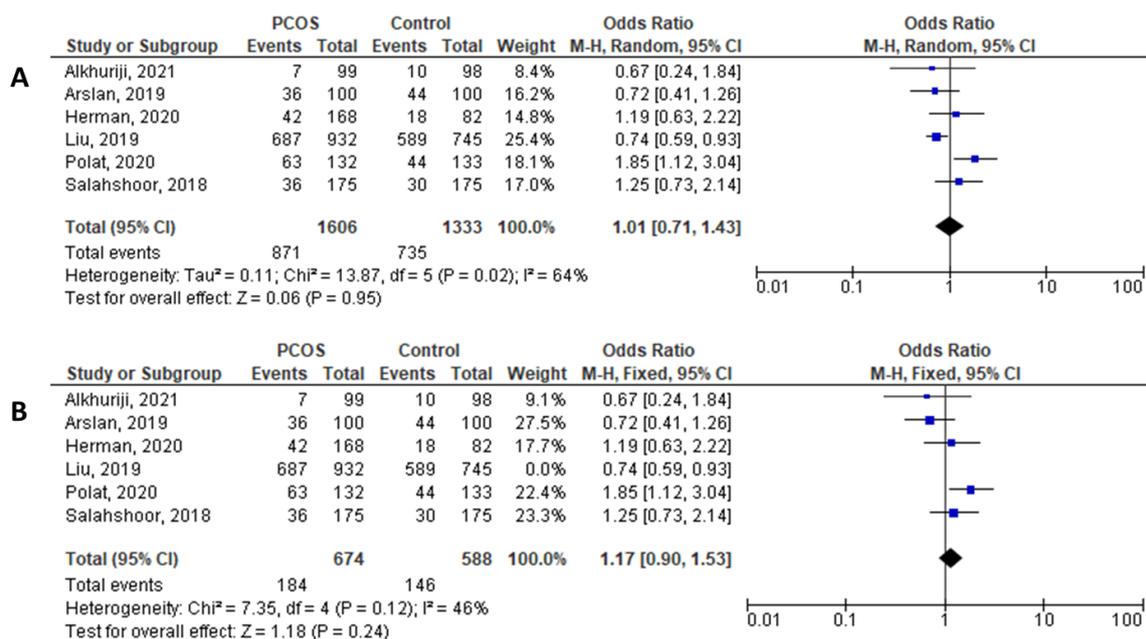


Рис. 5. Форест-график: ассоциация полиморфизма rs4880 с риском СПКЯ для рецессивной модели (СС против ТС + ТТ). А, В: с исследованием Liu и без него, соответственно

Fig. 5. Forest plot: the association of rs4880 polymorphism with PCOS risk for the recessive model (CC vs. TC + TT). A, B: with and without Liu's study, respectively

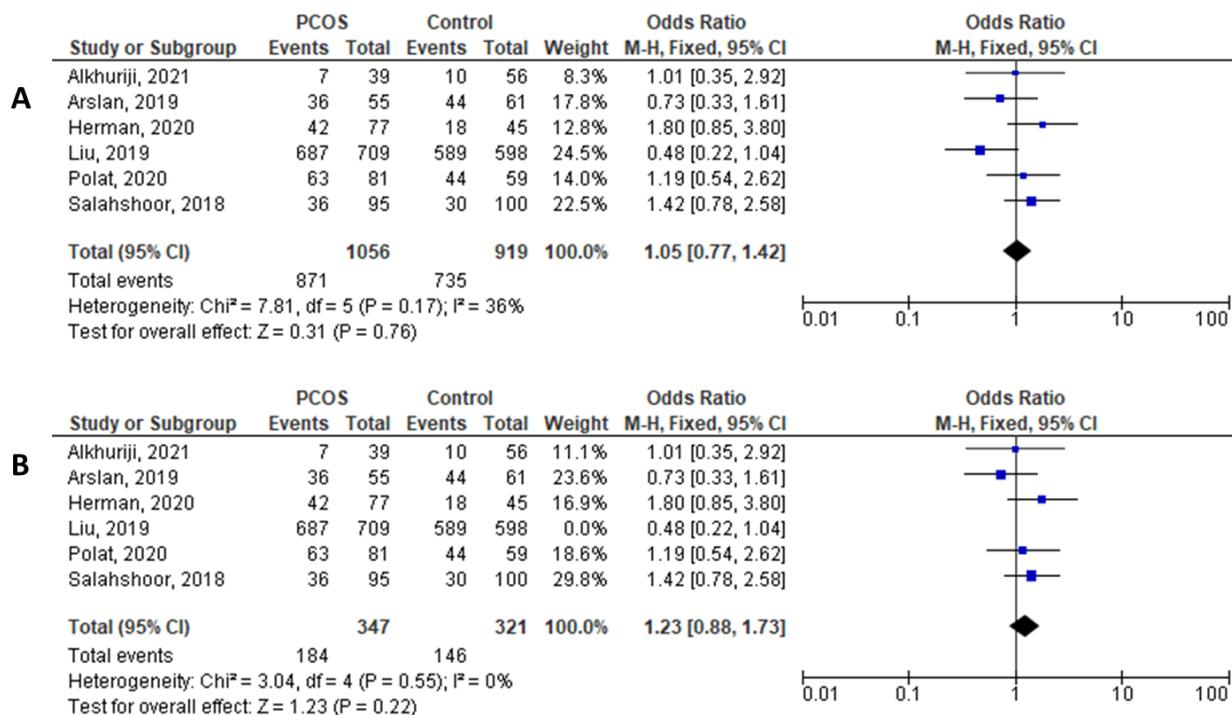


Рис. 6. Форест-график: ассоциация полиморфизма rs4880 с риском СПКЯ для гомозиготной модели (CC против TT). А, В: с исследованием Liu и без него, соответственно  
Fig. 6. Forest plot: the association of rs4880 polymorphism with PCOS risk for the homozygous model (CC vs. TT), A, B: with and without Liu's study, respectively

Таблица 2

Результаты мета-анализа для различных генетических моделей

Table 2

Meta-analysis results for various genetic models

Модель	Учитывая данные Liu, 2019			Без учёта данных Liu, 2019		
	ОШ	95% ДИ	p	ОШ	95% ДИ	p
Доминантная	1,15	[0,79, 1,68]	0,47	1,34	[0,85, 2,03]	0,03
Рецессивная	1,01	[0,71, 1,43]	0,95	1,17	[0,90, 1,53]	0,24
Аллельная	1,07	[0,84, 1,37]	0,57	1,19	[1,01, 1,40]	0,03
Гетерозиготная	1,17	[0,78, 1,75]	0,46	1,33	[0,79, 1,75]	0,04
Гомозиготная	1,05	[0,77, 1,42]	0,76	1,23	[0,88, 1,73]	0,22

Предвзятость публикаций

Систематическая ошибка публикации оценивалась с помощью воронкообразных диаграмм (Рис. 7). Они не

показали явной асимметрии, и это указывает на отсутствие предвзятости публикаций, отобранных для данного мета-анализа.

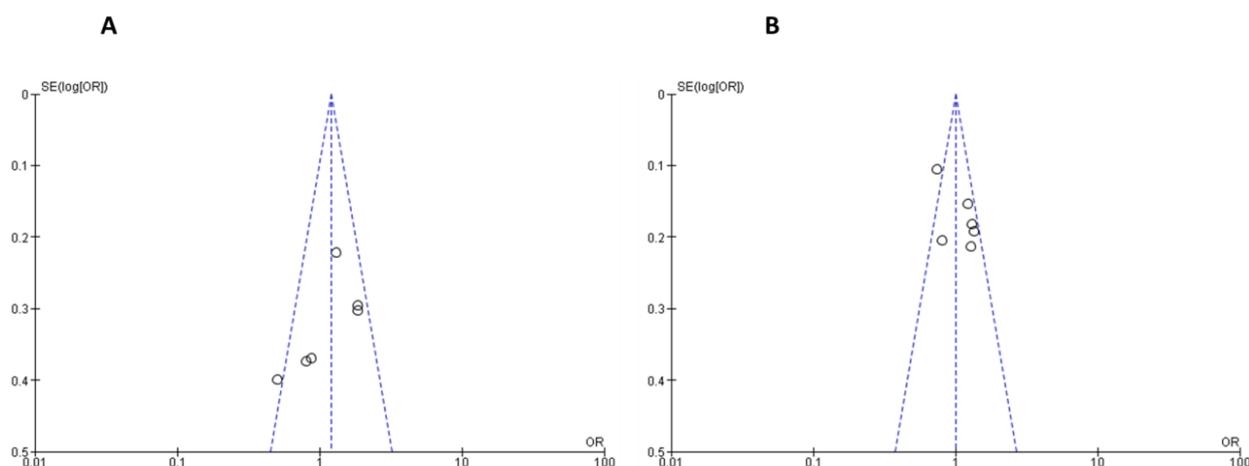


Рис. 7. Схема воронкообразных графиков для поиска ошибки публикации.

А) Доминантная модель, В) Аллельная модель.

Fig. 7. Funnel plot for finding a publication bias. A) Dominant model, B) Allelic model.

**Обсуждение.** Полиморфный локус *Ala9Val* (47C>T) гена *SOD2* изменяет последовательность, кодирующую сигнальный N-концевой пептид MTS (Matrix Targeting Signal), который направляет фермент в матрикс митохондрий. Установлено, что *SOD2*, содержащий Ala в сигнальном пептиде, на 30-40% эффективнее транспортируется в митохондрии, что способствует большей активности фермента. Val-вариант *SOD2* обладает меньшей активностью, что обуславливает повышенную продукцию супероксида и других АФК [38].

Распространенность данного полиморфизма значительно варьирует в разных этнических группах. Референсным аллелем является аллель А со средней частотой встречаемости 59% во всех популяциях мира [39]. Однако, у китайских женщин он регистрировался в 89% в контрольной группе, и в 85,7% в группе пациенток с СПКЯ [24]. Мы исключили исследование, проведенное Liu на китайской популяции [24], из-за генетической вариации, которая внесла бы повышенную гетерогенность в данный мета-анализ. Согласно данным 1000 Genome Browser, частота полиморфизма rs4880 гена *SOD2* значительно варьирует между популяциями Восточной Азии (12%) и другими популяциями, в том числе Южной и Западной Азии, Европы, Африки

и Америки, где она составляет от 41% до 58%. Такое различие в частоте аллелей наблюдалось в исследованиях, включенных в данный мета-анализ. Включение исследований из различных популяций со значительно отличающимися частотами аллелей может привести к появлению дополнительной варибельности, что потенциально может привести к необъективным или противоречивым результатам. Мы не включили исследование Liu в данный мета-анализ для сохранения сопоставимости и минимизации неоднородности данных. Проведенный мета-анализ показал снижение гетерогенности и выявил значительную ассоциацию между rs4880 гена *SOD2* и развитием СПКЯ в доминантной, аддитивной и гетерозиготной моделях. Эти результаты указывают на то, что наличие, по крайней мере, одной копии аллеля Т может быть фактором риска развития СПКЯ.

СПКЯ является наиболее распространенной эндокринопатией, многофакторность которой обусловлена генетическими, эпигенетическими факторами и факторами окружающей среды. Результаты современных исследований прояснили ключевую роль гиперандрогении и инсулинорезистентности в возникновении и прогрессировании СПКЯ [40].

Гиперандрогения и инсулинорезистентность запускают различные сигнальные пути и патологические процессы в организме, способствуя появлению сложного спектра симптомов и признаков, связанных с СПКЯ [11, 41]. При этом важно отметить, что гиперандрогения и инсулинорезистентность демонстрируют синергизм и циклическое взаимодействие. В то же время все большее внимание уделяется влиянию окислительного стресса и последующего хронического воспаления в яичниках пациенток с СПКЯ [15, 16, 42]. Окислительный стресс определяется как нарушение равновесия в системе прооксиданты↔антиоксиданты, сопровождающееся повышенной интенсивностью свободно-радикальных процессов, что приводит к повреждению биологических молекул и клеточных структур. Многочисленные исследования показали, что интенсивность свободно-радикальных процессов значительно повышена у женщин с СПКЯ [43, 44, 45]. Биомаркеры окислительного стресса значительно изменены в сыворотке крови и фолликулярной жидкости женщин с СПКЯ по сравнению с контрольной группой. Окислительный стресс вступает в цикл синергетического эффекта с гиперандрогенизмом и резистентностью к инсулину. Поскольку окислительный стресс может ухудшать основные признаки синдрома, он способен влиять на поглощение глюкозы в таких тканях, как мышцы и жировая ткань, снижая секрецию инсулина. Он также может стимулировать пролиферацию тека-клеток яичников и выработку андрогенов [42]. На структуру и функцию белков, задействованных в регуляции окислительного стресса, может оказывать значимое влияние генетический полиморфизм. Функциональные миссенс-полиморфизмы могут приводить к изменению заряда белковой молекулы, а также могут изменять активность антиоксидантных ферментов, и ферментов, участвующих в стероидогенезе, таких как CYP17A и др.

Митохондрии являются важной структурой, которая продуцирует активные формы кислорода, что способствует развитию окислительного стресса, поскольку дисфункция митохондрий и снижение их способности элиминировать АФК связаны с такими проявлениями СПКЯ, как ожирение, инсулинорезистентность, гиперандрогения, гиперинсулинемия, патологическое развитие фолликулов и хроническое воспаление низкой степени активности [46]. Окислительный стресс в этом состоянии может индуцировать воспалительную среду, которая стимулирует выработку андрогенов яичниками путем стимуляции пролиферации тека-клеток и усиления экспрессии стероидогенных ферментов, таких как CYP11A1, CYP17A1 и 3βHSD. Кроме того, окислительный стресс и провоспалительные цитокины повышают резистентность к инсулину и влияют на сигнальный путь инсулина, что приводит к гиперинсулинемии, стимулируя стероидогенез тека-клеток [6]. Таким образом, накопление АФК, следовательно, способствует нарушению регуляции яичниковых тека-клеток и приводит к гиперандрогении, ановуляции, метаболическим и сердечно-сосудистым последствиям.

SOD2 является основным ферментом в системах антиоксидантной защиты, ключевая роль которого заключается в детоксикации митохондриальных супероксидных анион-радикалов ( $O_2^-$ ) до перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и далее до  $H_2O$  с помощью каталазы (CAT) и глутатион пероксидазы (GPx). Полиморфный локус rs4880 (Ala16Val или C47T) в гене *SOD2* представляет собой однонуклеотидный полиморфизм, который участвует в замене цитозина на тимин (аланина на валин) в N-концевой митохондриальной последовательности-мишени Matrix Targeting Signal (MTS) [31]. Предполагается, что этот SNP снижает эффективность транспорта SOD2 в матрикс митохондрий из-за образования вторичной

$\beta$ -структуры вместо амфифильных макромолекул с  $\alpha$ -спиральной структурой, что приводит к снижению активности SOD на 30-40%. В последнее время в нескольких публикациях исследовали ассоциацию между rs4880 и риском СПКЯ [13, 24, 32-35]. Однако их результаты противоречивы. Аналогично нашим результатам, исследования, проведенные среди популяций Саудовской Аравии и Словении [13, 32], показали, что гомозигота по аллелю Ala чаще встречается у здоровых женщин, в то время как у женщин с СПКЯ значимо чаще регистрируется в генотипе один аллель Val. Среди турецких женщин с СПКЯ носители генотипа TT имеют повышенный риск развития синдрома в 2 раза. Этот полиморфный локус гена *SOD2* отрицательно ассоциирован с базальным уровнем глюкозы у носителей по крайней мере одной копии аллеля Val среди турецких и словенских пациенток. Однако этот результат противоречит исследованию Liu, которое показало, что высокий риск СПКЯ у китайских женщин связан с аллелем Ala. Этот факт также наблюдается в исследовании Murti и др., которые показали, что у пациенток с СПКЯ средняя активность *SOD2* увеличивается в сыворотке на 34%, а активность GPx-1 снижается на 32% по сравнению с контролем [22]. Таким образом, более высокий уровень АФК и активность *SOD2* при сниженной способности выводить эти высокотоксичные АФК с помощью GPx-1 или CAT приводила к накоплению  $H_2O_2$  и усилению окислительного стресса. В других исследованиях, проведенных на курдских и турецких популяциях, ассоциация между полиморфным локусом rs4880(Ala/Val) и СПКЯ отсутствует. В совокупности накопление высокотоксичных АФК как внутри, так и снаружи митохондрий, со сниженной способностью выводить их с помощью *SOD2* и других антиоксидантных ферментов приводит к окислительному стрессу у пациенток с СПКЯ. Таким образом, логично предположить, что rs4880 потенциально ответственен за развитие СПКЯ.

Это исследование имеет некоторые ограничения, которые следует учитывать. Во-первых, относительно ограниченный размер выборки снижал статистическую мощность. Большинство исследований, включенных в данный мета-анализ, были проведены на западноазиатских популяциях. Во-вторых, гетерогенность в общем анализе и анализе между исследованиями, использованном для различных генетических моделей, не была статистически значимой, что, возможно, повлияло на результаты. Наконец, СПКЯ является многофакторным заболеванием, и на ассоциацию полиморфизма rs4880 и СПКЯ может влиять взаимодействие с факторами окружающей среды или другими генами.

**Заключение.** Наши результаты показывают, что наличие в генотипе аллеля Val полиморфного локуса rs4880 гена *SOD2* в гетерозиготном или гомозиготном состоянии может быть фактором риска развития СПКЯ.

#### **Информация о финансировании**

*Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда № РНФ 23-15-00464.*

#### **Financial support**

*This study was funded by the Russian Science Foundation (RSF) grant № 23-15-00464.*

#### **Конфликт интересов**

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### **Conflict of interests**

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

#### **Список литературы**

1 WHO. Polycystic Ovary Syndrome: Key Facts [Internet]. 28 June 2023 [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/polycystic-ovary-syndrome#>

2 Шепелькевич АП, Мантачик МВ. Особенности ведения женщин с синдромом поликистозных яичников в клинической практике. Лечебное Дело: Научно-

практический Терапевтический Журнал. 2019;68(4):67-77.

3 Ganie MA, Vasudevan V, Wani IA, et al. Epidemiology, pathogenesis, genetics & management of polycystic ovary syndrome in India. *Indian Journal of Medical Research*. 2019;150(4):333-344. DOI: [https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR\\_1937\\_17](https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_1937_17)

4 Hong SH, Hong YS, Jeong K, et al. Relationship between the characteristic traits of polycystic ovary syndrome and susceptibility genes. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10479. DOI: <https://doi.org/10.1038/S41598-020-66633-2>

5 Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *Application of Clinical Genetics*. 2019;12(5):249-260. DOI: <https://doi.org/10.2147/TACG.S200341>

6 Perovic Blagojevic IM, Vekic JZ, Macut DP, et al. Overweight and obesity in polycystic ovary syndrome: association with inflammation, oxidative stress and dyslipidaemia. *The British journal of nutrition*. *British Journal of Nutrition*. 2022;128(4):604-612. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114521003585>

7 Xu Y, Qiao J. Association of Insulin Resistance and Elevated Androgen Levels with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): A Review of Literature. *Journal of Healthcare Engineering*. 2022;2022:9240569. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/9240569>

8 Chen W, Pang Y. Metabolic Syndrome and PCOS: Pathogenesis and the Role of Metabolites. *Metabolites*. 2021;11:869. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo11120869>

9 Li X, Xiao H, Ma Y, et al. Identifying novel genetic loci associated with polycystic ovary syndrome based on its shared genetic architecture with type 2 diabetes. *Frontiers in Genetics*. 2022;13(3):905716. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.905716>

10 Duică F, Dănilă CA, Boboc AE, et al. Impact of Increased Oxidative Stress on Cardiovascular Diseases in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12(1):614679. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.614679>

11 Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2020;30(7):399-404. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2019.08.010>

12 Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocrine Reviews*. 2016;37(5):467-520. DOI: <https://doi.org/10.1210/ER.2015-1104>

13 Herman R, Jensterle M, Janež A, et al. Genetic Variability in Antioxidative and Inflammatory Pathways Modifies the Risk for PCOS and Influences Metabolic Profile of the Syndrome. *Metabolites*. 2020;10(11):439. DOI: <https://doi.org/10.3390/METABO10110439>

14 Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:8589318. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/8589318>

15 Gharaei R, Mahdavinzhad F, Samadian E, et al. Antioxidant supplementations ameliorate PCOS complications: a review of RCTs and insights into the underlying mechanisms. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021;38(11):2817-2831. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02342-7>

16 Agarwal A, Tadros H, Tvrdá E. Role of oxidants and antioxidants in female reproduction. In: Armstrong D, Stratton RD, editors. *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease*. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118832431.ch16>

17 Terao H, Wada-Hiraike O, Nagumo A, et al. Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019;45(9):1884-1891. DOI: <https://doi.org/10.1111/JOG.14040>

18 Chen A, Zhao H, Wang J, et al. Haplotype Analysis of Candidate Genes Involved in Inflammation and Oxidative Stress and the Susceptibility to Preeclampsia. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020:4683798. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4683798>

19 Zhang J, Bao Y, Zhou X, et al. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17(1):67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0509-4>

20 Mohammadi M. Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review. *International Journal of Preventive Medicine*. 2019;10(1):86. DOI: [https://doi.org/10.4103/IJPVM.IJPVM\\_576\\_17](https://doi.org/10.4103/IJPVM.IJPVM_576_17)

- 21 Gongdashetti K, Gupta P, Dada R, et al. Follicular fluid oxidative stress biomarkers and ART outcomes in PCOS women undergoing in vitro fertilization: A cross-sectional study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2021;19(5):449-456. DOI: <https://doi.org/10.18502/IJRM.V19I5.9254>
- 22 Murri M, Luque-ramírez M, Insenser M, et al. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2013;19(3):268-288. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dms059>
- 23 Nuñez-Calonge R, Cortés S, Gutierrez Gonzalez LM, et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016;32(4):446-456. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.12.010>
- 24 Liu Q, Liu H, Bai H, et al. Association of SOD2 A16V and PON2 S311C polymorphisms with polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2019;42(8):909-921. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0999-5>
- 25 Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Research*. 2002;12(6):996-1006. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- 26 GTEx Portal: Bulk tissue gene expression for SOD2 [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 08]. Available from: <https://www.gtexportal.org/home/gene/ENSG00000112096>
- 27 Becer E, Çirakoğlu A. Association of the Ala16Val MnSOD gene polymorphism with plasma leptin levels and oxidative stress biomarkers in obese patients. *Gene*. 2015;568(1):35-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.009>
- 28 Kang SW. Superoxide dismutase 2 gene and cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(9):14647-14655.
- 29 Nikic P, Dragicevic D, Jerotic D, et al. Polymorphisms of Antioxidant Enzymes SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) Are Associated with Bladder Cancer Risk or Its Aggressiveness. *Medicina*. 2023;59(1):131. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina59010131>
- 30 Pourvali K, Abbasi M, Mottaghi A. Role of Superoxide Dismutase 2 Gene Ala16Val Polymorphism and Total Antioxidant Capacity in Diabetes and its Complications. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2016;8(2):48-56.
- 31 Первушина ОА, Баирова ТА, Колесникова ЛИ. Полиморфизм Ala16Val гена супероксиддисмутаза 2 (SOD2) у подростков-европеоидов с эссенциальной артериальной гипертензией, проживающих в Восточной Сибири. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014;(6):111-114.
- 32 Alkhuriji AF, Alomar SY, Babay ZA, et al. Association SOD2 and PON1 Gene Polymorphisms with Polycystic Ovary Syndrome in Saudi Women. *Molecular Syndromology*. 2021;13(2):117-122. DOI: <https://doi.org/10.1159/000519527>
- 33 Arslan AO, Celik F, Kucukhuseyin O, et al. Investigation of variants of critically important antioxidant enzyme genes in patients with polycystic ovary syndrome. *Experimental Biomedical Research*. 2019;2(1):8-19. DOI: <https://doi.org/10.30714/j-ebr.2019147578>
- 34 Polat S, Şimşek Y. Five variants of the superoxide dismutase genes in Turkish women with polycystic ovary syndrome. *Free Radical Research*. 2020;54(6):467-476. DOI: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1802022>
- 35 Salahshoor MR, Sohrabi M, Jalili F, et al. No evidence for a major effect of three common polymorphisms of the GPx1, MnSOD, and CAT genes on PCOS susceptibility. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;120(2):2362-2369. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.27564>
- 36 Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.b2535>
- 37 ReviewManager (RevMan) is Cochrane's bespoke software for writing Cochrane Reviews [Internet]. 2023 [cited 2023 Aug 08]. Available from: <https://training.cochrane.org/online-learning/core-software/revman>.
- 38 Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003;13(3):145-157. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.FPC.0000054067.6400.08F>
- 39 Variant: rs4880 – 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies [Internet]. 2015 [cited 2023 Aug 08]. Available from: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:159692340-](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:159692340-)

159693340;v=rs4880;vdb=variation;vf=167107369

40 Ding H, Zhang J, Zhang F, et al. Resistance to the Insulin and Elevated Level of Androgen: A Major Cause of Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12(20):741764. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.741764>

41 Malini NA, Roy GK. Influence of Insulin on LH, Testosterone and SHBG in various PCOS Categories based on the Mode of Secretion of LH in relation to FSH Levels. *Acta Endocrinologica*. 2021;17(3):313-318. DOI: <https://doi.org/10.4183/AEB.2021.313>

42 Mancini A, Bruno C, Vergani E, et al. Oxidative Stress and Low-Grade Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Controversies and New Insights. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(4):1667. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22041667>

43 Bannigida DM, Nayak BS, Vijayaraghavan R. Insulin resistance and oxidative marker in women with PCOS. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2020;126(2):183-186. DOI: <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1499120>

44 Ostadmohammadi V, Jamilian M, Bahmani F, et al. Vitamin D and probiotic co-supplementation affects mental health, hormonal, inflammatory and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Ovarian Research*. 2019;12(1):5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0480-x>

45 Uçkan K, Demir H, Turan K, et al. Role of Oxidative Stress in Obese and Nonobese PCOS Patients. *International Journal of Clinical Practice*. 2022;2022:4579831. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/4579831>

46 Zhang J, Bao Y, Zhou X, et al. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17(1):67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0509-4>

## References

1. WHO. Polycystic Ovary Syndrome: Key Facts [Internet]. 28 June 2023 [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/polycystic-ovary-syndrome#>

2. Shepelkevich AP, Mantachik MV. Features of managing women with polycystic ovary syndrome in clinical practice. *Lechebnoe*

*Delo: Nauchno-prakticheskij Terapevticheskij Zhurnal*. 2019;68(4):67-77. Russian.

3. Ganie MA, Vasudevan V, Wani IA, et al. Epidemiology, pathogenesis, genetics & management of polycystic ovary syndrome in India. *Indian Journal of Medical Research*. 2019;150(4):333-344. DOI: [https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR\\_1937\\_17](https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_1937_17)

4. Hong SH, Hong YS, Jeong K, et al. Relationship between the characteristic traits of polycystic ovary syndrome and susceptibility genes. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10479. DOI: <https://doi.org/10.1038/S41598-020-66633-2>

5. Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *Application of Clinical Genetics*. 2019;12(5):249-260. DOI: <https://doi.org/10.2147/TACG.S200341>

6. Perovic Blagojevic IM, Vekic JZ, Macut DP, et al. Overweight and obesity in polycystic ovary syndrome: association with inflammation, oxidative stress and dyslipidaemia. *The British journal of nutrition. British Journal of Nutrition*. 2022;128(4):604-612. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114521003585>

7. Xu Y, Qiao J. Association of Insulin Resistance and Elevated Androgen Levels with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): A Review of Literature. *Journal of Healthcare Engineering*. 2022;2022:9240569. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/9240569>

8. Chen W, Pang Y. Metabolic Syndrome and PCOS: Pathogenesis and the Role of Metabolites. *Metabolites*. 2021;11:869. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo11120869>

9. Li X, Xiao H, Ma Y, et al. Identifying novel genetic loci associated with polycystic ovary syndrome based on its shared genetic architecture with type 2 diabetes. *Frontiers in Genetics*. 2022;13(3):905716. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.905716>

10. Duică F, Dănilă CA, Boboc AE, et al. Impact of Increased Oxidative Stress on Cardiovascular Diseases in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12(1):614679. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.614679>

11. Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2020;30(7):399-404. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2019.08.010>

12. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocrine Reviews*. 2016;37(5):467-520. DOI: <https://doi.org/10.1210/ER.2015-1104>
13. Herman R, Jensterle M, Janež A, et al. Genetic Variability in Antioxidative and Inflammatory Pathways Modifies the Risk for PCOS and Influences Metabolic Profile of the Syndrome. *Metabolites*. 2020;10(11):439. DOI: <https://doi.org/10.3390/METABO10110439>
14. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:8589318. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/8589318>
15. Gharaei R, Mahdavezhad F, Samadian E, et al. Antioxidant supplementations ameliorate PCOS complications: a review of RCTs and insights into the underlying mechanisms. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021;38(11):2817-2831. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02342-7>
16. Agarwal A, Tadros H, Tvrđá E. Role of oxidants and antioxidants in female reproduction. In: Armstrong D, Stratton RD, editors. *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease*. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118832431.ch16>
17. Terao H, Wada-Hiraike O, Nagumo A, et al. Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019;45(9):1884-1891. DOI: <https://doi.org/10.1111/JOG.14040>
18. Chen A, Zhao H, Wang J, et al. Haplotype Analysis of Candidate Genes Involved in Inflammation and Oxidative Stress and the Susceptibility to Preeclampsia. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020:4683798. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4683798>
19. Zhang J, Bao Y, Zhou X, et al. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17(1):67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0509-4>
20. Mohammadi M. Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review. *International Journal of Preventive Medicine*. 2019;10(1):86. DOI: [https://doi.org/10.4103/IJPVM.IJPVM\\_576\\_17](https://doi.org/10.4103/IJPVM.IJPVM_576_17)
21. Gongdashetti K, Gupta P, Dada R, et al. Follicular fluid oxidative stress biomarkers and ART outcomes in PCOS women undergoing in vitro fertilization: A cross-sectional study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2021;19(5):449-456. DOI: <https://doi.org/10.18502/IJRM.V19I5.9254>
22. Murri M, Luque-ramírez M, Insenser M, et al. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2013;19(3):268-288. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dms059>
23. Nuñez-Calonge R, Cortés S, Gutierrez Gonzalez LM, et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016;32(4):446-456. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.12.010>
24. Liu Q, Liu H, Bai H, et al. Association of SOD2 A16V and PON2 S311C polymorphisms with polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2019;42(8):909-921. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0999-5>
25. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Research*. 2002;12(6):996-1006. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
26. GTEx Portal: Bulk tissue gene expression for SOD2 [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 08]. Available from: <https://www.gtexportal.org/home/gene/ENSG00000112096>
27. Becer E, Çirakoğlu A. Association of the Ala16Val MnSOD gene polymorphism with plasma leptin levels and oxidative stress biomarkers in obese patients. *Gene*. 2015;568(1):35-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.009>
28. Kang SW. Superoxide dismutase 2 gene and cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(9):14647-14655.
29. Nikic P, Dragicevic D, Jerotic D, et al. Polymorphisms of Antioxidant Enzymes SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) Are Associated with Bladder Cancer Risk or Its Aggressiveness. *Medicina*. 2023;59(1):131. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina59010131>
30. Pourvali K, Abbasi M, Mottaghi A. Role of Superoxide Dismutase 2 Gene Ala16Val Polymorphism and Total Antioxidant Capacity in

Diabetes and its Complications. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2016;8(2):48-56.

31. Pervushina OA, Bairova TA, Kolesnikova LI. Ala16Val polymorphism of superoxidodismutase 2 (SOD2) gene in caucasoid teenagers with hypertension, living in the Eastern Siberia. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014;(6):111-114. Russian.

32. Alkhuriji AF, Alomar SY, Babay ZA, et al. Association SOD2 and PON1 Gene Polymorphisms with Polycystic Ovary Syndrome in Saudi Women. *Molecular Syndromology*. 2021;13(2):117-122. DOI: <https://doi.org/10.1159/000519527>

33. Arslan AO, Celik F, Kucukhuseyin O, et al. Investigation of variants of critically important antioxidant enzyme genes in patients with polycystic ovary syndrome. *Experimental Biomedical Research*. 2019;2(1):8-19. DOI: <https://doi.org/10.30714/j-ebr.2019147578>

34. Polat S, Şimşek Y. Five variants of the superoxide dismutase genes in Turkish women with polycystic ovary syndrome. *Free Radical Research*. 2020;54(6):467-476. DOI: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1802022>

35. Salahshoor MR, Sohrabi M, Jalili F, et al. No evidence for a major effect of three common polymorphisms of the GPx1, MnSOD, and CAT genes on PCOS susceptibility. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;120(2):2362-2369. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.27564>

36. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.b2535>

37. ReviewManager (RevMan) is Cochrane's bespoke software for writing Cochrane Reviews [Internet]. 2023 [cited 2023 Aug 08]. Available from: <https://training.cochrane.org/online-learning/core-software/revman>.

38. Sutton A, Houry H, Prip-Buus C, et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003;13(3):145-157. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.FPC.0000054067.64000.8F>

39. Variant: rs4880 – 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies [Internet]. 2015 [cited 2023 Aug 08]. Available from: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:159692340-](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:159692340-159693340;v=rs4880;vdb=variation;vf=167107369)

159693340;v=rs4880;vdb=variation;vf=167107369

40. Ding H, Zhang J, Zhang F, et al. Resistance to the Insulin and Elevated Level of Androgen: A Major Cause of Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12(20):741764. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.741764>

41. Malini NA, Roy GK. Influence of Insulin on LH, Testosterone and SHBG in various PCOS Categories based on the Mode of Secretion of LH in relation to FSH Levels. *Acta Endocrinologica*. 2021;17(3):313-318. DOI: <https://doi.org/10.4183/AEB.2021.313>

42. Mancini A, Bruno C, Vergani E, et al. Oxidative Stress and Low-Grade Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Controversies and New Insights. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(4):1667. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22041667>

43. Bannigida DM, Nayak BS, Vijayaraghavan R. Insulin resistance and oxidative marker in women with PCOS. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2020;126(2):183-186. DOI: <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1499120>

44. Ostadmohammadi V, Jamilian M, Bahmani F, et al. Vitamin D and probiotic co-supplementation affects mental health, hormonal, inflammatory and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Ovarian Research*. 2019;12(1):5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0480-x>

45. Uçkan K, Demir H, Turan K, et al. Role of Oxidative Stress in Obese and Nonobese PCOS Patients. *International Journal of Clinical Practice*. 2022;2022:4579831. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/4579831>

46. Zhang J, Bao Y, Zhou X, et al. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17(1):67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0509-4>

Статья поступила в редакцию 3 мая 2023 г.  
Поступила после доработки 9 октября 2023 г.  
Принята к печати 30 января 2024 г.

Received 3 May 2023  
Revised 9 October 2023  
Accepted 30 January 2024

### Информация об авторах

**Руба Мухаммед Али**, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация, E-mail: ruba.m.ali@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8617-5685>.

**Светлана Витальевна Ломтева**, кандидат биологических наук, врач генетик-эмбриолог, заведующий лабораторией эмбриогенеза ООО «Центр репродукции человека и ЭКО», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация, E-mail: [embryolab61@gmail.com](mailto:embryolab61@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8791-1936>.

**Анжела Аслановна Александрова**, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация, E-mail: [aaleksandrova@mail.ru](mailto:aaleksandrova@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1948-4995>.

**Манар Нур-Альдин Аммар**, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация, E-mail: [manarammarnour@gmail.com](mailto:manarammarnour@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3969>.

**Игорь Геннадьевич Буланов**, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация, E-mail: [ibulanov@sfedu.ru](mailto:ibulanov@sfedu.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1108-0339>.

**Татьяна Павловна Шкурат**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону,

Российская Федерация, E-mail: [tshkurat@yandex.ru](mailto:tshkurat@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6197-7374>.

### 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](mailto: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](mailto: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, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: [aaleksandrova@mail.ru](mailto:aaleksandrova@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1948-4995>.

**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](mailto:manarammarnour@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3969>.

**Igor G. Bulanov**, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: [ibulanov@sfedu.ru](mailto:ibulanov@sfedu.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1108-0339>.

**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](mailto:tshkurat@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6197-7374>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-4

УДК 577.171

# Генетические варианты глобулина, связывающего половые гормоны, и гормональный профиль больных генитальным эндометриозом

Т.А. Пономарева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,

ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Российская Федерация

<sup>2</sup> Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа»,

ул. Некрасова, д. 8/9, г. Белгород, 308007, Российская Федерация

Автор для переписки: Т.А. Пономарева (rybaarbusova@icloud.com)

## Резюме

**Актуальность:** Эндометриоз относится к хроническим воспалительным, дисгормональным заболеваниям, важную роль в развитии которого играют генетические факторы. Для возникновения, роста и распространения эндометриозных гетеротопий важное значение играет гормональный дисбаланс половых гормонов. **Цель исследования:** Изучение ассоциации полиморфизма генов, связанных с уровнем глобулина, связывающего половые гормоны (ГСПГ), с гормональным профилем пациенток с генитальным эндометриозом. **Материалы и методы:** Проведено исследование на выборке из 103 женщин с генитальным эндометриозом. Каждой пациентке выполнен анализ уровня половых гормонов (дегидроэпиандростерон (ДГЭА), эстрадиол, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), прогестерон, пролактин и тестостерон). Проведено генотипирование девяти однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), значимых для уровня ГСПГ по данным полногеномных исследований (genome-wide association study, GWAS): rs12150660 гена *SHBG*, rs10454142 гена *PPP1R21*, rs780093 гена *GCKR*, rs17496332 гена *PRMT6*, rs3779195 гена *BAIAP2L1*, rs440837 гена *ZBTB10*, rs7910927 гена *JMJD1C*, rs4149056 гена *SLCO1B1*, rs8023580 гена *NR2F2*. Используя программу gPLINK, с помощью метода линейной регрессии произведена оценка ассоциации вышеперечисленных локусов с уровнем половых гормонов у женщин с генитальным эндометриозом. **Результаты:** Выявлены генетические варианты, связанные с уровнем ГСПГ, определяющие гормональный профиль больных эндометриозом. С содержанием дегидроэпиандростерона и тестостерона ассоциированы полиморфные локусы rs440837 *ZBTB10* (аллель G,  $\beta=-0,266$  -  $-0,334$ ,  $p_{perm}\leq 0,050$  и  $\beta=-0,322$  -  $-0,215$ ,  $p_{perm}\leq 0,050$ , соответственно), эстрадиола – rs3779195 *BAIAP2L1* (аллель A,  $\beta=-0,282$  -  $-0,318$ ,  $p_{perm}\leq 0,050$ ) и rs440837 *ZBTB10* (аллель G,  $\beta=-0,264$ ,  $p_{perm}=0,048$ ), прогестерона – rs780093 *GCKR* (аллель T,  $\beta=-0,380$  -  $-0,269$ ,  $p_{perm}\leq 0,050$ ), rs10454142 *PPP1R21* (аллель C,  $\beta=0,568$ ,  $p_{perm}=0,049$ ), rs8023580 *NR2F2* (аллель C,  $\beta=-0,289$ ,  $p_{perm}=0,050$ ) и rs12150660 *SHBG* (аллель T,  $\beta=-1,071$ ,  $p_{perm}=0,028$ ). **Заключение:** Установлены ассоциации

полиморфизма генов, связанных с уровнем ГСПГ по данным GWAS, с уровнем половых гормонов у пациенток с генитальным эндометриозом.

**Ключевые слова:** генитальный эндометриоз; половые гормоны; полиморфизм; ассоциации

**Для цитирования:** Пономарева ТА. Генетические варианты глобулина, связывающего половые гормоны, и гормональный профиль больных генитальным эндометриозом. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):75-90. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-4

# Genetic variants of sex hormone-binding globulin and hormonal profile in patients with genital endometriosis

Tatyana A. Ponomareva<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

<sup>2</sup> St. Ioasaph Belgorod Regional Clinical Hospital,  
8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia

Corresponding author: Tatyana A. Ponomareva (rybaarbusova@icloud.com)

## Abstract

**Background:** Endometriosis is a chronic inflammatory, dyshormonal disease. Genetic factors play an important role in its development. Sex hormone imbalance is important for the occurrence, growth and spread of endometrioid heterotopias. **The aim of the study:** To investigate the association of gene polymorphism associated with the level of sex hormone-binding globulin (SHBG) with the hormonal profile of patients with genital endometriosis. **Materials and methods:** A study was conducted on a sample of 103 women with genital endometriosis. Each patient underwent an analysis of sex hormone levels (dehydroepiandrosterone (DHEA), estradiol, follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), progesterone, prolactin and testosterone). Genotyping of nine single-nucleotide polymorphisms (SNPs) significant for SHBG levels according to genome-wide association study (GWAS) data was performed: rs12150660 of the *SHBG* gene, rs10454142 of the *PPP1R21* gene, rs780093 of the *GCKR* gene, rs17496332 of the *PRMT6* gene, rs3779195 of the *BAIAP2L1* gene, rs440837 of the *ZBTB10* gene, rs7910927 of the *JMJD1C* gene, rs4149056 of the *SLCO1B1* gene, rs8023580 of the *NR2F2* gene. Using the gPLINK program, the association of the above loci with the level of sex hormones in women with genital endometriosis was assessed using the linear regression method. **Results:** Genetic variants associated with SHBG levels that determine the hormonal profile of patients with endometriosis have been identified. The polymorphic loci associated with the content of dehydroepiandrosterone and testosterone are rs440837 *ZBTB10* (allele G,  $\beta=-0.266$  -  $-0.334$ ,  $p_{perm}\leq 0.050$  and  $\beta=-0.322$  -  $-0.215$ ,  $p_{perm}\leq 0.050$ , respectively), estradiol – rs3779195 *BAIAP2L1* (allele A,  $\beta=-0.282$  -  $-0.318$ ,  $p_{perm}\leq 0.050$ ) and rs440837 *ZBTB10* (allele G,  $\beta=-0.264$ ,  $p_{perm}=0.048$ ), progesterone – rs780093 *GCKR* (allele T,  $\beta=-0.380$  -  $-0.269$ ,  $p_{perm}\leq 0.050$ ), rs10454142 *PPP1R21* (allele C,  $\beta=0.568$ ,  $p_{perm}=0.049$ ), rs8023580 *NR2F2* (allele C,  $\beta=-0.289$ ,  $p_{perm}=0.050$ ) and rs12150660 *SHBG* (allele T,  $\beta=-1.071$ ,  $p_{perm}=0.028$ ). **Conclusion:** Associations of gene polymorphism associated with SHBG levels according to GWAS data with the level of sex hormones in patients with genital endometriosis have been established.

**Keywords:** genital endometriosis; sex hormones; polymorphism; associations

**For citation:** Ponomareva TA. Genetic variants of sex hormone-binding globulin and hormonal profile in patients with genital endometriosis. Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):75-90. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-4

**Введение.** Эндометриоз – это хроническое дисгормональное, иммунозависимое, генетически обусловленное заболевание, которое определяется наличием эндометриоподобной ткани за пределами полости матки [1]. Эндометриоз встречается у 190 млн женщин во всем мире, однако его истинная распространенность остается неизвестной, поскольку треть пациенток имеют бессимптомную форму данного заболевания и окончательный диагноз требует хирургической визуализации эндометриозных очагов с последующим их гистологическим исследованием [2, 3]. Литературные данные говорят о высокой распространенности эндометриоза среди пациенток с бесплодием (до 50%) и хронической тазовой болью (ХТБ) (до 49%), а также среди женщин, у которых ХТБ не поддается лечению (до 75%) [4]. Эндометриоз – «многоликое» заболевание, которое отличается гетерогенностью симптомов: от тазовой боли, нарушений менструального цикла, дисменореи, диспареунии, бесплодия до иных проявлений, характерных для эндометриоза нетипичных локализаций (эндометриоз легких, мочевого и желудочно-кишечного трактов и т.д.) [2, 5]. При этом конечные причины и механизмы возникновения эндометриоза остаются до конца неизученными [3]. Согласно данным литературы, в развитии и распространении эндометриоза участвуют гормональные, иммунологические, анатомические факторы [6]. Также велика роль генетических факторов в этиологии эндометриоза [7-11]. Результаты проведенных близнецовых, семейных, ассоциативных и полногеномных исследований показывают, что генетические влияния на развитие эндометриоза значительны и составляют до 47% [7, 12]. Полногеномные исследования позволили установить около 200

полиморфных локусов, ассоциированных с возникновением эндометриоза [12]. Однако, до сегодняшнего дня не определена роль конкретных генетических вариантов, способствующих развитию данного заболевания.

В патогенезе эндометриоза большую роль играют половые гормоны [13]. Уровень биологически активных гонадостероидов в организме регулирует ГСПГ [14]. Оказывая влияние на уровни тестостерона и эстрогенов, ГСПГ способен изменить функционирование всей гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, и, следовательно, выработку других половых гормонов [15]. Поскольку ГСПГ отвечает за транспортировку и связывание гонадостероидов логичным является предположение о том, что GWAS-значимые полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, могут быть вовлечены в развитие эндометриоза и связаны с уровнями половых гормонов. На сегодняшний день проведенные ассоциативные и полногеномные исследования позволили выявить взаимосвязь между полиморфизмом генов половых гормонов, а также уровнем репродуктивных гормонов и развитием эндометриоза [16-19]. Однако, работы, посвященные изучению вклада генетических детерминант уровня ГСПГ в гормональный профиль пациенток с генитальным эндометриозом, не были проведены, что определяет актуальность данного исследования.

**Цель исследования.** Изучить ассоциации полиморфных локусов, связанных с уровнем ГСПГ на полногеномном уровне значимости (rs12150660 *SHBG*, rs10454142 *PPP1R21*, rs780093 *GCKR*, rs17496332 *PRMT6*, rs3779195 *BAIAP2L1*, rs440837 *ZBTB10*, rs7910927 *JMJD1C*, rs4149056 *SLCO1B1*, rs8023580 *NR2F2*), с гормональным профилем пациенток с генитальным эндометриозом.

**Материалы и методы исследования.** В исследование были включены 103 пациентки с генитальным эндометриозом. Все женщины, включенные в исследование, – русские, жительницы Центрального Черноземья РФ. Средний возраст женщин составил 33,01 лет, индекс массы тела – 24,91 кг/м<sup>2</sup>. Выборка была сформирована в гинекологическом отделении перинатального центра ОГБУЗ «БОКБ Святителя Иоасафа» (Белгород). Диагноз был установлен после проведенного оперативного лечения (подтвержден в результате морфологического исследования). Каждой пациенткой было подписано информированное согласие на участие в научном исследовании.

Каждой пациентке выполнен анализ уровня половых гормонов (дегидроэпиандростерон (ДГЭА), эстрадиол, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), прогестерон, пролактин и тестостерон). Для проведения молекулярно-генетического исследования были использованы образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов венозной крови фенольно/хлороформным методом экстракции. Для генотипирования были отобраны 9 GWAS-значимых полиморфных локусов, связанных с уровнем ГСПГ: rs12150660 *SHBG*, rs10454142 *PPP1R21*, rs780093 *GCKR*, rs17496332 *PRMT6*, rs3779195 *BAIAP2L1*, rs440837 *ZBTB10*, rs7910927 *JMJD1C*, rs4149056 *SLCO1B1*, rs8023580 *NR2F2*. Методом полимеразной цепной реакции (технология real-time ПЦР) на амплификаторе BioRad CFX96 с использованием локус-специфических наборов реагентов (производства ООО ТестГен, г. Ульяновск) выполнено генотипирование вышеописанных SNPs. Отбор полиморфных локусов производился исходя из их выраженного регуляторного потенциала и влияния на экспрессию генов (оценка проведена с помощью биоинформатического ресурса HaploReg). Для оценки ассоциаций SNPs с гормональным профилем пациенток с

генитальным эндометриозом использована программа gPLINK и метод линейной регрессии (для расчетов были использованы трансформированные значения т.е. приведенные к нормальному распределению показателей содержания гормонов) с проведением расчетов в 4-х генетико-статистических моделях: аллельной, доминантной, рецессивной и аддитивной. В качестве ковариат в расчеты были введены следующие параметры: возраст, ИМТ, наличие сочетанных пролиферативных заболеваний матки (гиперплазия эндометрия, миома матки). Пермутационный тест был использован для коррекции на множественные сравнения.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что распределение генотипов изучаемых девяти молекулярно-генетических маркеров (rs12150660 *SHBG*, rs10454142 *PPP1R21*, rs780093 *GCKR*, rs17496332 *PRMT6*, rs3779195 *BAIAP2L1*, rs440837 *ZBTB10*, rs7910927 *JMJD1C*, rs4149056 *SLCO1B1*, rs8023580 *NR2F2*) соответствует равновесию Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

Важной характеристикой эндометриоза является гормональный статус пациентки. Нами проанализирована вовлеченность полиморфизма генов ГСПГ в формирование особенностей гормонального статуса женщин с эндометриозом. В таблицах 1-7 отображены полученные результаты. Установлена ассоциация полиморфизма rs440837 (A>G) *ZBTB10* с уровнем дегидроэпиандростерона (DHEAS) согласно аддитивной ( $\beta = -0,266$ ;  $p = 0,046$ ;  $p_{perm} = 0,049$ ) и доминантной ( $\beta = -0,334$ ;  $p = 0,048$ ;  $p_{perm} = 0,050$ ) генетических моделей (Табл. 1).

С концентрацией эстрадиола (ESTR) связаны 2 полиморфных локуса – rs3779195 (T>A) *BAIAP2L1* и rs440837 (A>G) *ZBTB10* (Табл. 2). Однонуклеотидный полиморфизм rs3779195 (T>A) *BAIAP2L1* ассоциирован с уровнем данного гормона согласно аддитивной ( $\beta = -0,282$ ;  $p = 0,043$ ;  $p_{perm} = 0,045$ ) и доминантной ( $\beta = -0,318$ ;  $p = 0,031$ ;  $p_{perm} = 0,032$ ) генетических моделей. Полиморфный локус rs440837 (A>G)

*ZBTB10* в рамках доминантной генетической модели ( $\beta=-0,264$ ;  $p=0,047$ ;  $p_{\text{perm}}=0,048$ ) связан с содержанием ESTR в сыворотке крови больных эндометриозом. Четыре молекулярно-генетических маркера – rs780093 (C>T) *GCKR*, rs10454142 (T>C) *PPP1R21*, rs8023580 (T>C) *NR2F2* и rs12150660 (G>T) *SHBG* вовлечены в формирование уровня прогестерона (PG) у больных эндометриозом (Табл. 3). Локус rs780093 (C>T) *GCKR* связан с концентрацией данного гормона в рамках доминантной ( $\beta=-0,380$ ;  $p=0,037$ ;  $p_{\text{perm}}=0,038$ ) и аллельной ( $\beta=-0,269$ ;  $p=0,049$ ;  $p_{\text{perm}}=0,050$ ) генетических моделей. Полиморфизмы rs10454142 (T>C) *PPP1R21* и rs12150660 (G>T) *SHBG* определяют содержание PG в сыворотки крови пациенток с эндометриозом согласно рецессивной модели ( $\beta=0,568$ ;  $p=0,049$ ;  $p_{\text{perm}}=0,049$  и  $\beta=-1,071$ ;  $p=0,027$ ;  $p_{\text{perm}}=0,028$  соответственно) и локус rs8023580 (T>C) *NR2F2* ассоциирован с уровнем PG в рамках аллельной генетической модели ( $\beta=-0,289$ ;  $p=0,049$ ;  $p_{\text{perm}}=0,050$ ). Следует отметить, что минорный аллель С полиморфизма rs10454142 (T>C) *PPP1R21* связан с более высокой концентрацией PG в сыворотке крови пациенток с эндометриозом ( $\beta>0$ ), тогда как минорные аллели других трех вышеуказанных SNPs (аллель Т rs780093 (C>T) *GCKR*, аллель С rs8023580 (T>C) *NR2F2* и аллель Т rs12150660 (G>T) *SHBG*) маркируют низкий уровень данного гормона.

Концентрация тестостерона (TEST) у пациенток с эндометриозом детерминируется полиморфизмом rs440837 (A>G) *ZBTB10* согласно двух генетических моделей – доминантной ( $\beta=-0,322$ ;  $p=0,028$ ;  $p_{\text{perm}}=0,030$ ) и аллельной ( $\beta=-0,215$ ;  $p=0,050$ ;  $p_{\text{perm}}=0,050$ ) (Табл. 4).

Таким образом, нами выявлены генетические варианты, связанные с уровнем ГСПГ, определяющие гормональный профиль больных эндометриозом. С содержанием DHEAS и TEST ассоциирован полиморфный локус rs440837 (A>G) *ZBTB10*, с концентрацией ESTR – rs3779195 (T>A) *BAIAP2L1* и rs440837 (A>G) *ZBTB10*, с содержанием

PG – rs780093 (C>T) *GCKR*, rs10454142 (T>C) *PPP1R21*, rs8023580 (T>C) *NR2F2* и rs12150660 (G>T) *SHBG*.

Согласно литературным данным полиморфные локусы rs440837 *ZBTB10* и rs3779195 *BAIAP2L1* оказывают различные плейотропные эффекты, которые связаны с функционированием женской репродуктивной системы как в норме, так и при различных гинекологических заболеваниях. Так, полиморфизм гена *ZBTB10* ассоциирован с гормон-зависимыми опухолями как рак молочной железы [20] и рак яичников [21]. Ген *BAIAP2L1* ассоциирован с такими гормон-зависимыми заболеваниями, как рак молочной железы (установлено, что *BAIAP2L1* способствует прогрессированию РМЖ) [22], рак щитовидной железы [23] и рак яичников [24].

По данным двух GWAS, полиморфный локус rs440837 *ZBTB10* (аллель G по данным нашего исследования связан с низкими концентрациями дегидроэпиандростерона, эстрадиола и тестостерона) ассоциирован с уровнями ГСПГ [25, 26]. В исследовании Coviello A.D. et al. аллельный вариант А маркировал низкие уровни ГСПГ ( $\beta=-0,030$ ,  $p=3 \times 10^{-9}$ ) [25], в то время как в анализе Harrison S. et al. аллельный вариант G был связан с высокими уровнями ГСПГ ( $\beta=1,43$ ) [26]. Вышеописанный полиморфизм функционально активен в печени, которая является основным местом синтеза ГСПГ [14]. ГСПГ – это гликопротеин плазмы крови, который специфически связывает андрогены и эстрогены, транспортирует их в метаболически неактивной форме и определяет соотношение свободной и белок-связанной фракций этих гормонов в плазме [15]. ГСПГ оставляет свободным только 1-2% тестостерона и 2% эстрадиола, в то время как 65% тестостерона и 38% эстрадиола связывается с ГСПГ, остальное – с альбумином [14, 15]. Таким образом уровни ГСПГ обратно коррелируют с концентрациями половых гормонов в крови: высокий ГСПГ приводит к низким уровням тестостерона и эстрогенов [27].

Таблица 1

Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание DHEAS у больных эндометриозом

Table 1

Polymorphic loci associated with SHBG levels and DHEAS content in patients with endometriosis

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	62	-0,037	0,127	0,770	-0,057	0,134	0,671	0,040	0,174	0,820	-0,404	0,295	0,176
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	62	0,046	0,141	0,746	0,044	0,144	0,762	0,007	0,184	0,968	0,188	0,314	0,552
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	62	-0,035	0,123	0,777	-0,020	0,128	0,874	-0,096	0,173	0,579	0,148	0,273	0,590
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	58	-0,132	0,174	0,451	-0,070	0,189	0,711	0,003	0,210	0,988	-0,998	0,685	0,152
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	62	-0,235	0,127	0,068	<b>-0,266</b>	<b>0,130</b>	<b>0,046</b>	<b>-0,334</b>	<b>0,165</b>	<b>0,048</b>	-0,380	0,340	0,268
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	61	-0,037	0,123	0,765	-0,033	0,126	0,792	0,097	0,198	0,625	-0,197	0,206	0,343
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	61	0,258	0,138	0,065	0,263	0,149	0,084	0,315	0,178	0,083	0,285	0,397	0,475
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	59	0,044	0,136	0,747	0,054	0,139	0,699	0,091	0,174	0,602	-0,025	0,344	0,942
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	61	0,020	0,143	0,891	-0,030	0,152	0,844	-0,039	0,188	0,838	-0,032	0,399	0,937

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Таблица 2

Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание ESTR у больных эндометриозом

Table 2

Polymorphic loci associated with SHBG levels and ESTR content in patients with endometriosis

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	99	0,021	0,099	0,828	-0,002	0,097	0,982	0,042	0,136	0,759	-0,090	0,189	0,637
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	99	-0,128	0,107	0,235	-0,136	0,104	0,194	-0,252	0,135	0,064	0,051	0,221	0,816
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	96	-0,038	0,107	0,725	-0,016	0,106	0,884	-0,012	0,138	0,933	-0,046	0,245	0,851
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	95	-0,249	0,138	0,074	<b>-0,282</b>	<b>0,138</b>	<b>0,043</b>	<b>-0,318</b>	<b>0,146</b>	<b>0,031</b>	0,023	0,678	0,973
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	100	-0,195	0,103	0,061	-0,191	0,101	0,062	<b>-0,264</b>	<b>0,131</b>	<b>0,047</b>	-0,198	0,247	0,426
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	99	-0,136	0,093	0,147	-0,123	0,091	0,180	-0,250	0,145	0,087	-0,073	0,156	0,642
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	99	0,059	0,115	0,611	0,130	0,115	0,262	0,129	0,141	0,360	0,297	0,303	0,330
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	96	-0,063	0,118	0,598	-0,075	0,116	0,520	-0,115	0,134	0,395	0,086	0,337	0,798
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	99	0,061	0,118	0,603	0,040	0,118	0,731	0,058	0,137	0,674	-0,016	0,339	0,963

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Таблица 3

**Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание РГ у больных эндометриозом**

Table 3

**Polymorphic loci associated with SHBG levels and PG content in patients with endometriosis**

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	63	-0,067	0,119	0,577	-0,068	0,123	0,584	-0,134	0,173	0,441	-0,001	0,242	0,996
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	63	<b>-0,269</b>	<b>0,134</b>	<b>0,049</b>	-0,267	0,138	0,058	<b>-0,380</b>	<b>0,178</b>	<b>0,037</b>	-0,180	0,291	0,538
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	61	0,054	0,125	0,665	0,071	0,137	0,605	-0,101	0,188	0,593	<b>0,568</b>	<b>0,283</b>	<b>0,049</b>
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	62	0,060	0,161	0,711	0,090	0,170	0,600	0,109	0,184	0,559	-0,046	0,689	0,947
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	63	0,052	0,149	0,727	0,065	0,156	0,678	0,141	0,177	0,429	-0,447	0,496	0,372
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	62	-0,056	0,110	0,612	-0,056	0,115	0,627	0,006	0,190	0,973	-0,170	0,195	0,388
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	62	0,000	0,153	1,000	-0,009	0,166	0,958	-0,011	0,192	0,956	-0,007	0,493	0,988
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	61	<b>-0,289</b>	<b>0,144</b>	<b>0,049</b>	-0,273	0,150	0,074	-0,284	0,172	0,105	-0,554	0,478	0,252
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	62	-0,051	0,149	0,732	-0,062	0,157	0,695	0,060	0,176	0,736	<b>-1,071</b>	<b>0,471</b>	<b>0,027</b>

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Таблица 4

**Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание TEST у больных эндометриозом**

Table 4

**Polymorphic loci associated with SHBG levels and TEST content in patients with endometriosis**

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	92	-0,031	0,105	0,765	-0,039	0,107	0,718	0,036	0,147	0,809	-0,244	0,218	0,267
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	92	-0,036	0,114	0,756	-0,020	0,115	0,863	-0,014	0,150	0,926	-0,051	0,241	0,833
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	89	-0,086	0,108	0,428	-0,093	0,109	0,395	-0,099	0,148	0,504	-0,195	0,243	0,425
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	88	-0,106	0,142	0,459	-0,125	0,147	0,397	-0,088	0,156	0,575	-1,027	0,680	0,135
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	93	<b>-0,215</b>	<b>0,109</b>	<b>0,050</b>	-0,215	0,112	0,059	<b>-0,322</b>	<b>0,144</b>	<b>0,028</b>	-0,131	0,273	0,634
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	92	-0,042	0,099	0,672	-0,064	0,101	0,525	-0,159	0,160	0,325	-0,005	0,172	0,975
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	92	-0,092	0,120	0,441	-0,058	0,123	0,636	-0,093	0,152	0,542	0,017	0,319	0,959
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	89	-0,066	0,126	0,601	-0,073	0,128	0,572	-0,111	0,149	0,460	0,071	0,360	0,845
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	92	0,000	0,128	1,000	-0,033	0,130	0,799	-0,094	0,148	0,527	0,379	0,403	0,350

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Таблица 5

**Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание FSH у больных эндометриозом**

Table 5

**Polymorphic loci associated with SHBG levels and FSH content in patients with endometriosis**

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	102	0,124	0,095	0,192	0,122	0,095	0,204	0,071	0,134	0,597	0,339	0,188	0,075
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	102	0,051	0,106	0,632	0,063	0,106	0,553	0,096	0,137	0,485	0,026	0,223	0,907
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	99	0,047	0,103	0,650	0,041	0,105	0,696	0,025	0,140	0,860	0,140	0,238	0,560
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	98	0,040	0,136	0,767	0,046	0,141	0,744	0,057	0,149	0,705	-0,103	0,684	0,881
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	103	0,048	0,102	0,640	0,081	0,103	0,436	0,023	0,133	0,865	0,390	0,246	0,117
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	102	0,076	0,091	0,406	0,083	0,092	0,369	0,158	0,146	0,279	0,059	0,157	0,709
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	102	0,029	0,113	0,799	0,072	0,115	0,535	0,098	0,140	0,487	0,040	0,307	0,898
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	99	-0,046	0,116	0,695	-0,026	0,118	0,827	-0,041	0,136	0,763	0,043	0,346	0,902
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	102	0,060	0,115	0,602	0,035	0,117	0,767	0,039	0,136	0,778	0,055	0,342	0,873

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Таблица 6

**Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание LH у больных эндометриозом**

Table 6

**Polymorphic loci associated with SHBG levels and LH content in patients with endometriosis**

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	100	0,127	0,097	0,192	0,120	0,095	0,213	0,059	0,135	0,663	0,355	0,188	0,062
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	100	-0,080	0,109	0,467	-0,065	0,107	0,548	-0,028	0,137	0,837	-0,222	0,231	0,340
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	97	0,108	0,103	0,299	0,070	0,102	0,494	0,193	0,135	0,156	-0,201	0,232	0,388
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	96	0,082	0,138	0,556	0,076	0,141	0,590	0,073	0,149	0,624	0,248	0,682	0,717
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	101	-0,024	0,104	0,816	0,004	0,103	0,972	-0,031	0,134	0,819	0,127	0,249	0,611
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	100	0,057	0,092	0,537	0,040	0,091	0,661	0,072	0,146	0,621	0,035	0,158	0,825
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	100	0,029	0,114	0,800	0,003	0,114	0,977	0,083	0,139	0,553	-0,393	0,310	0,208
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	97	0,124	0,119	0,301	0,084	0,119	0,484	0,035	0,139	0,799	0,485	0,343	0,161
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	100	0,152	0,116	0,192	0,150	0,118	0,207	0,243	0,136	0,078	-0,247	0,340	0,470

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Таблица 7

Полиморфные локусы, ассоциированные с уровнем ГСПГ, и содержание PROL у больных эндометриозом

Table 7

Polymorphic loci associated with SHBG levels and PROL content in patients with endometriosis

Полиморфный вариант	Объем выборки	Генетические модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P	$\beta$	SE	P
rs17496332 (A>G) <i>PRMT6</i> (1xp.)	102	0,086	0,097	0,376	0,058	0,095	0,545	0,031	0,130	0,813	0,166	0,190	0,384
rs780093 (C>T) <i>GCKR</i> (2xp.)	100	0,189	0,105	0,075	0,174	0,101	0,089	0,163	0,133	0,223	0,338	0,210	0,112
rs10454142 (T>C) <i>PPP1R21</i> (2xp.)	97	-0,002	0,103	0,983	-0,019	0,100	0,853	-0,081	0,132	0,538	0,144	0,225	0,525
rs3779195 (T>A) <i>BAIAP2L1</i> (7xp.)	96	0,138	0,133	0,302	0,107	0,135	0,428	0,122	0,143	0,396	-0,022	0,640	0,973
rs440837 (A>G) <i>ZBTB10</i> (8xp.)	99	-0,013	0,107	0,907	0,021	0,102	0,834	0,009	0,131	0,947	0,097	0,251	0,699
rs7910927 (G>T) <i>JMJD1C</i> (10xp.)	100	0,058	0,091	0,523	0,069	0,087	0,432	-0,051	0,139	0,712	0,262	0,148	0,079
rs4149056 (T>C) <i>SLCO1B1</i> (12xp.)	100	0,076	0,113	0,501	0,157	0,110	0,157	0,124	0,135	0,362	0,516	0,288	0,076
rs8023580 (T>C) <i>NR2F2</i> (15xp.)	96	-0,095	0,118	0,421	-0,114	0,113	0,315	-0,112	0,131	0,394	-0,257	0,328	0,436
rs12150660 (G>T) <i>SHBG</i> (17xp.)	100	-0,044	0,116	0,701	-0,085	0,111	0,446	-0,066	0,130	0,610	-0,314	0,328	0,341

Примечание: Показатели получены при коррекции на ковариаты;  $\beta$  – коэффициент линейной регрессии; SE – ошибка  $\beta$ ; p – уровень значимости.

Note: The indicators were obtained by correcting for covariates;  $\beta$  – the linear regression coefficient; SE – the  $\beta$  error; p – the significance level.

Полученные нами данные согласуются с данными проведенных полногеномных исследований. Так, генетический вариант G rs440837 *ZBTB10*, ассоциированный по нашим данным с низкими концентрациями ДГЭА, эстрадиола и тестостерона, связан по данным GWAS с высокими уровнями ГСПГ, и, следовательно, с низким уровнем тестостерона и эстрадиола [26]. Из литературных материалов известно, что для гормонального профиля пациенток с эндометриозом характерны изменения уровней половых гормонов: снижение уровня ЛГ, увеличение концентрации ФСГ, снижение соотношения ЛГ/ФСГ, увеличение уровня ГСПГ, снижение тестостерона, высокие концентрации эстрадиола в эндометриoidных очагах и нормальные или низкие уровни сывороточного эстрадиола, повышение соотношения эстрадиол/тестостерон и т.д. [28, 29]. Данные гормональные изменения способствуют росту и распространению эндометриoidных гетеротопий [30, 31]. Описанные колебания уровня гормонов при эндометриозе тождественны полученным нами данным о низких уровнях эстрадиола у женщин с наличием аллеля А полиморфизма rs3779195 *BAIAP2L1*.

Результаты настоящего исследования согласуются с работой Dinsdale N. et al., в которой было выдвинуто предположение, что эндометриоз возникает из-за атипичного функционирования гипоталамо-гипофизарной оси в пренатальный период, и при этом ключевое значение в развитии заболевания имеет низкий уровень пренатального тестостерона [28]. Сбой в функционировании гипоталамо-гипофизарной системы обусловлен изменением чувствительности гипоталамуса к стероид-индуцированной обратной отрицательной связи и приводит к формированию определенного гормонального профиля, предрасполагающего к развитию эндометриоза (сниженный уровень ЛГ по

сравнению с ФСГ, повышенный уровень ГСПГ, сниженный системный/яичниковый тестостерон и другие изменения) [28, 32]. Ввиду того что ГСПГ транспортирует андрогены в крови, а также регулирует их доступ к тканям-мишеням, то можно предположить, что высокие уровни ГСПГ влияют на снижение уровня свободного тестостерона. В последующем низкие уровни пренатального и постнатального тестостерона способствуют раннему возрасту наступления менархе, укорочению менструальных циклов, развитию меноррагии, которые, как известно, являются одними из факторов риска развития эндометриоза [28]. Вышеуказанные факторы риска способствуют увеличению вероятности заброса менструальной крови и последующего развития эндометриоза, согласно гипотезе ретроградной менструации [33]. Кроме того, некоторые авторы указывают на активацию стволовых клеток посредством воздействия низких уровней тестостерона с последующим развитием эндометриоза в соответствии с теорией стволовых клеток [14]. В последующей статье Crespi et al. выявлена положительная корреляция между низкими уровнями тестостерона и основными симптомами эндометриоза, такими как тазовая боль и повышенная чувствительность к боли [29].

Проведенный в 2024 году анализ, посвященный изучению ассоциации ГСПГ-связанных генов с раком молочной железы (РМЖ), показал вовлеченность полиморфного локуса rs10454142 *PPP1R21* в возникновение РМЖ у женщин без отягощенной наследственности и у женщин, не имеющих мутаций в генах *BRCA1/CHEK2* [34]. В данной работе показано, что аллель С rs10454142 *PPP1R21* является фактором риска развития РМЖ у женщин, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по РМЖ (OR=1,32,  $p_{perm}=0,027$ ), и у женщин у которых отсутствовали мутации в генах *BRCA1/CHEK2* (OR=1,34-1,74,  $p_{perm}<0,050$ ) [34]. В соответствии с литературными

данными, прогестерон участвует в регуляции пролиферации и дифференцировке паренхиматозных клеток молочной железы [35]. Рак молочной железы – гормон-зависимая опухоль, важную роль в патогенезе которой играют половые гормоны (эстрогены, прогестерон, пролактин и др.) [34, 35]. Исследование, посвященное изучению уровня гормонов периферической крови у пациенток с РМЖ показало, что уровень прогестерона у пациенток в менопаузе превышал нормальные значения [36]. Эти данные согласуются с результатами нашего исследования, в котором установлено, что минорный аллель С полиморфизма rs10454142 *PPP1R21* связан с более высокой концентрацией прогестерона в сыворотке крови пациенток с эндометриозом.

В исследовании Golovchenko I.O. et al., посвященном изучению связи полиморфизмов, влияющих на уровни половых гормонов (панель из 9 локусов, взятая из GWAS Ruth et al. [37]), с эндометриозом (работа выполнена на этой же выборке пациентов), были выявлены следующие результаты. Во-первых, была установлена протективная роль аллеля С rs11031005 *FSHB*, ассоциированного с повышением уровня общего/свободного тестостерона. Во-вторых, была показана вовлеченность в предрасположенность к эндометриозу (в рамках межгенных взаимодействий) SNPs, ассоциированных с уровнем циркулирующего ГСПГ (rs1641549 *TP53*, rs727428 *SHBG*), свободного (биодоступного) тестостерона (rs112295236 *SLC22A10*, rs727428 *SHBG*) и ДГЭА [38]. В последующем исследовании Головченко И.О. была продемонстрирована корреляция уровней тестостерона у пациентов с эндометриозом с полиморфизмами rs148982377 *ZNF789* и rs34670419 *ZKSCAN5* [39].

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что среди пациенток с генитальным эндометриозом уровни дегидроэпиандростерона и тестостерона

маркируются полиморфным локусом rs440837 *ZBTB10*, концентрации эстрадиола – rs3779195 *BAIAP2L1* и rs440837 *ZBTB10*, содержание прогестерона – rs780093 *GCKR*, rs10454142 *PPP1R21*, rs8023580 *NR2F2* и rs12150660 *SHBG*.

### Информация о финансировании

*Финансирование данной работы не проводилось.*

### Financial support

*No financial support has been provided for this work.*

### Конфликт интересов

*Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.*

### Conflict of interests

*The author has no conflict of interest to declare.*

### Список литературы

1. Crump J, Suker A, White L. Endometriosis: A review of recent evidence and guidelines. *Australian Journal of General Practice*. 2024;53(1-2):11-18. DOI: <https://doi.org/10.31128/AJGP/04-23-6805>
2. Koninckx PR, Fernandes R, Ussia A, et al. Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2021;12:745548. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.745548>
3. Wang PH, Yang ST, Chang WH, et al. Endometriosis: Part I. Basic concept. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022;61(6):927-934. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2022.08.002>
4. Smolarz B, Szyłło K, Romanowicz H. Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10554. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms221910554>
5. Адамян ЛВ, Андреева ЕН. Редкие формы эндометриоза. *Проблемы репродукции*. 2022;28(1):45-53. DOI: <https://doi.org/10.17116/repro20222801145>
6. Пономарева ТА, Алтухова ОБ, Пономаренко ИВ, и др. Современные представления о механизмах развития и факторах риска эндометриоза. *Акушерство и*

- гинекология. 2024;7:12-20. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2024.110>
7. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(13):1244-1256. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1810764>
8. Ponomarenko MS, Reshetnikov EA, Churnosova MM, et al. Comorbidity and syntropy of benign proliferative diseases of the female reproductive system: non-genetic, genetic, and epigenetic factors (review). *Research Results in Biomedicine*. 2023;9(4):544-556. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-9>
9. Пономарева ТА, Алтухова ОБ, Пономаренко ИВ, и др. Генетические основы коморбидности эндометриоза. *Медицинский Совет*. 2024;(17):92-102. DOI: <https://doi.org/10.21518/ms2024-497>
10. Радзинский ВЕ, Алтухова ОБ. Молекулярно-генетические детерминанты бесплодия при генитальном эндометриозе. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2018;4(3):28-37. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-3>
11. Пономаренко ИВ, Полоников АВ, Верзилина ИН, и др. Молекулярно-генетические детерминанты развития эндометриоза. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2019;18(1):82-86. DOI: <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2019-1-82-86>
12. Пономарева ТА, Алтухова ОБ, Пономаренко ИВ, и др. Роль генетических факторов в формировании эндометриозных поражений. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2023;17(4):443-454. DOI: <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2023.434>
13. Пономаренко ИВ, Полоников АВ, Чурносоев МИ. Молекулярные механизмы и факторы риска развития эндометриоза. *Акушерство и гинекология*. 2019;3:26-31. DOI: <https://doi.org/10.18565/aig.2019.3.26-31>
14. Narinx N, David K, Walravens J, et al. Role of sex hormone-binding globulin in the free hormone hypothesis and the relevance of free testosterone in androgen physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(11):543. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04562-1>
15. Simons PIHG, Valkenburg O, Stehouwer CDA, et al. Sex hormone-binding globulin: biomarker and hepatokine? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2021;32(8):544-553. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.05.002>
16. Adewuyi EO, Sapkota Y, International Endogene Consortium, et al. Shared molecular genetic mechanisms underlie endometriosis and migraine comorbidity. *Genes*. 2020;11(3):268. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11030268>
17. Sapkota Y, Steinhorsdottir V, Morris AP, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nature Communications*. 2017;8:15539. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms15539>
18. Garitazelaia A, Rueda-Martínez A, Arauzo R, et al. A Systematic two-sample Mendelian randomization analysis identifies shared genetic origin of endometriosis and associated phenotypes. *Life*. 2021;11(1):24. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11010024>
19. Golovchenko I, Aizikovich B, Golovchenko O, et al. Sex Hormone Candidate Gene Polymorphisms Are Associated with Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22):13691. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232213691>
20. Ponomarenko I, Pasenov K, Churnosova M, et al. Sex-Hormone-Binding Globulin Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Caucasian Women of Russia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(4):2182. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25042182>
21. Lai Y, Zhang X, Zhang Z, et al. The microRNA-27a: ZBTB10-specificity protein pathway is involved in follicle stimulating hormone-induced VEGF, Cox2 and survivin expression in ovarian epithelial cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013;42(2):776-784. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1743>
22. Deng N, Zhang X, Zhang Y. *BAIAP2L1* accelerates breast cancer progression and chemoresistance by activating AKT signaling through binding with ribosomal protein L3. *Cancer Science*. 2023;114(3):764-780. DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.15632>
23. Renaud E, Riegel K, Romero R, et al. Multiomic analysis of papillary thyroid cancers identifies *BAIAP2L1*-*BRAF* fusion and requirement of *TRIM25*, *PDE5A* and *PKCδ* for tumorigenesis. *Molecular Cancer*. 2022;21(1):195. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01665-y>
24. Chao A, Tsai CL, Jung SM, et al. *BAI1*-Associated Protein 2-Like 1 (*BAIAP2L1*) Is a Potential Biomarker in Ovarian Cancer. *PLoS*

- ONE. 2015;10(7):e0133081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133081>
25. Coviello AD, Haring R, Wellons M, et al. A genome-wide association meta-analysis of circulating sex hormone-binding globulin reveals multiple Loci implicated in sex steroid hormone regulation. *PLoS Genetics*. 2012;8(7):e1002805. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002805>
26. Harrison S, Davies NM, Howe LD, et al. Testosterone and socioeconomic position: Mendelian randomization in 306,248 men and women in UK Biobank. *Science Advances*. 2021;7(31):eabf8257. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8257>
27. Qu X, Donnelly R. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) as an Early Biomarker and Therapeutic Target in Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8191. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218191>
28. Dinsdale N, Nepomnaschy P, Crespi B. The evolutionary biology of endometriosis. *Evolution, Medicine and Public Health*. 2021;9(1):174-191. DOI: <https://doi.org/10.1093/emph/eoab008>
29. Crespi B. Variation among human populations in endometriosis and PCOS A test of the inverse comorbidity model. *Evolution, Medicine and Public Health*. 2021;9(1):295-310. DOI: <https://doi.org/10.1093/emph/eoab029>
30. Андреев АЕ, Клейменова ТС, Дробинцева АО, и др. Сигнальные молекулы, вовлеченные в образование новых нервных окончаний при эндометриозе (обзор). *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2019;5(1):94-107. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2019-5-1-0-7>
31. Пономаренко ИВ, Полоников АВ, Чурносоев МИ. Молекулярные механизмы и факторы риска развития эндометриоза. *Акушерство и гинекология*. 2019;3:26-31. DOI: <https://doi.org/10.18565/aig.2019.3.26-31>
32. Sinnott-Armstrong N, Naqvi S, Rivas M, et al. GWAS of three molecular traits highlights core genes and pathways alongside a highly polygenic background. *eLife*. 2021;10:e58615. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.58615>
33. Bulun SE. Endometriosis caused by retrograde menstruation: now demonstrated by DNA evidence. *Fertility and Sterility*. 2022;118(3):535-536. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.07.012>
34. Пасенов КН. Особенности ассоциаций SHBG-связанных генов с раком молочной железы у женщин в зависимости от наличия наследственной отягощенности и мутаций в генах *BRCA1/CHEK2*. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2024;10(1):69-88. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4>
35. Li Z, Wei H, Li S, et al. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. 2022;16:305-314. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S336643>
36. Юрченкова КВ, Смолякова РМ, Шпадарук ЕМ, и др. Оценка уровня экскреции гормонов в периферической крови у пациенток, страдающих раком молочной железы. В: Сахаровские чтения 2020 года: экологические проблемы XXI века. Материалы 20-й международной научной конференции, 21-22 мая 2020 г., г. Минск. 2020;2:274-277. DOI: <https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-274-277>
37. Ruth KS, Campbell PJ, Chew S, et al. Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-related phenotypes. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24(2):284-290. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.102>
38. Golovchenko I, Aizikovich B, Golovchenko O, et al. Sex Hormone Candidate Gene Polymorphisms Are Associated with Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22):13691. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232213691>
39. Головченко ИО. Генетические детерминанты уровня половых гормонов у больных эндометриозом. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2023;9(1):5-21. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-1>

## References

1. Crump J, Suker A, White L. Endometriosis: A review of recent evidence and guidelines. *Australian Journal of General Practice*. 2024;53(1-2):11-18. DOI: <https://doi.org/10.31128/AJGP/04-23-6805>
2. Koninckx PR, Fernandes R, Ussia A, et al. Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2021;12:745548. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.745548>
3. Wang PH, Yang ST, Chang WH, et al. Endometriosis: Part I. Basic concept. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*.

- 2022;61(6):927-934. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2022.08.002>
4. Smolarz B, Szyłło K, Romanowicz H. Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10554. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms221910554>
5. Adamyan LV, Andreeva EN. The rarest forms of endometriosis. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2022;28(1):45-53. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17116/repro20222801145>
6. Ponomareva TA, Altukhova OB, Ponomarenko IV, et al. Novel concepts in the pathogenesis and risk factors of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*. 2024;(7):12-20 Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2024.110>
7. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(13):1244-1256. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1810764>
8. Ponomarenko MS, Reshetnikov EA, Churnosova MM, et al. Comorbidity and syntropy of benign proliferative diseases of the female reproductive system: non-genetic, genetic, and epigenetic factors (review). *Research Results in Biomedicine*. 2023;9(4):544-556. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-9>
9. Ponomareva TA, Altukhova OB, Ponomarenko IV, et al. Genetic basis of endometriosis comorbidity. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2024;(17):92-102. Russian. DOI: <https://doi.org/10.21518/ms2024-497>
10. Radzinsky VE, Altukhova OB. Molecular-genetic determinants of infertility in genital endometriosis. *Research Results in Biomedicine*. 2018;4(3):28-37. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-3>
11. Ponomarenko IV, Polonikov AV, Verzilina IN, et al. Molecular-genetic determinants of the development of endometriosis. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology*. 2019;18(1):82-86. Russian. DOI: <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2019-1-82-86>
12. Ponomareva TA, Altukhova OB, Ponomarenko IV, et al. The role of genetic factors in developing endometrioid lesions. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2023;17(4):443-454. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2023.434>
13. Ponomarenko IV, Polonikov AV, Churnosov MI. Molecular mechanisms of and risk factors for endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*. 2019;3:26-31. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18565/aig.2019.3.26-31>
14. Narinx N, David K, Walravens J, et al. Role of sex hormone-binding globulin in the free hormone hypothesis and the relevance of free testosterone in androgen physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(11):543. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04562-1>
15. Simons PIHG, Valkenburg O, Stehouwer CDA, et al. Sex hormone-binding globulin: biomarker and hepatokine? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2021;32(8):544-553. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.05.002>
16. Adewuyi EO, Sapkota Y, International Endogene Consortium, et al. Shared molecular genetic mechanisms underlie endometriosis and migraine comorbidity. *Genes*. 2020;11(3):268. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11030268>
17. Sapkota Y, Steinhorsdottir V, Morris AP, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nature Communications*. 2017;8:15539. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms15539>
18. Garitazelaia A, Rueda-Martínez A, Arauzo R, et al. A Systematic two-sample Mendelian randomization analysis identifies shared genetic origin of endometriosis and associated phenotypes. *Life*. 2021;11(1):24. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11010024>
19. Golovchenko I, Aizikovich B, Golovchenko O, et al. Sex Hormone Candidate Gene Polymorphisms Are Associated with Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22):13691. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232213691>
20. Ponomarenko I, Pasenov K, Churnosova M, et al. Sex-Hormone-Binding Globulin Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Caucasian Women of Russia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(4):2182. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25042182>
21. Lai Y, Zhang X, Zhang Z, et al. The microRNA-27a: ZBTB10-specificity protein pathway is involved in follicle stimulating hormone-induced VEGF, Cox2 and survivin expression in ovarian epithelial cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013;42(2):776-784. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1743>
22. Deng N, Zhang X, Zhang Y. *BAIAP2LI* accelerates breast cancer progression and chemoresistance by activating AKT signaling

- through binding with ribosomal protein L3. *Cancer Science*. 2023;114(3):764-780. DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.15632>
- 23.Renaud E, Riegel K, Romero R, et al. Multiomic analysis of papillary thyroid cancers identifies BAIAP2L1-BRAF fusion and requirement of TRIM25, PDE5A and PKC $\delta$  for tumorigenesis. *Molecular Cancer*. 2022;21(1):195. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01665-y>
- 24.Chao A, Tsai CL, Jung SM, et al. BAI1-Associated Protein 2-Like 1 (BAIAP2L1) Is a Potential Biomarker in Ovarian Cancer. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0133081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133081>
- 25.Coviello AD, Haring R, Wellons M, et al. A genome-wide association meta-analysis of circulating sex hormone-binding globulin reveals multiple Loci implicated in sex steroid hormone regulation. *PLoS Genetics*. 2012;8(7):e1002805. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002805>
- 26.Harrison S, Davies NM, Howe LD, et al. Testosterone and socioeconomic position: Mendelian randomization in 306,248 men and women in UK Biobank. *Science Advances*. 2021;7(31):eabf8257. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8257>
- 27.Qu X, Donnelly R. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) as an Early Biomarker and Therapeutic Target in Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8191. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218191>
- 28.Dinsdale N, Nepomnaschy P, Crespi B. The evolutionary biology of endometriosis. *Evolution, Medicine and Public Health*. 2021;9(1):174-191. DOI: <https://doi.org/10.1093/emph/eoab008>
- 29.Crespi B. Variation among human populations in endometriosis and PCOS A test of the inverse comorbidity model. *Evolution, Medicine and Public Health*. 2021;9(1):295-310. DOI: <https://doi.org/10.1093/emph/eoab029>
- 30.Andreev AE, Kleimenova TS, Drobintseva AO, et al. Signal molecules involved in the formation of new nerve endings in endometriosis (review). *Research Results in Biomedicine*. 2019;5(1):94-107. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2019-5-1-0-7>
- 31.Ponomarenko IV, Polonikov AV, Churnosov MI. Molecular mechanisms of and risk factors for endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*. 2019;3:26-31. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18565/aig.2019.3.26-31>
- 32.Sinnott-Armstrong N, Naqvi S, Rivas M, et al. GWAS of three molecular traits highlights core genes and pathways alongside a highly polygenic background. *eLife*. 2021;10:e58615. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.58615>
- 33.Bulun SE. Endometriosis caused by retrograde menstruation: now demonstrated by DNA evidence. *Fertility and Sterility*. 2022;118(3):535-536. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.07.012>
- 34.Pasenov KN. Features of associations of SHBG-related genes with breast cancer in women, depending on the presence of hereditary burden and mutations in the BRCA1/CHEK2 genes. *Research Results in Biomedicine*. 2024;10(1):69-88. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4>
- 35.Li Z, Wei H, Li S, et al. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. 2022;16:305-314. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S336643>
- 36.Yurchenkova KV, Smolyakova RM, Shpadaruk EM, and others. Assessment of the level of hormone excretion in peripheral blood in patients with breast cancer. In: Sakharov Readings 2020: Environmental problems of the 21st century. Proceedings of the 20th International Scientific Conference, May 21-22, 2020, Minsk. 2020;2:274-277. DOI: <https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-274-277>
- 37.Ruth KS, Campbell PJ, Chew S, et al. Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-related phenotypes. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24(2):284-290. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.102>
- 38.Golovchenko I, Aizikovich B, Golovchenko O, et al. Sex Hormone Candidate Gene Polymorphisms Are Associated with Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22):13691. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232213691>
- 39.Golovchenko IO. Genetic determinants of sex hormone levels in endometriosis patients. *Research Results in Biomedicine*. 2023;9(1):5-21. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-1>

Статья поступила в редакцию 11 августа 2024 г.  
Поступила после доработки 25 сентября 2024 г.  
Принята к печати 10 октября 2024 г.

Received 11 August 2024  
Revised 25 September 2024  
Accepted 10 October 2024

### Информация об авторе

**Татьяна Андреевна Пономарева**, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; врач акушер-гинеколог, ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: rybaarbusova@icloud.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8533-9319>.

### Information about the author

**Tatyana A. Ponomareva**, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University; Obstetrician-Gynecologist, St. Ioasaph Belgorod Regional Clinical Hospital, Belgorod, Russia, E-mail: rybaarbusova@icloud.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8533-9319>.

## ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ PHARMACOLOGY



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-5

УДК 615.21/26;615.28

# Спектр противовоспалительной, противоинфекционной и противоопухолевой активности производных хиназолина и хиназолинона (обзор)

М.М. Манвелян<sup>1</sup> , Э.А. Манвелян<sup>2</sup> , В.А. Батулин<sup>1</sup> , Н.Д. Бунятян<sup>3,4</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет», ул. Мира, д. 310, г. Ставрополь, 355017, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет», ул. Пушкина, д. 1, г. Ставрополь, 355017, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Петровский б-р, д. 8, стр. 2, г. Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>4</sup> 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  
*Автор для переписки: Э.А. Манвелян (manveljan@rambler.ru)*

### Резюме

**Актуальность:** Новый класс лекарственных соединений – производные хиназолина и хиназолинона активно изучаются в последние годы, на их основе создаются лекарственные препараты с поливалентным влиянием. Концепция многофункциональных агентов активно развивается и дает обнадеживающие результаты. В клинической практике применяется много высокоактивных производных хиназолина и хиназолинона, извлеченные из растений, бактерий, грибов. Хиназолиновый и хиназолиноновый циклы – уникальные фармакофорные группы, вносящие вклад в структуру и активность широко используемых в медицинской практике лекарственных препаратов. **Цель исследования:** Анализ современных данных литературы об исследованиях противовоспалительной, противоинфекционной, противоопухолевой активности производных хиназолина и хиназолинона. **Материалы и методы:** Проведён теоретический анализ опубликованных результатов изучения фармакологических эффектов производных хиназолина и хиназолинона с различными заместителями. Поиск осуществлялся по работам, находящимся в открытом доступе, в базах

данных PubMed, Elibrary, Scopus. При анализе литературных данных особое внимание уделялось систематическим обзорам и метаанализам результатов научных исследований. **Результаты:** Наиболее распространены производные 4(3H)-хиназолинона. Для дериватов хиназолина и хиназолинона показано противовоспалительное действие при отеке лапы, ишемическом повреждении головного мозга, нейровоспалении, ревматоидном артрите, остеоартрите, остеоартрозе. Описано противоинфекционное влияние соединений на возбудителей заболеваний: вирусных (вирусов ветряной оспы, цитомегаловируса, ВИЧ, SARS-CoV-2, MERS-CoV, чикунгунья), бактериальных (грамотрицательных и грамположительных клинически патогенных штаммов), протозойных (*N. fowleri*, *B. mandrillaris*, *Acanthamoeba castellanii*, *P. falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*), грибковых. Установлены противоопухолевые производные, показанные при раке различных органов и систем. Для многих производных исследованы механизмы вирулицидного, антимикробного, противопротозойного, фунгицидного, противобластомного действия. **Заключение:** Интерес, проявляемый к производным хиназолина и хиназолинона с противоинфекционным, противовоспалительным, цитостатическим действием, колоссален и продолжает расти. Исследование новых производных данного ряда как соединений с полифармакологической активностью актуально, может способствовать повышению эффективности лекарственного лечения больных с воспалительными, инфекционными и опухолевыми заболеваниями, позволит уменьшить количество назначаемых препаратов, частоту и выраженность их побочных эффектов.

**Ключевые слова:** хиназолины; хиназолиноны; противовоспалительная, противоинфекционная и противоопухолевая активность

**Для цитирования:** Манвелян ММ, Манвелян ЭА, Батулин ВА, и др. Спектр противовоспалительной, противоинфекционной и противоопухолевой активности производных хиназолина и хиназолинона (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):91-110. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-5

## Spectrum of anti-inflammatory, anti-infectious and anti-tumor activity of quinazoline and quinazolinone derivatives (review)

Michael M. Manvelyan<sup>1</sup> , Eleonora A. Manvelyan<sup>2</sup> , Vladimir A. Baturin<sup>1</sup> ,  
Natalia D. Bunyatyan<sup>3,4</sup> 

<sup>1</sup> Stavropol State Medical University,  
310 Mira St., Stavropol, 355017, Russia

<sup>2</sup> North-Caucasus Federal University,  
1 Pushkin St., Stavropol, 355017, Russia

<sup>3</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd., Moscow, 127051, Russia

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,  
8-2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia

Corresponding author: Eleonora A. Manvelyan ([manveljan@rambler.ru](mailto:manveljan@rambler.ru))

### Abstract

**Background:** A new class of medicinal compounds – derivatives of quinazoline and quinazolinone have been actively studied in recent years, on their basis drugs with polyvalent influence are created.

The concept of multifunctional agents is being actively developed and has yielded encouraging results. In clinical practice, many highly active quinazoline and quinazolinone derivatives extracted from plants, bacteria, fungi are used. Quinazoline and quinazolinone cycles are unique pharmacophore groups contributing to the structure and activity of drugs widely used in medical practice. **The aim of the study:** Analysis of current literature data on studies of anti-inflammatory, anti-infectious, anti-tumor activity of quinazoline and quinazolinone derivatives. **Materials and methods:** A theoretical analysis of the published results of studying the pharmacological effects of quinazoline and quinazolinone derivatives with various substituents was carried out, the search was carried out according to works in the public domain in the PubMed, Elibrary, Scopus databases. When analyzing the literature data, special attention was paid to systematic reviews and meta-analyses of the results of scientific research. **Results:** The most common derivatives are 4 (3*H*)-quinazolinone. For quinazoline and quinazolinone derivatives, anti-inflammatory effects in paw edema, ischemic brain damage, neuroinflammation, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, osteoarthrosis are indicated. The anti-infectious effect of the compounds on the causative agents of diseases is described: viral (*Varicella Zoster Viruses*, *Cytomegalovirus*, *HIV*, *SARS-CoV-2*, *MERS-CoV*, *Chikungunya*), bacterial (gram-negative and gram-positive clinically pathogenic strains), protozoal (*N. fowleri*, *B. mandrillaris*, *Acanthamoeba castellanii*, *P. falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*), fungal. Antitumor derivatives shown in cancer of various organs and systems have been established. For many derivatives, the mechanisms of virucidal, antimicrobial, antiprotozoal, fungicidal, antitumor actions have been investigated. **Conclusion:** The interest shown in quinazoline and quinazolinone derivatives with anti-infectious, anti-inflammatory, cytostatic effects is colossal and continues to grow. The study of new derivatives of this series as compounds with polypharmacological activity is relevant, can contribute to increasing the effectiveness of drug treatment in patients with inflammatory, infectious and tumor diseases, will reduce the number of prescribed drugs, the frequency and severity of their side effects.

**Keywords:** quinazolines; quinazolinones; anti-inflammatory, anti-infective and antitumor activity

**For citation:** Manvelyan MM, Manvelyan EA, Baturin VA, et al. Spectrum of anti-inflammatory, anti-infectious and anti-tumor activity of quinazoline and quinazolinone derivatives (review). Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):91-110. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-5

**Введение.** Поиск, разработка оригинальных отечественных эффективных и безопасных лекарственных препаратов, обладающих политаргетным действием, для проведения рациональной и экономичной фармакотерапии – актуальная задача, решить которую возможно при изыскании и исследовании новых биологически активных веществ. Новый класс лекарственных соединений – производные хиназолина и хиназолинона, активно изучаются в последние годы, на их основе создаются лекарственные препараты с поливалентным влиянием.

Хиназолиноны – гетероциклические соединения производные кетохинолина. Впервые в 1903 году Габриэлем и Колманом были синтезированы несколько производных хиназолина и изучены их

физико-химические свойства. При классификации хинозазинонов учитывается расположение кетогруппы: 2(1*H*)хинозазиноны, 4(3*H*)хинозазиноны, 2,4(1*H*,3*H*)хинозазинондионы. Наиболее распространены производные 4(3*H*)-хинозазинона природного и синтетического происхождения, также они известны в качестве промежуточных продуктов в биосинтетических процессах медицинской химии. Концепция многофункциональных агентов активно развивается и дает обнадеживающие результаты. Хинозазиноновый и хинозазиноновый циклы являются уникальными фармакофорными группами, которые вносят вклад в структуру и заметно влияют на активность большого числа лекарственных средств, широко

используемых в медицинской химии. Много соединений с высокой биологической активностью, производные хиназолина и хиназолинона, извлеченные из бактерий, грибов и растений, применяются в клинической практике [1-5].

**Цель исследования.** Провести анализ современных данных литературы об исследованиях активности производных хиназолина и хиназолинона: противовоспалительного, противоинфекционного и противоопухолевого действия.

**Материалы и методы исследования.** Проанализированы опубликованные результаты изучения спектров фармакологической активности производных хиназолина и хиназолинона с различными заместителями. Поиск осуществлялся по работам, находящимся в открытом доступе, в базах данных PubMed, Elibrary, Scopus. При анализе литературных данных особое внимание уделялось систематическим обзорам и метаанализам результатов научных исследований.

### Результаты и их обсуждение

#### Природные соединения

*Фебрифугин* – алкалоид хиназолинона из листьев и корней травы *Dichroa febrifuga* семейства (сем.) гортензиевых (произрастает в Китае, Тибете, Непале), обнаруженный и в садовой гортензии. Фебрифугин – ингредиент древнего растительного лекарственного средства, использовавшегося более двух тысяч лет в традиционной китайской медицине для лечения лихорадки и малярии, оказывает противомаларийное действие, многократно активнее, чем хинин, однако и токсичнее. Синтетические производные алкалоида использовались при малярии, раке, фиброзе и воспалительных заболеваниях [2, 3].

*Галофугинон* – один из известных сильнодействующих противомаларийных средств, является менее токсичным галогенированным синтетическим производным фебрифугина, используется как заменитель экстракта *Dichroa febrifuga* в ветеринарии при инфицировании простейшими, кокцидиями;

противопаразитарное действие оказывает при криптоспориidioзе, токсоплазмозе, лейшманиозе [6]. Немаловажно отметить, что для препарата «Ветгалофугинон» с антипротозойной активностью, рекомендованного в качестве лечебно-профилактического средства при криптоспориidioзе, установлен класс токсичности «Малоопасные вещества» [7]. Галофугинон воздействует на фермент цитоплазматическую пролил-тРНК-синтазу *Plasmodium falciparum*, изучался как противовирусный препарат [8], оказывает противовоспалительное влияние, положительно действует при склеродермии у человека, в том числе, у детей; избирательно блокирует дифференцировку лимфоцитов в Т-хелперы 17, вовлеченные в аутоиммунные реакции (при ревматоидном артрите, рассеянном склерозе, сахарном диабете 1-го типа, экземе, псориазе), исследовался для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, проявляет антифибротические свойства (в частности, при СПИД-ассоциированной саркоме Капоши), ингибирует ангиогенез и метастазирование [9]. Показано, что галофугинон усиливает противоопухолевый эффект фотодинамической терапии 5-аминолевулиновой кислотой *in vitro* и *in vivo* при плоскоклеточном раке кожи посредством ингибирования передачи сигналов NRF2 [10].

*Рутекарпин* – индольное производное пиридохиназолина, алкалоид растения *Tetradium ruticarpum* (сем. Rutaceae), рекомендованного Китайской фармакопеей для использования в формулах традиционной китайской медицины и применявшегося в медицине Востока при расстройствах желудочно-кишечного тракта, при дизентерии. Предполагается противовоспалительное и противобластомное влияние алкалоида [11].

*Пеганин* с ядром хиназолина в структуре, алкалоид семян руты степной (*Peganum harmala*, сем. Zygophyllaceae) и других растений, применяемых в народной

медицине Китая, ряда стран Востока при лихорадке, коликах, желтухе. Противовоспалительное, противомикробное, цитотоксическое действие экстракта гармалы показано *in vitro* и *in vivo*. Так, при экспериментальном артрите, индуцированном полным адьювантом *Фрейнда*, после лечения вытяжкой семян гармалы обыкновенной отмечалось заметное уменьшение воспаления и артритических изменений, которые могут быть связаны с усилением внутриклеточной антиоксидантной защиты [12]. Для инкапсулированной богатой алкалоидами фракции *P. harmala* наблюдалась значительно увеличенная антиоксидантная и цитотоксическая активность против клеток рака яичников и клеток аденокарциномы молочной железы. При этом полученные нанокапсулы были биосовместимы при тестировании на фибробластах кожи человека [13].

*Эводиамин*, алкалоид *Evodia rutaecarpa* (синоним *Tetradium rutilcarpum*), индольное хиразолиноновое производное, оказывает противовоспалительное, антипролиферативное и антибактериальное действие. Применяется при опухолевых заболеваниях (лейкемии, меланоме, раке шейки матки, простаты, молочной железы, фибросаркоме). Возможные механизмы противоопухолевой активности эводиамин связываются с действием в качестве модулятора специфических рецепторов (топоизомеразы I, NF-каппа В и В-клеточная лимфома 2 (Vcl2)) [11, 14].

В ряду дериватов хиразолина и хиразолинона идентифицированы малотоксичные, интересные фармакологам вещества с высокой биологической активностью [2, 3, 15, 16].

#### *Противовоспалительное действие*

Производные хиразолинона-4 с различными заместителями проявляли выраженное противовоспалительное действие, которое было сопоставимо с эффектом диклофенака; подавляли рост патогенных микроорганизмов *in vitro* [4].

Соединения с тиохиразолиноновым каркасом ингибировали активность

фермента циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2). Некоторые из исследованных соединений показали двойное селективное ингибирование ЦОГ-2, при этом эффекты были сравнимы с действием референсных препаратов целекоксиба, диклофенака натрия и индометацина. Они также показали ингибирование 15-LOX (липоксигеназы), которое было сравнимо с влиянием zileутона и меклофенамата натрия. Вещества ингибировали дифференцировку моноцитов в макрофаги *in vitro*, при этом ряд соединений были более эффективны, чем диклофенак натрия. Противовоспалительная активность *in vivo* была установлена в тесте с формалиновым отеком лапы. Также, была показана приемлемая безопасность в отношении желудочно-кишечного тракта на экспериментальных животных [5].

Ингибирующая активность в отношении ЦОГ-2 / 5-ЛОКС показана для серии производных пиразолохиразолина, содержащих различные халконы. Для некоторых веществ была установлена более выраженная противовоспалительная активность *in vivo* по отношению к использованному в качестве препаратов сравнения целекоксибом и zileутоном [17].

3-замещенные производные хиразолинона-4 с различными заместителями (ароматическими, гетероциклическими аминами, иминокислотами), проявляли противовоспалительное действие. Исследование противовоспалительной активности гетерилпроизводных хиразолинона-4 методом молекулярного докинга показало, что соединения в большей степени ингибируют ЦОГ-2 и в меньшей мере ЦОГ-1, оказывая при этом более избирательное действие, нежели некоторые представители нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), превосходя в экспериментах по специфической активности диклофенак натрия [18].

Противовоспалительная активность показана для триазолохиразолинов, в ряду которых активность 5-хлор-2-замещенного

производного колебалась от более мощной до эквивалентной активности эталонного препарата кетопрофен. Для других замещенных триазолохиназолиновых производных в тесте отека лапы, индуцированного каррагенином, было показано противовоспалительное действие, сравнимое с влиянием референсного лекарственного средства индометацин [19].

Препарат проквизон, нестероидное противовоспалительное средство на основе хиназолина, производное арил-алкилхиназолинона, используется при терапии ревматоидного артрита, остеоартрита, остеоартроза, проявляет эффективность, сопоставимую с действием аспирина и диклофенака натрия. Выраженное противовоспалительное действие показано для нестероидного препарата флупроквизона, производного проквизона с фторсодержащим заместителем. Имеющееся в продаже производное тетразолохиназолина средство NSC127213 рекомендовано для лечения и профилактики воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний, является ингибитором рецепторов гистамина-1 и гистамина-4 [2].

Антагонист хемокинового рецептора типа 4 (CXCR4) хиназолиновое производное CX549 подавляло экспрессию воспалительных маркеров, оказывало противовоспалительное действие при ишемическом повреждении головного мозга, уменьшало активацию микроглии и способствовало функциональному восстановлению у животных, перенесших инсульт [20].

Производные хиназолинона-4 (3a-t) ингибировали растворимую эпексидгидролазу, метаболизирующую эпексидэйкозатриеновые кислоты, которые уменьшают воспаление. Подавление активности эпексидгидролазы для поддержания высоких уровней эпексидэйкозатриеновых кислот рассматривается как новый терапевтический подход для уменьшения воспаления, в том числе ослабления нейровоспаления [21].

Селективно ингибировали эпексидгидролазу хиназолинон-7-карбоксамиды, наиболее выражено производные хиназолинона с амидными и тиобензильными заместителями (соединения 34, 35, 37, 43). Соединение 34 также ингибировало белок, активирующий 5-липоксигеназу [22].

Для производных фенилхиназолинона-4 и их ациклических форм противовоспалительная активность оценена с использованием метода ватной гранулемы. Установлено, что все синтезированные вещества по проявляемой антиэкссудативной активности превышали препарат сравнения кетонал, а некоторые соединения были более эффективны, чем препарат сравнения индометацин. Также было показано, что ациклические формы проявляли меньшую активность по сравнению с циклическими производными [23].

Противовоспалительное действие показано для ряда хиназолинонов, синтезированных на основе хинолина и производных карбаминового ангидрида [24].

#### *Противовирусная активность*

Среди производных замещенных бромхиназолинонов ряд конъюгатов проявляли антивирусную активность против вируса *Varizella-Zoster* и антицитомегаловирусное действие, ингибировали репликацию штаммов вируса ветряной оспы дикого типа и с дефицитом тимидинкиназы, а также цитомегаловируса человека [25].

Некоторые дериваты хиназолинона активны как мощные ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа – 1 (ВИЧ-1) и мутантных штаммов, резистентных к влиянию нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1. Соединения активнее, имеют благоприятное связывание с белками сыворотки плазмы по сравнению с эфавиренцем (ненуклеозидным анти-ВИЧ-1 лекарственным средством), показали

хорошую пероральную биодоступность [26].

Синтезированные на основе фармакофоров ингибиторов интегразы ВИЧ производные хиназолина и хиназолинона были эффективны против ВИЧ, не проявляли значительной цитотоксичности [27].

Ряд amino- и бензиламино-производных хиназолинона-4 ингибировали SARS-CoV-2 и MERS-CoV, показали приемлемые результаты метаболической стабильности, ингибирования CYP, предварительных фармакокинетических исследований и аффинности связывания hERG (ген специфических калиевых каналов сердца (human Ether-a-go-go Related Gene). hERG кодирует белок, способствующий электрической активности сердца, играющий роль в координации сердцебиения [28]. Для оптимизированного N-ацетилпроизводного показаны улучшенные фармакокинетические характеристики, низкое связывание с каналами hERG, хорошая микросомальная стабильность, невысокая токсичность [29]. 6,7-диметоксипроизводные хиназолинона-4 *in vitro* ингибировали протеазы SARS-CoV-2 [30]. По данным молекулярного докинг-анализа оба изомера нового производного тетрагидрохиназолина оказались активными в отношении всех применяемых белков SARS-CoV-2 с наилучшей аффинностью связывания с папаиноподобной протеазой и неструктурным белком 3 [31].

Хиназолиновые дериваты ингибировали вирус чикунгунья, который распространялся через укусы инфицированных комаров и неоднократно поразил более 100 стран [32].

*Антимикробная, противопаразитарная, фунгицидная активность*

Производные триазолохиназолина проявляли выраженную антимикробную активность *in vitro* в отношении грамотрицательных и грамположительных клинически патогенных бактериальных

штаммов (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*) и штаммов грибов (*Aspergillus fumigatus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Geotricum candidum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *Penicillium expansum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*). В качестве эталонных антибактериальных препаратов использовались ампициллин и гентамицин, противогрибковый препарат амфотерицин В [33].

Среди производных хиназолинона, ингибиторов дигидрофолатредуктазы, выявлены соединения с высокой антибактериальной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и более эффективные, чем триметоприм, против *Escherichia coli* [34].

Хиназолинон-пептидные конъюгаты проявляли антимикробную активность по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям. Предполагается, что гибридные структуры могут быть перспективными для получения эффективных противомикробных агентов [35]. Антимикробное действие против полирезистентных *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium tuberculosis* оказывали гибриды хиназолина [36]. Тиопроизводные хиназолинона проявляли антибактериальное действие в отношении возбудителей *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. cerevisiae*. Триазольные дериваты 4(3H)-хиназолинона были активны против полирезистентного *Staphylococcus aureus*, а 3-фенильные производные были эффективны против метициллин- и ванкомицин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA и VRSA) [37].

Спирохиназолиндионы проявляли противомикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, были активны против грибов, сопоставимо, соответственно, с действием препаратов

сравнения хлорамфеникола и флуконазола [38]. Фторированные производные фумихиназолина и индолсодержащие пиразиновые хиназолиндионы проявляли антибиопленочное и ингибирующее эффлюксный насос действие в отношении репрезентативных видов бактерий и соответствующих клинически устойчивых штаммов [39].

Антимикробное действие другими исследователями определено для ряда соединений хиназолинона в отношении *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* [40]. Показано, что модификация структуры вещества, производного хиназолинона, при введении разных заместителей способно изменить степень гидрофильности, что, в конечном итоге, сказывается на степени проникновения лекарственного соединения сквозь мембрану клетки; может повлиять на способность образования промежуточных комплексов, стабилизированных водородными, ван-дер-ваальсовыми, стэкинг-взаимодействиями с мишенями ферментов, регуляторными белками рецепторов, сигнальными системами клеток возбудителя [41].

Для ряда производных хиназолинона изучено влияние на *N. fowleri* и *B. mandrillaris*, вызывающих амёбный менингоэнцефалит и гранулематозный амёбный энцефалит. Некоторые соединения были эффективны *in vitro*. Прикрепленные к структурам наночастицы серебра в ряде случаев усиливали активность. Наиболее эффективные соединения были малотоксичны для клеток человека [42]. Арильные диметоксипроизводные хиназолинона проявляли активность против *Acanthamoeba castellanii*, приводящую к развитию ослепляющего кератита и гранулематозного амёбного энцефалита [43].

С использованием ряда соединений, производных ацетамида на основе хиназолинона, установлено противопротозойное действие при экспериментальном висцеральном

лейшманиозе [44]. Производные трихлорметилхиназолина проявляли антиплазмодияльную активность по отношению к полирезистентному штамму *K1 P. falciparum* с использованием доксорубицина, хлорохина и доксициклина в качестве эталонных препаратов [45].

Противопаразитарный потенциал пиразиновых хиназолиндионов, содержащих индольные алкалоиды, показан в отношении *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* и *Leishmania infantum*. По данным исследования *in silico* соединения могут быть ингибиторами пролил-тРНК-синтетазы *Plasmodium* и *Leishmania* [46].

#### Противоопухолевое действие

Многочисленные известные противоопухолевые производные хиназолинона и хиназолинона – новый класс химиотерапевтических агентов, ингибирующих различные протеинкиназы и другие молекулярные мишени [1, 47]. Предполагаемые механизмы противоопухолевого действия различных производных хиназолинона: ингибирование ферментной системы репарации ДНК, EGFR, фермента тимидилата и полимеризации тубулина [48].

*Ралтитрексид* – один из противоопухолевых производных хиназолинона-4. Антиметаболит, специфический неконкурентный ингибитор тимидилатсинтазы, ключевого фермента синтеза тимидинтрифосфата, необходимого для образования цепи ДНК. Ингибирование тимидилатсинтазы приводит к фрагментации молекулы ДНК и гибели клетки. Ралтитрексид показан при раке, прежде всего колоректальном [49].

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) играет важную роль в онкогенезе различных форм опухолевых заболеваний. Нацеливание на мутантные формы EGFR оказалось привлекательным терапевтическим подходом и позволило разработать три поколения ингибиторов. Ядро хиназолинона представляет собой подходящий каркас для создания новых ингибиторов EGFR в связи с повышенной

аффинностью к активному центру киназы EGFR. К настоящему времени созданы пять хиназолиновых ингибиторов EGFR первого поколения (гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, вандетаниб и икотиниб) и два препарата второго поколения (афатиниб и дакомитиниб), используемых для терапии различных видов опухолей [50]. Обратимый селективный ингибитор тирозинкиназы EGFR *гефитиниб* показан для моно- и комбинированной терапии местнораспространенного или метастатического немелкоклеточного рака легкого у пациентов с положительным тестом на мутацию тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR-TK) [51].

Производные 4-анилинохиназолина продемонстрировали высокую активность в отношении мутации резистентности EGFR-C797S. Среди них соединение 14d показало высокий антипролиферативный эффект, дозозависимо приводило к существенной ингибирующей активности в отношении EGFR и его нижестоящих сигнальных путей, на модели ксенотрансплантата значительно подавляло рост опухоли, охватывало карман связывания АТФ и аллостерический сайт, оказалось эффективно как *in vitro*, так и *in vivo* [52]. В качестве потенциальных ингибиторов синтазы ацетогидроксикислот и киназ рецептора эпидермального фактора роста предложены бензилокси- и фенилхиназолиноны [53].

Аналоги меркапто-хиназолин-4-она демонстрировали противораковую активность *in vitro*, ингибировали дигидрофолатредуктазу и тирозинкиназу эпидермального фактора роста. Соединение 24 проявляло противоопухолевую активность широкого спектра с высоким профилем безопасности и индексом селективности, вызывало остановку клеточного цикла и апоптоз клеток рака толстой кишки. В качестве препаратов сравнения были использованы 5-фторурацил, гефитиниб, метотрексат. По данным молекулярного моделирования соединение 24 показало сходное с

гефитинибом связывание с аминокислотой Lys745 путем  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия. Соединение 37, аналогично метотрексату, взаимодействовало с Lys68, Asn64 и Phe31 [54].

Показана противоопухолевая активность анилинопроизводных соединений замещенного хиназолина, ингибирующих протеинкиназу [55].

Производные на основе хиназолина проявили высокую антипролиферативную активность против линий опухолевых клеток при лейкемии, раке толстой кишки, меланоме, раке молочной железы. Кроме того, соединение 16с демонстрировало цитотоксическую активность, превышающую в 10 раз действие адриамицина / доксорубина против десяти опухолевых клеточных линий, предположительно, связываясь с ДНК и действуя сходно с ломустином. Соединения 14g, 16с и 16а демонстрировали сильную аффинность связывания с рецепторами ДНК, EGFR и VEGFR-2 [56].

Дериват хиназолина *анагрелид*, ингибитор синтеза фосфодиэстеразы, при полицитемии препятствует созреванию мегакариоцитов в тромбоциты, показан при истинной полицитемии, эссенциальном тромбоцитозе, хроническом миелоидном лейкозе, для терапии тромбоцитемии при миелопролиферативных новообразованиях [57].

Производные 3-гидроксихиназолин-4(3H)-онов, имеющие в составе гидроксамовую кислоту, могут применяться для лечения онкологических заболеваний путем ингибирования гистоновых деацетилаз. Гистондеацетилазы – это ферменты, катализирующие удаление ацетильной группы  $\epsilon$ -N-ацетиллизина гистонов, модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Гистондеацетилазы представляют собой важную эпигенетическую мишень при лечении опухолевых заболеваний, а ингибиторы данных ферментов являются

успешными цитотоксическими агентами [58].

Производные хиназолинона рекомендованы в качестве модуляторов FGFR (рецепторов фактора роста фибробластов) киназ или их мутаций для лечения рака опосредованного FGFR киназой (множественной миеломы, в том числе с транслокацией t(4;14); миелопролиферативных нарушений; рака эндометрия, простаты, мочевого пузыря, легких, яичников, молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки, печени, почек, груди; плоскоклеточной карциномы, в том числе полости рта) [59].

Производные хиназолинона могут применяться в качестве ингибиторов танкираз для терапии и / либо профилактики развития опухолевых образований, разных воспалительных заболеваний, опосредованных активностью танкираз [60].

Получены производные хиназолинона, регулирующие уровень фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Фактор некроза опухоли- $\alpha$  – это противовоспалительный цитокин, играющий важную роль в иммунном гомеостазе, воспалении и иммунной защите организма. TNF- $\alpha$  – один из основных медиаторов воспаления, может также продуцироваться опухолями. TNF- $\alpha$  способен стимулировать образование опухолей, а также вызывать запрограммированную гибель опухолевых клеток, влиять на процессы апоптоза, некроза, ангиогенез, активацию иммунных клеток, дифференцировку и миграцию клеток, вовлеченных в генез и прогрессирование опухоли.

Неконтролируемая активность или повышенная продукция TNF- $\alpha$  ассоциируется с различными заболеваниями, в том числе, со злокачественными опухолями (толстой кишки, прямой кишки, молочной железы, головного мозга и кишечника) и воспалительными заболеваниями, ассоциируемыми со злокачественной опухолью. Дисрегуляция TNF- $\alpha$  может приводить к аутоиммунным заболеваниям,

синдрому токсического шока, кахексии, артриту, псориазу, ВИЧ-инфекции и СПИДу, сепсису, отторжению трансплантата и вирусным инфекциям. Снижение уровня либо регулирование активности TNF- $\alpha$  – перспективное направление для лечения ряда воспалительных, злокачественных, иммунологических заболеваний [61]. Ингибирующая активность в отношении продукции фактора некроза опухоли альфа и пролиферации Т-клеток показана для производных фтор- и нитрохиназолинов.

Конъюгаты замещенных бромхиназолинонов проявляли умеренную цитостатическую активность по отношению к клеточной линии лимфоцитов человека СЕМ, однако более выраженную, чем у 5-фторурацила, используемого в качестве препарата сравнения [25].

Для ряда ариламинопроизводных фторхиназолина продемонстрирована *in vitro* и *in vivo* противоопухолевая активность, возможно включающая каспазозависимый митохондриальный путь [62].

Антагонисты  $\alpha 1$ -адренорецепторов хиназолиновые производные *доксазозин*, *празозин* и *теразозин* *in vitro* индуцировали апоптоз, снижали рост клеток и пролиферацию как в гормоночувствительных (LNCaP), так и в гормонорезистентных (PC-3, DU-145) клеточных линиях рака предстательной железы. *In vivo*  $\alpha$ -антагонисты на основе хиназолинона предотвращали ангиогенез и уменьшали массу опухоли у мышей с моделированным раком предстательной железы. Празозин и доксазозин оказывали цитотоксическое действие как на кастрационно-резистентные, так и на андрогенчувствительные клетки рака предстательной железы, изменяя ряд белков-регуляторов пролиферации и апоптоза. Были исследованы антипролиферативные свойства других новых хиназолиновых соединений, родственных празозину и доксазозину [63].

Показаны противоопухолевые свойства производных дигидрохиназолина против клеточных линий колоректального рака [64].

В ряду синтезированных производных протеомиметических алкалоидов хиназолинона из морских природных продуктов, фумихиназолин G продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность на всех тестируемых опухолевых клеточных линиях, существенно не влияя на рост испытуемых незлокачественных клеток [65].

Синтезированные серии соединений – производных хиназолинона 5a-e и дигидрохиназолинона 10a-f в качестве цитостатических агентов показали *in vitro* потенциальную активность в отношении двух линий опухолевых клеток человека (MCF-7 и HCT-116). В качестве стандартного лекарственного средства использовался доксорубин [66].

Интеркаляционную активность в ДНК в качестве противоопухолевых агентов проявили производные триазолохиназолина, оцененные в отношении клеточных линий HepG2 и HCT-116. Для ряда дериватов была установлена более высокая активность, нежели для препарата сравнения доксорубин. Наиболее активные антипролиферативные производные были дополнительно оценены на их аффинность связывания с ДНК, которая выявила способность данных соединений интеркалировать ДНК. Для испытуемых соединений было установлено средство к ДНК-связыванию от умеренного до очень сильного, а также для большинства производных продемонстрирован хороший профиль ADMET [67].

Цитотоксическая активность *in vitro* в отношении трех линий раковых клеток человека была установлена для новой серии синтезированных на основе хиназолина соединений 8a-l, содержащих триазолацетамиды. Цитотоксический анализ показал, что наилучшую активность проявляли соединения 8f, 8k и 8a,

известные как наиболее эффективные цитостатики через 72 часа. Примечательно, что все производные демонстрировали ограниченную токсичность в отношении нормальной клеточной линии [68].

#### *Другие виды активности*

Селективный  $\alpha_1$ -адреноблокатор доксазозин снижает тонус шейки мочевого пузыря, гладкомышечных клеток стромы и капсулы простаты, назначается при гиперплазии простаты. Также, доксазозин ослаблял фиброз печени, ингибируя аутофагию в звездчатых клетках печени путем активации сигнального пути PI3K/Akt/mTOR [69].

Хиназолиноновое производное препарат *кетансерин* уменьшал воспаление, площадь соединительной ткани и повреждения в печени, способствовал нормализации биохимических показателей сыворотки крови, снижал полярность плазматической и митохондриальной мембраны гепатоцитов в районе белок-липидных контактов при лечении цирроза печени [70].

**Заключение.** Интерес, проявляемый к производным хиназолина и хиназолинона как к соединениям с противоинфекционным, противовоспалительным, цитостатическим действием является колоссальным и продолжает расти. Исследование новых производных данного ряда как веществ с полифармакологической активностью актуально, может способствовать повышению эффективности лекарственного лечения больных с воспалительными, инфекционными и опухолевыми заболеваниями, позволит уменьшить количество назначаемых препаратов, а также частоту и выраженность их побочных эффектов.

#### **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. Mass EB, Duarte GV, Russowsky D. The Quinazoline-Chalcone and Quinazolinone-Chalcone Hybrids: A Promising Combination for Biological Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(2):186-203. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389557520666200730160325>
2. Zayed MF. Medicinal Chemistry of Quinazolines as Analgesic and Anti-Inflammatory Agents. *ChemEngineering*. 2022;6(6):94. DOI: <https://doi.org/10.3390/chemengineering6060094>
3. Abuelizz HA, Al-Salahi R. Significant pharmacological activities of benzoquinazolines scaffold. *Pharmacological Reports*. 2023;75(2):223-235. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00453-9>
4. Alagarsamy V, Chitra K, Saravanan G, et al. An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;151:628-685. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.076>
5. Moussa G, Alaeddine R, Alaeddine LM, et al. Novel click modifiable thioquinazolinones as anti-inflammatory agents: Design, synthesis, biological evaluation and docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;144:635-650. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.065>
6. Gill J, Sharma A. Prospects of halofuginone as an antiprotozoal drug scaffold. *Drug Discovery Today*. 2022;27(9):2586-2592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.020>
7. Кучинский МП, Савчук ТМ, Кучинская ГМ, и др. Изучение токсичности антипротозойного ветеринарного препарата на основе производного хиназолинона. Эпизоотология, иммунологи́я, фармакология и санитария. 2022;1:68-74. DOI: <https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-68-74>
8. Tye MA, Payne NC, Johansson C, et al. Elucidating the path to Plasmodium prolyl-tRNA synthetase inhibitors that overcome halofuginone resistance. *Nature Communications*. 2022;13(1):4976. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32630-4>
9. Pitera AP, Szaruga M, Peak-Chew SY, et al. Cellular responses to halofuginone reveal a vulnerability of the GCN2 branch of the integrated stress response. *EMBO Journal*. 2022;41(11):e109985. DOI: <https://doi.org/10.15252/emboj.2021109985>
10. Lv T, Huang J, Wu M, et al. Halofuginone enhances the anti-tumor effect of ALA-PDT by suppressing NRF2 signaling in cSCC. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2022;37:102572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102572>
11. Li X, Ge J, Zheng Q, et al. Evodiamine and rutaecarpine from *Tetradium ruticarpum* in the treatment of liver diseases. *Phytomedicine*. 2020;68:153180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153180>
12. Singhai A, Patil UK. Amelioration of oxidative and inflammatory changes by *Peganum harmala* seeds in experimental arthritis. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00243-3>
13. Fahmy SA, Issa MY, Saleh BM, et al. *Peganum harmala* Alkaloids Self-Assembled Supramolecular Nanocapsules with Enhanced Antioxidant and Cytotoxic Activities. *ACS Omega*. 2021;6(18):11954-11963. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00455>
14. Fan M, Yao L. The Synthesis, Structural Modification and Mode of Anticancer Action of Evodiamine: A Review. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2022;17(3):284-296. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574892817666211221165739>
15. Manvelyan EA, Manvelyan MM, Codonidi IP, et al. Analgesic activity of new derivatives of quinazolinone-4. *Medical News of North Caucasus*. 2017;12(3):307-311. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12089>
16. Manvelyan MM, Manvelyan EA, Baturin VA, et al. Anticataleptic activity of 2-substituted derivatives of 3(*H*)-quinazolin-4-one. *Medical News of North Caucasus*. 2021;16(2):191-193. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12089>
17. Shaaban MA, Kamal AM, Faggal SI, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new pyrazoloquinazoline derivatives as dual COX-2/5-LOX inhibitors. *Archiv der Pharmazie*. 2020;353(11):2000027. DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202000027>
18. Кодониди ИП, Ларский МВ, Кодониди МИ, и др. Целенаправленный синтез

производных хиназолин-4(3H)-она и их ациклических предшественников с заданными фармакологическими свойствами. М.: Русайнс; 2022.

19. Abuelizz HA, Al-Salahi R. An overview of triazoloquinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *Bioorganic Chemistry*. 2021;115:105263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105263>

20. Yu SJ, Wu KJ, Wang YS, et al. Protective Effect of CXCR4 Antagonist CX807 in a Rat Model of Hemorrhagic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19):7085. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197085>

21. Hejazi L, Rezaee E, Tabatabai SA. Quinazoline-4(3H)-one derivatives as novel and potent inhibitors of soluble epoxide hydrolase: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic Chemistry*. 2020;99:103736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103736>

22. Turanlı S, Ergül AG, Jordan PM, et al. Quinazoline-4(3H)-one-7-carboxamide Derivatives as Human Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with Developable 5-Lipoxygenase Activating Protein Inhibition. *ACS Omega*. 2022;7(41):36354-36365. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04039>

23. Поладашвили РО. Исследование противовоспалительной активности производных хиназолинона-4 и их ациклических форм. Тенденции развития науки и образования. 2020;68(2):72-73. DOI: <https://doi.org/10.18411/lj-12-2020-71>

24. Manne MR, Panicker RR, Ramakrishnan K, et al. Synthesis and Biological Evaluation of a Series of Quinoline-Based Quinazolinones and Carbamic Anhydride Derivatives. *ChemistrySelect*. 2023;8(3):e202204508. DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.202204508>

25. Grabkowska-Drużyc M, Andrei G, Schols D, et al. Isoxazolidine Conjugates of N3-Substituted 6-Bromoquinazolinones—Synthesis, Anti-Varizella-Zoster Virus, and Anti-Cytomegalovirus Activity. *Molecules*. 2018;23:1889. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23081889>

26. Badolato M, Aiello F, Neamati N. 2,3-Dihydroquinazolin-4(1H)-one as a privileged scaffold in drug design. *RSC Advances*. 2018;8(37):20894-20921. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8ra02827c>

27. Alemi M, Kamali F, Vahabpour Roudsari R, et al. Synthesis, Biological Evaluation,

and Molecular Modeling Studies of New 8-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carbohydrazides as Potential Anti-HIV Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2022;21(1):e123962. DOI: <https://doi.org/10.5812/ijpr-123962>

28. Lee JY, Shin YS, Jeon S, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-benzylaminoquinazolin-4(3H)-one derivatives as a potential treatment for SARS-CoV-2. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2022;43(3):412-416. DOI: <https://doi.org/10.1002/bkcs.12470>

29. Shin YS, Lee JY, Jeon S, et al. Optimization of 2-Aminoquinazolin-4-(3H)-one Derivatives as Potent Inhibitors of SARS-CoV-2: Improved Synthesis and Pharmacokinetic Properties. *Pharmaceutics*. 2022;15(7):831. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15070831>

30. Чиряпкин АС, Кодониди ИП, Поздняков ДИ. Противокоронавирусная активность азометинов, тиенопиримидинов и производных 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она. *Аллея науки*. 2022;1(10):245-248.

31. Krysantieva AI, Voronina JK, Safin DA. A Novel Ambroxol-Derived Tetrahydroquinazoline with a Potency against SARS-CoV-2 Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4660. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24054660>

32. Hwu JR, Roy A, Tsay SC, et al. Computer-Aided Design and Synthesis of (Functionalized quinazoline)-(α-substituted coumarin)-arylsulfonate Conjugates against Chikungunya Virus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(14):7646. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23147646>

33. Abuelizz HA, El-Dib RA, Marzouk M, et al. In vitro evaluation of new 2-phenoxybenzo[g][1,2,4]triazolo[1,5-a]quinazoline derivatives as antimicrobial agents. *Microbial Pathogenesis*. 2018;117:60-67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.018>

34. Osman EO, Emam SH, Sonousi A, et al. Design, synthesis, anticancer, and antibacterial evaluation of some quinazolinone-based derivatives as DHFR inhibitors. *Drug Development Research*. 2023;84(5):888-906. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.22060>

35. Rakesh KP, Suhas R, Shivakumar, et al. Effect of low charge and high hydrophobicity on antimicrobial activity of the quinazolinone-peptide conjugates. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018;44(2):158-164. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1068162018020036>

36. Malasala S, Ahmad MN, Akunuri R, et

- al. Synthesis and evaluation of new quinazoline-benzimidazole hybrids as potent anti-microbial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;212:112996. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112996>
37. Gatadi S, Lakshmi TV, Nanduri S. 4(3H)-Quinazolinone derivatives: Promising antibacterial drug leads. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;170:157-172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.018>
38. Alghohary AM, Hassan AMA, Alzahrani AY, et al. Microwave-ultrasonic assisted synthesis, and characterization of novel 3'-(amino, hydrazino and hydrazide)-6'-bromo-spiro(isobenzofuran-1,2'-quinazoline)-3,4'-dione derivatives as antimicrobial agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2023;60(6):1014-1026. DOI: <https://doi.org/10.1002/jhet.4647>
39. Almeida MC, Szemerédi N, Durães F, et al. Effect of Indole-Containing Pyrazino[2,1-b]quinazoline-3,6-diones in the Virulence of Resistant Bacteria. *Antibiotics*. 2023;12(5):922. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050922>
40. Старикова АА, Самотруева МА, Золотарева НВ, и др. Изучение взаимосвязи антимикробной и гипогликемической активности новых хиназолинонов методами математического моделирования. *Прикаспийский вестник медицины и фармации*. 2023;4(1):63-70. DOI: <https://doi.org/10.29039/2712-8164-2023-1-63-70>
41. Самотруева МА, Старикова АА, Башкина О, и др. Биохимические основы антимикробной активности производных хиназолинона в свете представлений об особенностях химической структуры и способах связывания с молекулами-мишенями. *Обзор. Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах*. 2023;510(1):3-27. DOI: <https://doi.org/10.31857/S2686953522600672>
42. Mungroo MR, Shahbaz MS, Anwar A, et al. Aryl Quinazolinone Derivatives as Novel Therapeutic Agents against Brain-Eating Amoebae. *ACS Chemical Neuroscience*. 2020;11(16):2438-2449. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00596>
43. Shahbaz MS, Anwar A, Saad SM, et al. Antiamoebic activity of 3-aryl-6,7-dimethoxyquinazolin-4(3H)-one library against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology Research*. 2020;119(7):2327-2335. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06710-7>
44. Ansari A, Seth A, Dutta M, et al. Discovery, SAR and mechanistic studies of quinazolinone-based acetamide derivatives in experimental visceral leishmaniasis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023;257:115524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115524>
45. Amrane D, Gellis A, Hutter S, et al. Synthesis and Antiplasmodial Evaluation of 4-Carboxamido- and 4-Alkoxy-2-Trichloromethyl Quinazolines. *Molecules*. 2020;25(17):3929. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25173929>
46. Long S, Duarte D, Carvalho C, et al. Indole-Containing Pyrazino[2,1-b]quinazoline-3,6-diones Active against Plasmodium and Trypanosomatids. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2022;13(2):225-235. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00589>
47. Bansal R, Malhotra A. Therapeutic progression of quinazolines as targeted chemotherapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;211:113016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113016>
48. Das R, Mehta DK, Dhanawat M. Bestowal of Quinazoline Scaffold in Anticancer Drug Discovery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2021;21(11):1350-1368. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871520620666200627205321>
49. Kovalev IS, Zyryanov GV, Santra S, et al. Folic Acid Antimetabolites (Antifolates): A Brief Review on Synthetic Strategies and Application Opportunities. *Molecules*. 2022;27(19):6229. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196229>
50. Şandor A, Ionuț I, Marc G, et al. Structure–Activity Relationship Studies Based on Quinazoline Derivatives as EGFR Kinase Inhibitors (2017–Present). *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):534. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16040534>
51. Wang H, Zeng C, Li X, et al. Cost-utility of afatinib and gefitinib as first-line treatment for EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncology*. 2019;15(2):181-191. DOI: <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0692>
52. Dou D, Wang J, Qiao Y, et al. Discovery and optimization of 4-anilinoquinazoline derivatives spanning ATP binding site and allosteric site as effective EGFR-C797S inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;244:114856. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114856>

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114856>

53. Chen C-T, Chang Y-C, Tseng P-X, et al. Asymmetric Synthesis of Trifluoroethyl-Based, Chiral 3-Benzoyloxy-1- and -2-Phenylquinazolinones of Biomedicinal Interest by Radical Type Cross-Coupling to Olefins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1):513. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010513>

54. El-Gazzar YI, Ghaiad HR, El Kerdawy AM, et al. New quinazolinone-based derivatives as DHFR/EGFR-TK inhibitors: Synthesis, molecular modeling simulations, and anticancer activity. *Archiv der Pharmazie*. 2023;356(1):e2200417. DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202200417>

55. Li Y, Xiao J, Zhang Q, et al. The association between anti-tumor potency and structure-activity of protein-kinases inhibitors based on quinazoline molecular skeleton. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2019;27(3):568-577. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.032>

56. Cuartas V, Aragón-Muriel A, Liscano Y, et al. Anticancer activity of pyrimidodiazepines based on 2-chloro-4-anilinoquinazoline: synthesis, DNA binding and molecular docking. *RSC Advances*. 2021;11(38):23310-23329. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1ra03509f>

57. Kwiatkowski J, Kuliszkiwicz-Janus M, Rymer W, et al. Treatment of Essential Thrombocythemia with Anagrelide Is Associated with an Increased Risk of Worsened Kidney Function. *Pharmacology*. 2021;106(5-6):316-322. DOI: <https://doi.org/10.1159/000513377>

58. Осипов ВН, Балаев АН, Громыко АВ., и др. Производные 3-гидроксихиназолин-4(3H)-она в качестве ингибиторов гистондеацетилазы и способ их получения. Патент РФ RU 2740503 C1, 14.01.2021. Русский.

59. Анжибо ПР, Кероль ОАЖ, Пилатт ИНК, и др. Производное хиназолинона, применимые в качестве модуляторов FGFR киназы. Патент РФ RU 2701517 C2. 27.09.2019. Русский.

60. Дорш Д, Бухшталлер Х-П. Производные хиназолинона в качестве ингибиторов PARP. Патент РФ RU 2650107 C2. 09.04.2018. Русский.

61. Ли В-Ч, Ляо Б. Производное хиназолинона, способ его получения, фармацевтическая композиция и применение. Патент РФ RU 2730500C2. 24.08.2020. Русский.

62. Zhang Y, Hou Q, Li X, et al. Enrichment of novel quinazoline derivatives with

high antitumor activity in mitochondria tracked by its self-fluorescence. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;178:417-432. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.015>

63. King L, Christie D, Dare W, et al. Quinazoline alpha-adrenoreceptor blockers as an adjunct cancer treatment: From bench to bedside. *European Journal of Pharmacology*. 2021;893:173831. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173831>

64. Dahabiyeh LA., Hudaib F, Hourani W, et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach and in vitro assays revealed promising role of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives against colorectal cancer cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;182:106378. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106378>

65. Long S, Resende D, Kijjoa A, et al. Synthesis of new proteomimetic quinazolinone alkaloids and evaluation of their neuroprotective and antitumor effects. *Molecules*. 2019;24(3):534. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24030534>

66. Taayoshi F, Iraj A, Moazzam A, et al. Synthesis, molecular docking, and cytotoxicity of quinazolinone and dihydroquinazolinone derivatives as cytotoxic agents. *BMC Chemistry*. 2022;16(1):35. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00825-x>

67. El-Adl K, Ibrahim MK, Alesawy MSI, et al. [1,2,4]Triazolo[4,3-c]quinazoline and bis([1,2,4]triazolo)[4,3-a:4',3'-c]quinazoline derived DNA intercalators: Design, synthesis, in silico ADMET profile, molecular docking and anti-proliferative evaluation studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2021;30:115958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115958>

68. Pedrood K, Taayoshi F, Moazzam A, et al. Design, synthesis, and cytotoxic evaluation of quinazoline derivatives bearing triazole-acetamides. *Heliyon*. 2023;9(2):e13528. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13528>

69. Xiu AY, Ding Q, Li Z, et al. Doxazosin Attenuates Liver Fibrosis by Inhibiting Autophagy in Hepatic Stellate Cells via Activation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. 2021;15:3643-3659. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S317701>

70. Пан ЭС, Пахомова АВ, Ермакова НН, и др. Возрастные особенности эффектов кетансерина при экспериментальном циррозе печени. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022;174(8):166-171.

DOI: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-8-166-171>

### References

1. Mass EB, Duarte GV, Russowsky D. The Quinazoline-Chalcone and Quinazolinone-Chalcone Hybrids: A Promising Combination for Biological Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(2):186-203. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389557520666200730160325>
2. Zayed MF. Medicinal Chemistry of Quinazolines as Analgesic and Anti-Inflammatory Agents. *ChemEngineering*. 2022;6(6):94. DOI: <https://doi.org/10.3390/chemengineering6060094>
3. Abuelizz HA, Al-Salahi R. Significant pharmacological activities of benzoquinazolines scaffold. *Pharmacological Reports*. 2023;75(2):223-235. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00453-9>
4. Alagarsamy V, Chitra K, Saravanan G, et al. An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;151:628-685. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.076>
5. Moussa G, Alaeddine R, Alaeddine LM, et al. Novel click modifiable thioquinazolinones as anti-inflammatory agents: Design, synthesis, biological evaluation and docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;144:635-650. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.065>
6. Gill J, Sharma A. Prospects of halofuginone as an antiprotozoal drug scaffold. *Drug Discovery Today*. 2022;27(9):2586-2592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.020>
7. Kuchinsky MP, Savchuk TM, Kuchinskaya GM, et al. Study of the toxicity of an antiprotozoic veterinary preparation based on a derivative of hinazolinone. *Epizootology Immunobiology Pharmacology Sanitation*. 2022;1:68-74. Russian. DOI: <https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-68-74>
8. Tye MA, Payne NC, Johansson C, et al. Elucidating the path to Plasmodium prolyl-tRNA synthetase inhibitors that overcome halofuginone resistance. *Nature Communications*. 2022;13(1):4976. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32630-4>
9. Pitera AP, Szaruga M, Peak-Chew SY, et al. Cellular responses to halofuginone reveal a vulnerability of the GCN2 branch of the integrated stress response. *EMBO Journal*. 2022;41(11):e109985. DOI: <https://doi.org/10.15252/emj.2021109985>
10. Lv T, Huang J, Wu M, et al. Halofuginone enhances the anti-tumor effect of ALA-PDT by suppressing NRF2 signaling in cSCC. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2022;37:102572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102572>
11. Li X, Ge J, Zheng Q, et al. Evodiamine and rutaecarpine from *Tetradium ruticarpum* in the treatment of liver diseases. *Phytomedicine*. 2020;68:153180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153180>
12. Singhai A, Patil UK. Amelioration of oxidative and inflammatory changes by *Peganum harmala* seeds in experimental arthritis. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00243-3>
13. Fahmy SA, Issa MY, Saleh BM, et al. *Peganum harmala* Alkaloids Self-Assembled Supramolecular Nanocapsules with Enhanced Antioxidant and Cytotoxic Activities. *ACS Omega*. 2021;6(18):11954-11963. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00455>
14. Fan M, Yao L. The Synthesis, Structural Modification and Mode of Anticancer Action of Evodiamine: A Review. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2022;17(3):284-296. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574892817666211221165739>
15. Manvelyan EA, Manvelyan MM, Codonidi IP, et al. Analgesic activity of new derivatives of quinazolinone-4. *Medical News of North Caucasus*. 2017;12(3):307-311. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12089>
16. Manvelyan MM, Manvelyan EA, Baturin VA, et al. Anticatalytic activity of 2-substituted derivatives of 3(*H*)-quinazolin-4-one. *Medical News of North Caucasus*. 2021;16(2):191-193. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12089>
17. Shaaban MA, Kamal AM, Faggal SI, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new pyrazoloquinazoline derivatives as dual COX-2/5-LOX inhibitors. *Archiv der Pharmazie*. 2020;353(11):2000027. DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202000027>
18. Kodonidi IP, Larski MV, Kodonidi MI, et al. Targeted synthesis of quinazoline-4(3*H*)-one derivatives and their acyclic precursors with given pharmacological properties. *Moscow: Rusains*; 2022. Russian.
19. Abuelizz HA, Al-Salahi R. An

overview of triazoloquinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *Bioorganic Chemistry*. 2021;115:105263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105263>

20. Yu SJ, Wu KJ, Wang YS, et al. Protective Effect of CXCR4 Antagonist CX807 in a Rat Model of Hemorrhagic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19):7085. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197085>

21. Hejazi L, Rezaee E, Tabatabai SA. Quinazoline-4(3H)-one derivatives as novel and potent inhibitors of soluble epoxide hydrolase: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic Chemistry*. 2020;99:103736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103736>

22. Turanlı S, Ergül AG, Jordan PM, et al. Quinazoline-4(3H)-one-7-carboxamide Derivatives as Human Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with Developable 5-Lipoxygenase Activating Protein Inhibition. *ACS Omega*. 2022;7(41):36354-36365. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04039>

23. Poladashvili RO. Study of the anti-inflammatory activity of quinazolinone-4 derivatives and their acyclic forms. *Trends in the development of science and education*. 2020;68(2):72-73. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18411/ij-12-2020-71>

24. Manne MR, Panicker RR, Ramakrishnan K, et al. Synthesis and Biological Evaluation of a Series of Quinoline-Based Quinazolinones and Carbamic Anhydride Derivatives. *ChemistrySelect*. 2023;8(3):e202204508. DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.202204508>

25. Grabkowska-Drużyc M, Andrei G, Schols D, et al. Isoxazolidine Conjugates of N3-Substituted 6-Bromoquinazolinones—Synthesis, Anti-Varizella-Zoster Virus, and Anti-Cytomegalovirus Activity. *Molecules*. 2018;23:1889. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23081889>

26. Badolato M, Aiello F, Neamati N. 2,3-Dihydroquinazolin-4(1H)-one as a privileged scaffold in drug design. *RSC Advances*. 2018;8(37):20894-20921. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8ra02827c>

27. Alemi M, Kamali F, Vahabpour Roudsari R, et al. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling Studies of New 8-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carbohydrazides as Potential Anti-HIV Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2022;21(1):e123962. DOI: <https://doi.org/10.5812/ijpr-123962>

28. Lee JY, Shin YS, Jeon S, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-benzylaminoquinazolin-4(3H)-one derivatives as a potential treatment for SARS-CoV-2. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2022;43(3):412-416. DOI: <https://doi.org/10.1002/bkcs.12470>

29. Shin YS, Lee JY, Jeon S, et al. Optimization of 2-Aminoquinazolin-4-(3H)-one Derivatives as Potent Inhibitors of SARS-CoV-2: Improved Synthesis and Pharmacokinetic Properties. *Pharmaceuticals*. 2022;15(7):831. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15070831>

30. Chiryapkin AS, Kodonidi IP, Pozdnyakov MD. Anticoronavirus activity of azomethines, thienopyrimidines and derivatives of 6,7-dimethoxyquinazoline-4(3H)-one. *Alley of Science*. 2022;1(10):245-248. Russian.

31. Krysantieva AI, Voronina JK, Safin DA. A Novel Ambroxol-Derived Tetrahydroquinazoline with a Potency against SARS-CoV-2 Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4660. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24054660>

32. Hwu JR, Roy A, Tsay SC, et al. Computer-Aided Design and Synthesis of (Functionalized quinazoline)-(α-substituted coumarin)-arylsulfonate Conjugates against Chikungunya Virus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(14):7646. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23147646>

33. Abuelizz HA, El-Dib RA, Marzouk M, et al. In vitro evaluation of new 2-phenoxybenzo[g][1,2,4]triazolo[1,5-a]quinazoline derivatives as antimicrobial agents. *Microbial Pathogenesis*. 2018;117:60-67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.018>

34. Osman EO, Emam SH, Sonousi A, et al. Design, synthesis, anticancer, and antibacterial evaluation of some quinazolinone-based derivatives as DHFR inhibitors. *Drug Development Research*. 2023;84(5):888-906. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.22060>

35. Rakesh KP, Suhas R, Shivakumar, et al. Effect of low charge and high hydrophobicity on antimicrobial activity of the quinazolinone-peptide conjugates. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018;44(2):158-164. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1068162018020036>

36. Malasala S, Ahmad MN, Akunuri R, et al. Synthesis and evaluation of new quinazoline-benzimidazole hybrids as potent anti-microbial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*.

- 2021;212:112996. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112996>
37. Gatadi S, Lakshmi TV, Nanduri S. 4(3H)-Quinazolinone derivatives: Promising antibacterial drug leads. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;170:157-172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.018>
38. Alghohary AM, Hassan AMA, Alzahrani AY, et al. Microwave-ultrasonic assisted synthesis, and characterization of novel 3'-(amino, hydrazino and hydrazide)-6'-bromo-spiro(isobenzofuran-1,2'-quinazoline)-3,4'-dione derivatives as antimicrobial agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2023;60(6):1014-1026. DOI: <https://doi.org/10.1002/jhet.4647>
39. Almeida MC, Szemerédi N, Durães F, et al. Effect of Indole-Containing Pyrazino[2,1-b]quinazoline-3,6-diones in the Virulence of Resistant Bacteria. *Antibiotics*. 2023;12(5):922. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050922>
40. Starikova AA, Samotrueva MA, Zolotareva NV, et al. Study of the relationship between the antimicrobial and hypoglycaemic activities of new quinazolinones by mathematical modelling. *Caspian Journal of Medicine and Pharmacy*. 2023;4(1):63-70. Russian. DOI: <https://doi.org/10.29039/2712-8164-2023-1-63-70>
41. Samotrueva MA, Starikova AA, Bashkina O, et al. Biochemical basis of the antimicrobial activity of quinazolinone derivatives in the light of insights into the features of the chemical structure and ways of binding to target molecules. A review. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Chemistry, materials sciences*. 2023;510(1):3-27. Russian. DOI: <https://doi.org/10.31857/S2686953522600672>
42. Mungroo MR, Shahbaz MS, Anwar A, et al. Aryl Quinazolinone Derivatives as Novel Therapeutic Agents against Brain-Eating Amoebae. *ACS Chemical Neuroscience*. 2020;11(16):2438-2449. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00596>
43. Shahbaz MS, Anwar A, Saad SM, et al. Antiamoebic activity of 3-aryl-6,7-dimethoxyquinazolin-4(3H)-one library against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology Research*. 2020;119(7):2327-2335. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06710-7>
44. Ansari A, Seth A, Dutta M, et al. Discovery, SAR and mechanistic studies of quinazolinone-based acetamide derivatives in experimental visceral leishmaniasis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023;257:115524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115524>
45. Amrane D, Gellis A, Hutter S, et al. Synthesis and Antiplasmodial Evaluation of 4-Carboxamido- and 4-Alkoxy-2-Trichloromethyl Quinazolines. *Molecules*. 2020;25(17):3929. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25173929>
46. Long S, Duarte D, Carvalho C, et al. Indole-Containing Pyrazino[2,1-b]quinazoline-3,6-diones Active against Plasmodium and Trypanosomatids. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2022;13(2):225-235. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00589>
47. Bansal R, Malhotra A. Therapeutic progression of quinazolines as targeted chemotherapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;211:113016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113016>
48. Das R, Mehta DK, Dhanawat M. Bestowal of Quinazoline Scaffold in Anticancer Drug Discovery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2021;21(11):1350-1368. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871520620666200627205321>
49. Kovalev IS, Zyryanov GV, Santra S, et al. Folic Acid Antimetabolites (Antifolates): A Brief Review on Synthetic Strategies and Application Opportunities. *Molecules*. 2022;27(19):6229. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196229>
50. Şandor A, Ionuț I, Marc G, et al. Structure–Activity Relationship Studies Based on Quinazoline Derivatives as EGFR Kinase Inhibitors (2017–Present). *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):534. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16040534>
51. Wang H, Zeng C, Li X, et al. Cost-utility of afatinib and gefitinib as first-line treatment for EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncology*. 2019;15(2):181-191. DOI: <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0692>
52. Dou D, Wang J, Qiao Y, et al. Discovery and optimization of 4-anilinoquinazoline derivatives spanning ATP binding site and allosteric site as effective EGFR-C797S inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;244:114856. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114856>
53. Chen C-T, Chang Y-C, Tseng P-X, et al. Asymmetric Synthesis of Trifluoroethyl-Based, Chiral 3-Benzyloxy-1- and -2-Phenylquinazolinones of Biomedical Interest by Radical Type Cross-Coupling to Olefins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1):513.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010513>

54. El-Gazzar YI, Ghaiad HR, El Kerdawy AM, et al. New quinazolinone-based derivatives as DHFR/EGFR-TK inhibitors: Synthesis, molecular modeling simulations, and anticancer activity. *Archiv der Pharmazie*. 2023;356(1):e2200417. DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202200417>

55. Li Y, Xiao J, Zhang Q, et al. The association between anti-tumor potency and structure-activity of protein-kinases inhibitors based on quinazoline molecular skeleton. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2019;27(3):568-577. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.032>

56. Cuartas V, Aragón-Muriel A, Liscano Y, et al. Anticancer activity of pyrimidodiazepines based on 2-chloro-4-anilinoquinazoline: synthesis, DNA binding and molecular docking. *RSC Advances*. 2021;11(38):23310-23329. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1ra03509f>

57. Kwiatkowski J, Kuliszkievicz-Janus M, Rymer W, et al. Treatment of Essential Thrombocythemia with Anagrelide Is Associated with an Increased Risk of Worsened Kidney Function. *Pharmacology*. 2021;106(5-6):316-322. DOI: <https://doi.org/10.1159/000513377>

58. Osipov VN, Balaev AN, Gromyko AV., et al. 3-Hydroxyquinazolin-4(3H)-one derivatives as histone deacetylase inhibitors and methods for their preparation. Patent of the Russian Federation RU 2740503 C1, 01/14/2021. Russian.

59. Anjibo PR, Keroll OAJ, Pilatt INC, et al. Quinazolinone derivatives applicable as FGFR kinase modulators. Patent of the Russian Federation RU 2701517 C2. 27.09.2019. Russian.

60. Dorsch D, Buchstaller H-P. Quinazolinone derivatives as PARP inhibitors. Patent of the Russian Federation RU 2650107 C2. 09.04.2018. Russian.

61. Li W-CH, Liao B. Quinazolinone derivative, method of its preparation, pharmaceutical composition and application. Patent of the Russian Federation RU 2730500C2. 24.08.2020. Russian.

62. Zhang Y, Hou Q, Li X, et al. Enrichment of novel quinazoline derivatives with high antitumor activity in mitochondria tracked by its self-fluorescence. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;178:417-432. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.015>

63. King L, Christie D, Dare W, et al. Quinazoline alpha-adrenoreceptor blockers as an adjunct cancer treatment: From bench to bedside. *European Journal of Pharmacology*. 2021;893:173831. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173831>

64. Dahabiyeh LA., Hudaib F, Hourani W, et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach and in vitro assays revealed promising role of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives against colorectal cancer cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;182:106378. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106378>

65. Long S, Resende D, Kijjoa A, et al. Synthesis of new proteomimetic quinazolinone alkaloids and evaluation of their neuroprotective and antitumor effects. *Molecules*. 2019;24(3):534. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24030534>

66. Taayoshi F, Iraj A, Moazzam A, et al. Synthesis, molecular docking, and cytotoxicity of quinazolinone and dihydroquinazolinone derivatives as cytotoxic agents. *BMC Chemistry*. 2022;16(1):35. DOI:

<https://doi.org/10.1186/s13065-022-00825-x>

67. El-Adl K, Ibrahim MK, Alesawy MSI, et al. [1,2,4]Triazolo[4,3-c]quinazoline and bis([1,2,4]triazolo)[4,3-a:4',3'-c]quinazoline derived DNA intercalators: Design, synthesis, in silico ADMET profile, molecular docking and anti-proliferative evaluation studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2021;30:115958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115958>

68. Pedrood K, Taayoshi F, Moazzam A, et al. Design, synthesis, and cytotoxic evaluation of quinazoline derivatives bearing triazole-acetamides. *Heliyon*. 2023;9(2):e13528. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13528>

69. Xiu AY, Ding Q, Li Z, et al. Doxazosin Attenuates Liver Fibrosis by Inhibiting Autophagy in Hepatic Stellate Cells via Activation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. 2021;15:3643-3659. DOI:

<https://doi.org/10.2147/DDDT.S317701>

70. Pan ES, Pakhomova AV, Ermakova NN, et al. Age-related features of ketanserin effects on experimental liver cirrhosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022;174(8):166-171. Russian. DOI: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-8-166-171>

Статья поступила в редакцию 11 июля 2023 г.  
Поступила после доработки 8 февраля 2024 г.  
Принята к печати 16 февраля 2024 г.

Received 11 July 2023

Revised 8 February 2024

Accepted 16 February 2024

### Информация об авторах

**Микаэль Михайлович Манвелян**, аспирант по научной специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь, Российская Федерация, E-mail: mik.manvelyan@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0650-4093>.

**Элеонора Аслибековна Манвелян**, доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры фармацевтической химии и технологии лекарств ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь, Российская Федерация, E-mail: manveljan@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6936-0192>.

**Владимир Александрович Батурин**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии с курсом дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь, Российская Федерация, E-mail: stav.clin.pharm@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6892-3552>.

**Наталья Дмитриевна Бунятян**, доктор фармацевтических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»; заведующий кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Первый Московский

государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: ndbun@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9466-1261>.

### Information about the authors

**Mikael M. Manvelyan**, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.3.6. – Pharmacology, Clinical Pharmacology, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia, E-mail: mik.manvelyan@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0650-4093>.

**Eleonora A. Manvelyan**, Doct. Sci. (Pharmacy), Associate Professor, Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Technology, North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia, E-mail: manveljan@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6936-0192>.

**Vladimir A. Baturin**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology with a course of additional professional education, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia, E-mail: stav.clin.pharm@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6892-3552>.

**Natalia D. Bunyatyan**, Doct. Sci. (Pharmacy), Professor, Leading Researcher at the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; Head of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, E-mail: ndbun@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9466-1261>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-6

УДК 615

# Bioactivity of Vitamin D and *Tinospora cordifolia* Extract in Increasing Cathelicidin Synthesis and Regulating TNF Alpha Production in CD66a Cells

Ahmad S. Jamil<sup>1,2</sup> , Sri Widyarti<sup>1</sup> , Meddy Setiawan<sup>2</sup> , Muhaimin Rifa'i<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Brawijaya University,  
12-16 Veteran St., Malang, 65145, Indonesia

<sup>2</sup> University of Muhammadiyah Malang,  
246 Jalan Raya Tlogo Mas St., Malang, 65144, Indonesia

Corresponding author: Muhaimin Rifa'i (immunobiology@ub.ac.id)

## Abstract

**Background:** Cathelicidin is an antimicrobial peptide that plays an important function in the innate immune system as the first line of defense against infections. There is still not a lot of information on the compounds that keep the body's cathelicidin production going. **The aim of the study:** To observe the effect of vitamin D and *Tinospora cordifolia* Extract (TCE) for 28 days on the production of cathelicidin and (Tumor necrosis Factor) TNF alpha in CD66a cells shortly after the mice were infected with *E. coli*. **Materials and methods:** We conducted a study with five treatment groups using BALB/c mice. Normal Group (NG): standard diet without treatment, Infected Group (IG): standard diet and infected on day 29, Vitamin D Group (VDG): standard diet + Vitamin D 100 micrograms/kg body weight and infected on day 29, *Tinospora cordifolia* Group (TCG): standard diet + TCE 100 mg/kg body weight and infected on day 29, and Combination group (CG): standard diet+ Vitamin D 100 micrograms/kg body weight + TCE 100 mg/kg body weight and infected on day 29. On day 29, the spleen was isolated at the end of treatment, and the production of cathelicidin and TNF alpha in CD66a cells was evaluated using flow cytometry and analyzed using one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). **Results:** Our findings show that vitamin D significantly increases cathelicidin synthesis, suggesting that it can potentially improve innate immunity. While Vitamin D and TC combined increased cathelicidin production slightly, the effect was not statistically significant. Interestingly, neither vitamin D nor TC substantially affected TNF alpha production. The combination of vitamin D and TC, on the other hand, resulted in a considerable drop in TNF alpha levels, indicating a synergistic anti-inflammatory action. **Conclusion:** These findings suggest a possible avenue for exploiting vitamin D and TC's combined effects in enhancing immunological responses, particularly in cathelicidin production.

**Keywords:** Cathelicidin; CD66a; *Tinospora*; TNF alpha; vitamin D

**For citation:** Jamil AS, Widyarti S, Setiawan M, et al. Bioactivity of Vitamin D and *Tinospora cordifolia* Extract in Increasing Cathelicidin Synthesis and Regulating TNF Alpha Production in CD66a Cells. Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):111-119. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-6

**Introduction.** The innate immune system is the first component of the body's defense system that responds to an infection by a microorganism. One of the innate immune responses to infection is an increase in the production of CAP [1]. Research on cathelicidin (CAP) is essential, especially considering the recent rise in the incidence of infectious diseases and the rising concern over antibiotic resistance in microorganisms. CAP is a part of the innate immune system, especially humoral immunity, which plays a vital role in the homeostasis of immune systems [2]. Cathelicidins directly kill Gram-positive and Gram-negative bacteria and other pathogens. It can also increase phagocytosis by opsonizing bacteria and upregulating bacterial recognition receptors, degranulating neutrophils and mast cells, and upregulating inflammatory cytokines and cytokine receptors, which in turn increases intracellular toll-like receptor (TLR) signaling [3].

CAP synthesis can be stimulated naturally by the presence of an infection. On the other hand, the signaling mechanism of vitamin D through the vitamin D receptor (VDR) increases cathelicidin production, and therefore vitamin D induction increases cathelicidin synthesis [4]. It will be possible to design novel therapeutic strategies against a range of infectious disorders by comprehending how the vitamin D-cathelicidin axis functions in the human response to infection [5].

Proinflammatory cytokines such as TNF alpha are often expressed simultaneously at higher levels in granulocyte cells after increasing the level of CAP [6]. The body typically produces more proinflammatory cytokines in response to infection to bring various immune-competent cells to the infection site. However, there are situations where an overabundance of proinflammatory cytokines might worsen infections and inflammation.

On the other hand, plant extracts contain plenty of bioactive substances that may modulate the immunological response in the body. Many plants have been investigated for

the content of anti-inflammatory substances such as polyphenols, flavonoids, and terpenoids [7]. *Tinospora cordifolia* (TC) is a plant widely used for traditional remedies in South and Southeast Asia. This plant has also been found to possess bioactive chemicals with anti-inflammatory properties. In silico analysis reveals that TC can potentially inhibit inflammatory activities by targeting and inhibiting the enzymatic activity of COX-2, suggesting a potential anti-inflammatory mechanism for TC [8]. TC has been shown to suppress TNF alpha and IL-1beta production in dendritic cells treated with LPS [9]. TC also inhibits inflammation in LPS-induced THP-1 cells by inactivating the NF- $\kappa$ B pathway, underscoring its potential as an anti-inflammatory agent targeting this essential signaling pathway [10].

CD66a, also known as Carcinoembryonic-antigen-related cell-adhesion molecule 1 (CEACAM1), is a marker that is expressed on the membrane of myeloid hematopoietic cells such as neutrophils, eosinophils, and basophils, which are collectively known as granulocyte cells [11]. Although neutrophils are the most dominant cells expressing CEACAM1 [12], this marker is also expressed by macrophages, B cells, T cells, NK cells, and platelets in mice [13].

**The aim of the study.** There has been limited research on combining vitamin D and plant extracts, particularly TC, in boosting CAP and regulating proinflammatory cytokines in granulocyte cells. Since CD66a subset cells, including neutrophils, express/produce CAP, this study focuses on monitoring the production of CAP and TNF alpha in CD66a subset cells after 28 days of administration of vitamin D, TC, and a combination of both and following treatment *E. coli* infection on day 29. The findings of this study are expected to determine the effect of combining vitamin D and TC treatment in increasing CAP production and controlling TNF alpha production after acute infection (6 hours after *E. coli* infection) as an effort to support the function of the innate immune system.

## Materials and Methods

### *Ethical clearance*

The Health Research Ethics Committee of the University of Muhammadiyah Malang granted ethical approval for the experimental animal treatment process with the number E.5a/254/KEPK-UMM/XII/2022.

### *Material preparations*

Vitamin D (cholecalciferol) is a product of Blackmores Vitamin D3 1000 IU in a liquid dosage form. *Tinospora cordifolia* (TC) herbal Simplicia was obtained and determined at the UPT Balai Materia Medika, Batu City, East Java, Indonesia. The simplicia was ground into powder and macerated for three days with 96% ethanol 1:3 (w/v). The macerate was filtered, and the filtrate was concentrated using a rotary evaporator until a stable weight. TC was then stored in the refrigerator at 4°C until it was utilized.

### *Animal and Treatment*

The animals used in the present study were female BALB/c mice purchased from the Malang Wistar Farm in the Indonesian province of East Java's Dau District of Malang. A total of 25 normal female BALB/c mice weighing about 20-25 g and aged 6-8 weeks were kept in cages under regulated conditions. During the experiment, they were given free access to a standard pellet diet and water every day. Experimental mice were divided into five treatment groups:

a. Normal Group: healthy mice were given a standard diet and daily administration of distilled water for 28 days without infection on the day 29th;

b. Infected Group: healthy mice were given a standard diet and distilled water orally every day for 28 days and infected with *E. coli* on the 29th day;

c. Vitamin D Group: mice were given an oral vitamin D dose of 100 micrograms/kg body weight every day for 28 days and infected with *E. coli* on the 29th day;

d. *Tinospora cordifolia* Group: mice were administered orally with *Tinospora cordifolia* (TC) extract at a dose of 100 mg/kg body weight every day for 28 days and infected with *E. coli* on the 29th day;

e. Combination group of vit D + TC + infected: mice were given oral vitamin D 100 micrograms/kg bw + TC extract 100 milligrams/kg bw daily for 28 days and were infected with *E. coli* on the 29th.

### *Sacrificing BALB/c mice model and cell isolation*

The mice were dissected by neck dislocation on the 29th day of treatment, six hours after *E. coli* infection. The spleen was isolated. After that, Phosphate Buffer Solution (PBS) is used to cleanse the organs. Then, 1 mL of PBS was added to a Petri dish, and each organ was crushed clockwise. Then, the splenic suspension was centrifuged at 4°C for 5 minutes at 2500 rpm. 1 mL of PBS was added to the homogenate before centrifuging for 5 minutes at 2500 rpm and 4°C. The pellet was stained with the specific antibody once the supernatant was discarded.

### *Immunostaining and flow cytometry analysis*

Pellets taken from the spleen were stained with FITC-conjugated anti-mouse CD66a for extracellular staining, and they were then incubated at 4 °C for 20 minutes in a darkened chamber. Samples were fixed with Cytfix/Cytoperm for intracellular staining, and they were then incubated at 4 °C for 20 minutes in a darkened chamber. Subsequently, the sample was mixed with 500 ml of intracellular staining and permeabilization wash solution and centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes at 4°C. Anti-mouse TNF alpha conjugated with PE and anti-mouse CAP conjugated with Pe-Cy7 were used to stain spleen pellets. Every sample was incubated for 20 minutes at 4°C in a darkened chamber. Following incubation, flow cytometry (BD Biosciences FACS CantoII) was used to examine the samples. BD CellQuest Pro™ was used to analyze the data and determine the relative sum of each parameter.

### *Statistical analysis*

The data were presented as mean ± SE. The significant differences in the group were determined using one-way ANOVA, followed by an LSD post hoc test with p 0.05. The experiment was replicated three times.

**Results and Discussion.** This is an in vivo intervention study to assess the production of CAP and TNF alpha in the CD66a subset cells after treatment of vitamin D, *Tinospora cordifolia* extract (TC), or a combination of both. The main objective of this study was to determine the effectiveness of combining vitamin D and TC in increasing CAP production and controlling TNF alpha as proinflammatory cytokines, thus helping to increase the efficacy of CAP in reducing the risk of infection and preventing hyperinflammation.

The data shown in Fig 1 clearly illustrate how vitamin D supplementation affects CAP

production in the mouse CD66a cell subgroup. Compared to the other treatments, vitamin D administration for 28 days seems to have a higher level of CAP production. Induction of *E. coli* infection in four groups other than the standard group appeared to elevate CAP production in CD66a cells, though not to the same level as the infection + vitamin D treatment. Interestingly, the infection + TC treatment showed that CAP production was identical to the healthy (non-infected) control. According to data analysis on the TC treatment, CAP production was lower than in the infection, vitamin D, and combination groups.

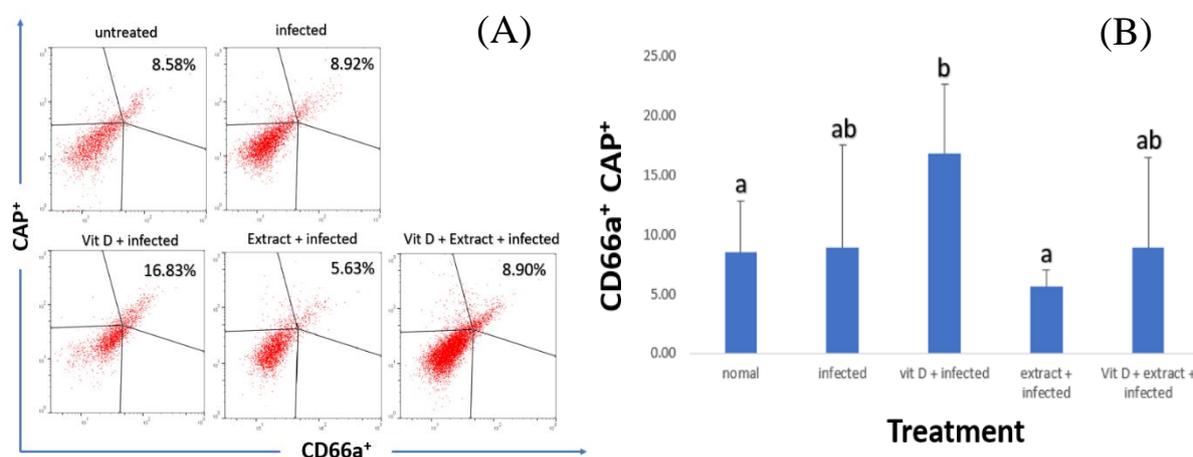


Fig. 1. (A) detection of Cathelicidin (CAP) production in CD66a+ cell subset by dot plot flow cytometry analysis; (B) histogram of comparison of results between treatment groups. Based on the statistical analysis results, the Vitamin D treatment showed higher CAP production than all existing treatments. The combination of Vitamin D and TC group seems to increase CAP production, although not statistically significant. TC did not affect CAP production, as seen from the similarity level of TC production between the standard and TC-treated groups. Different letters on each bar chart indicate significant differences between treatment groups ( $p < 0.05$ ) using the ANOVA and post hoc tests using LSD.

The administration of vitamin D demonstrates higher cathelicidin production compared to other treatments. Vitamin D [4] is one of the chemicals that effectively stimulates cathelicidin production. Vitamin D in the form of 1,25(OH)2D3, is a ligand of the vitamin D receptor protein (VDR) and activates a set of genes that control the innate and adaptive immune systems, including boosting cathelicidin production [14]. It is known that cathelicidin production is indeed derived from the activation of the vitamin D receptor (VDR)

[15, 16] in various cell types, including macrophages and granulocytes in the blood [17]. Vitamin D influences the expression of cathelicidin hCAP/LL-37 and also impacts cytokine production while simultaneously regulating several vital physiological functions such as calcium and phosphate regulation, bone metabolism, including keratinocyte growth and differentiation, and bone formation [18].

Multiple pathways, including the MEK-ERK signaling pathway, regulate cathelicidin synthesis [19]. The MEK-ERK signaling pathway is involved in butyrate-mediated cathelicidin induction in colon epithelial cells. In addition, a recent study suggests that butyrate-induced expression of CRAMP depends on both ERK and p38 MAPK activities [20]. However, cathelicidin synthesis can vary depending on the type of cell. It is also synthesized under varying conditions. For instance, human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)/LL-37 is regulated by vitamin D receptor (VDR)-dependent processes in various cell types. However, VDR-independent pathways involving endoplasmic reticulum (ER) stress signaling can also induce CAMP expression. Infections, wounds, UV radiation, and disruptions to the permeability barrier can all produce this stress signal [21].

TC did not affect CAP production, as seen from the similarity level of TC production between the standard and TC-treated groups. Nevertheless, some research results indicate that TC significantly enhances the innate immune system's function, albeit indirectly, by not increasing CAP production. TC contains

the polysaccharide G1-4A, which can boost the innate immune system response by activating the TLR4 receptor pathway in macrophage cells [22]. In macrophage cells in vitro, water and methanol-extracted TC applications increase the immune response, characterized by elevated levels of proinflammatory cytokines such as TNF alpha, IFN gamma, and IL-1b [23]. Furthermore, in vivo studies have shown that TC extract administration can enhance the innate immune profile, particularly in infection prevention in experimental animals exposed to infections [24].

Fig. 2 shows that CAP production appears to be connected to TNF alpha production. In mice models, infection factors and vitamin D administration enhanced CAP and TNF alpha production, but TC administration decreased TNF alpha and CAP production. In this investigation, vitamin D and TC extract were administered to experimental mice to see if they may improve the immune system. Many vitamin D deficiencies are related to an increase in the severity of infectious diseases, and supplementing vitamin D in the diet can decrease the severity of infections [25].

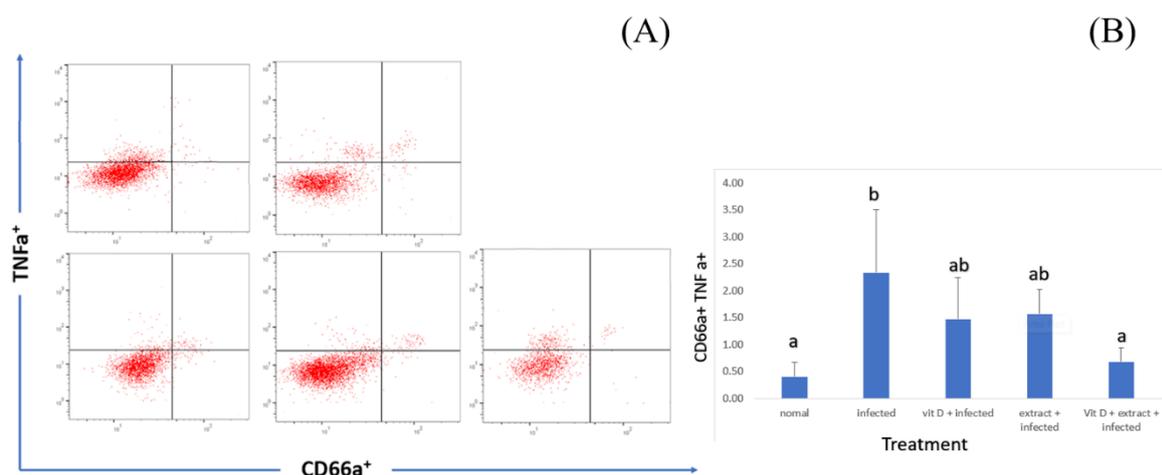


Fig. 2. (A) detection of TNF alpha production in CD66a+ cell subset by Flow Cytometry dot plot analysis; (B) histogram of comparison of results between treatment groups. Based on this analysis, TNF alpha production was reduced by vitamin D therapy in a single form, although this effect was not statistically significant in the same way with TC. An interesting finding is that treating subjects with both vitamin D and TC can considerably decrease TNF alpha production. Different letters on each bar chart indicate significant differences between treatment groups ( $p < 0.05$ ) using the ANOVA and post hoc tests using LSD.

Due to its ability to modulate the immune system, TC is categorized as an immunomodulatory plant [26], which means it can assist in regulating the immune system. However, there is some indication that TC may stimulate the immune system, which may be seen as immunosuppressive under certain situations. In RAW 264.7 cells, TC extract was observed to decrease TNF-alpha gene expression [27]. TC has been demonstrated to lower important immunological mediators of inflammation, such as TNF-alpha, in an autoimmune arthritis investigation [28]. TC chloroform extract was discovered to be supportive in reducing TNF-alpha production in THP-1 macrophages [10]. TC contains an extensive quantity of phenolic and flavonoid substances and has been shown to decrease the elevated production of TNF alpha in monocyte cells (THP-1) via the NF-kB pathway [7]. As a result, the combination of Vitamin D and TC is expected to increase CAP production while limiting inflammation.

A marker known as CD66a, referred to as CEACAM1, is expressed on the membrane of neutrophils, eosinophils, and basophils, which are all recognized as granulocyte cells in the myeloid pathway of the hematopoietic origin [11]. In addition to serving as a marker, CEACAM1 regulates leukocyte functions such as angiogenesis, tumor growth, cell migration, and proliferation [29]. Although this marker is known to be expressed by a variety of leukocyte cells, including macrophages, B cells, T cells, NK cells, and platelets in mice, neutrophils are known to be the most dominant cells expressing CEACAM1 [12]. Granulocyte Monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) treatment can intensify CAECAM1 production in granulocyte cells [29].

In this study, *E. coli* was induced to observe the innate immune response, specifically in the CD66a leukocyte cell subset. *E. coli*'s cell wall contains Lipopolysaccharide (LPS). LPS stimulates the immune system in intestinal epithelial cells by initially recognizing Toll-Like Receptor-4 (TLR4). TLR4 activation causes nuclear factor kappa B (NF-kB) and other transcription factors to be triggered, resulting in CAP

production [30]. In addition to infection, administering certain natural chemicals, such as vitamin D and several plant bioactive components, can boost CAP production [31, 32]. On the other hand, giving several plant bioactive chemicals can also suppress pro-inflammatory cytokines like TNF alpha [33].

**Conclusion.** In conclusion, the findings from this study shed light on the responses of CD66a cells to different treatments. Vitamin D became a potent stimulator, significantly elevating cathelicidin (CAP) production. *Tinospora cordifolia* (TC) demonstrated the ability to suppress the synthesis of TNF alpha in these cells. Notably, vitamin D exhibited a more pronounced influence on the increased levels of CAP compared to other treatments. At the same time, TC showed potential in moderating TNF alpha production in CD66a cells. The combination of vitamin D and TC, on the other hand, resulted in a considerable drop in TNF alpha levels, indicating a synergistic anti-inflammatory action. In short, the findings of this study demonstrate the beneficial impacts of vitamin D on CAP formation as well as *Tinospora cordifolia*'s ability to suppress TNF alpha synthesis in CD66a cells. Furthermore, it appears that the combination of vitamin D and TC has a synergistic anti-inflammatory impact, indicating a potential therapeutic strategy for modifying immune responses in the relevant conditions.

#### Financial support

*Our Study is supported by the Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP)/Indonesia Endowment Fund for Education of the Republic of Indonesia as the research funding provider. The number of the grant: 0001004/IPA/D/PDD-2020.*

#### Conflict of interests

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

#### References

1. Alford MA, Baquir B, Santana FL, et al. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance.

Frontiers in Microbiology. 2020;11:1-18. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01902>

2. Mookherjee N, Brown KL, Hancock REW. Cathelicidins [Internet]. Second Edi. Handb. Biol. Act. Pept. Elsevier Inc.; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00015-4>. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00015-4>

3. van Harten RM, van Woudenberg E, van Dijk A, Haagsman HP. Cathelicidins: Immunomodulatory antimicrobials. Vaccines. 2018;6(3):63. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines6030063>

4. Lee WJ, Cha HW, Sohn MY, et al. Vitamin D increases expression of cathelicidin in cultured sebocytes. Archives of Dermatological Research. 2012;304:627-632. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1255-z>

5. Chung C, Silwal P, Kim I, et al. Vitamin D-cathelicidin axis: At the crossroads between protective immunity and pathological inflammation during infection. Immune Network. 2020;20:1-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.4110/in.2020.20.e12>

6. Grabulosa CC, Manfredi SR, Canziani ME, et al. Chronic kidney disease induces inflammation by increasing Toll-like receptor-4, cytokine and cathelicidin expression in neutrophils and monocytes. Experimental Cell Research. 2018;365(2):157-162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.022>

7. Reddi KK, Tetali SD. Dry leaf extracts of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers attenuate oxidative stress and inflammatory condition in human monocytic (THP-1) cells. Phytomedicine. 2019;61:152831. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152831>

8. Widodo WT, Widyarti S, Sumitro SB, et al. In silico study of Tyramine-Fe complex in *Brotowali* (*Tinospora crispa*) as anti-inflammatory. In: Proceedings of the 11th Annual International Conference on Industrial Engineering and Operations Management Singapore, March 7-11, 2021:3473-3480.

9. Jacob J, Babu BM, Mohan MC, et al. Inhibition of proinflammatory pathways by bioactive fraction of *Tinospora cordifolia*. Inflammopharmacology. 2018;26:531-538. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0319-2>

10. Philip S, Tom G, Balakrishnan Nair P, et al. *Tinospora cordifolia* chloroform extract inhibits LPS-induced inflammation via NF- $\kappa$ B inactivation in THP-1 cells and improves survival in sepsis. BMC Complementary Medicine and Therapies. 2021;21:97. DOI:

<https://doi.org/10.1186/s12906-021-03244-y>

11. Ismail MM, Zaghoul A, Abdulateef N, et al. Membranous Expression of pan CD66, CD66a, CD66b, and CD66c and their Clinical Impact in Acute Leukemia: Cross Sectional Longitudinal Cohort Study in Saudi Arabia. Journal of Leukemia. 2017;5:1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6917.1000230>

12. Zhang Y, Wang Y, Wu W, et al. Elevation of neutrophil carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 associated with multiple inflammatory mediators was related to different clinical stages in ischemic stroke patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2022;36(7):e24526. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24526>

13. Thirion G, Feliu AA, Coutelier JP. CD 66 a ( CEACAM 1 ) expression by mouse natural killer cells. Immunology. 2008;125:535-540. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02867.x>

14. Koivisto O, Hanel A, Carlberg C. Key vitamin D target genes with functions in the immune system. Nutrients. 2020;12(4):1140. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12041140>

15. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D 3. FASEB Journal. 2005;19(9):1067-1077. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.04-3284com>

16. Al-Jaberi FAH, Crone CG, Lindenstrøm T, et al. Reduced vitamin D-induced cathelicidin production and killing of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages from a patient with a non-functional vitamin D receptor: A case report. Frontiers in Immunology. 2022;13:1038960. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1038960>

17. Schröder-Heurich B, Springer CJP, von Versen-Höynck F. Vitamin d effects on the immune system from periconception through pregnancy. Nutrients. 2020;12(5):1432. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12051432>

18. Svensson D, Nebel D, Nilsson BO. Vitamin D3 modulates the innate immune response through regulation of the hCAP-18/LL-37 gene expression and cytokine production. Inflammation Research. 2016;65:25-32. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0884-z>

19. Méndez-Samperio P, Miranda E, Trejo A. Expression and secretion of cathelicidin LL-37 in human epithelial cells after infection by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Clinical and Vaccine Immunology.

- 2008;15(9):1450-1455. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00178-08>
20. Li G, Domenico J, Jia Y, et al. NF- $\kappa$ B-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2009;150(2):122-132. DOI: <https://doi.org/10.1159/000218115>
21. Park K, Elias PM, Oda Y, et al. Regulation of cathelicidin antimicrobial peptide expression by an Endoplasmic Reticulum (ER) stress signaling, vitamin D receptor-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(39):34121-34130. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.250431>
22. Gupta PK, Chakraborty P, Kumar S, et al. G1-4A, a Polysaccharide from *Tinospora cordifolia* Inhibits the Survival of *Mycobacterium tuberculosis* by Modulating Host Immune Responses in TLR4 Dependent Manner. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0154725. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154725>
23. Alsuhaibani S, Khan MA. Immune-stimulatory and therapeutic activity of *tinospora cordifolia*: Double-edged sword against salmonellosis. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:1787803. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1787803>
24. Malve H, More D, More A. Effects of two formulations containing *Phyllanthus emblica* and *Tinospora cordifolia* with and without *Ocimum sanctum* in immunocompromised mice. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2021;12(4):682-688. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2021.06.021>
25. Gönen MS, Alaylıoğlu M, Durcan E, et al. Rapid and effective vitamin d supplementation may present better clinical outcomes in covid-19 (Sars-cov-2) patients by altering serum inos1, il1b, ifng, cathelicidin-ll37, and icam1. *Nutrients*. 2021;13(11):4047. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13114047>
26. Yates CR, Bruno EJ, Yates MED. *Tinospora Cordifolia*: A review of its immunomodulatory properties. *Journal of Dietary Supplements*. 2022;19(2):271-285. DOI: <https://doi.org/10.1080/19390211.2021.1873214>
27. Ghatpande NS, Misar A V, Waghole RJ, et al. *Tinospora cordifolia* protects against inflammation associated anemia by modulating inflammatory cytokines and hepcidin expression in male Wistar rats. *Scientific Reports*. 2019;9:10969. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47458-0>
28. Sannegowda K, Venkatesha S, Moudgil K. *Tinospora cordifolia* inhibits autoimmune arthritis by regulating key immune mediators of inflammation and bone damage. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2015;28(4):521-531. DOI: <https://doi.org/10.1177/0394632015608248>
29. Singer BB, Klaile E, Scheffrahn I, et al. CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *European Journal of Immunology*. 2005;35(6):1949-1959. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200425691>
30. Holani R, Babbar A, Blyth GAD, et al. Cathelicidin-mediated lipopolysaccharide signaling via intracellular TLR4 in colonic epithelial cells evokes CXCL8 production. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1785802. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1785802>
31. Febriza A, Natzir R, Hatta M, et al. Curcumin effects in inducing mRNA gene cathelicidin antimicrobial peptide in Balb/c mice infected with *Salmonella typhi*. *Journal of Biological Research*. 2020;93:76-80. DOI: <https://doi.org/10.4081/jbr.2020.8942>
32. Zhao L, Tan S, Zhang H, et al. *Astragalus polysaccharides* exerts anti-infective activity by inducing human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in respiratory epithelial cells. *Phytotherapy Research*. 2018;32(8):1521-1529. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6080>
33. Guo BJ, Bian ZX, Qiu HC, et al. Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;1401(1):37-48. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.13414>

Received 21 November 2023

Revised 8 January 2024

Accepted 2 February 2024

#### Information about the authors

**Ahmad S. Jamil**, Doctoral Student at the Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University; Lecturer at the Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Muhammadiyah Malang, Malang, Indonesia, E-mail: [shobrun@umm.ac.id](mailto:shobrun@umm.ac.id), [shobrunjamil85@gmail.com](mailto:shobrunjamil85@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9903-0055>.

**Sri Widarty**, Doctor, Associate Professor at the Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang, Indonesia, E-mail: [swid@ub.ac.id](mailto:swid@ub.ac.id), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9100-7544>.

**Meddy Setiawan**, Medical Doctor, Internist Specialist, Associate Professor at the Faculty of Medicine, University of Muhammadiyah Malang, Malang, Indonesia, E-mail: meddy\_umm@yahoo.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6424-9788>.

**Muhaimin Rifa'i**, Doctor of Philosophy in Medical Science, Professor at the Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang, Indonesia, E-mail: [immunobiology@ub.ac.id](mailto:immunobiology@ub.ac.id), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5731-2951>.

## КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА MEDICINE



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-7

УДК 597.5:616-053.9

# Использование рыб зебраданио (*Zebrafish*) в качестве модельных объектов для изучения возраст-ассоциированных заболеваний (обзор)

Л.И. Лашенова<sup>1</sup> , В.Н. Перфилова<sup>1</sup> , Г.Л. Снигур<sup>1</sup> , А.В. Калуев<sup>2,3</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет», площадь Павших Борцов, д. 1, г. Волгоград, 400131, Российская Федерация

<sup>2</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский просп., д. 1, п.г.т. Сириус, 354340, Российская Федерация

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

Автор для переписки: Л.И. Лашенова (*mih-li@mail.ru*)

### Резюме

**Актуальность:** Старение – эволюционно детерминированный длительный биологический процесс, приводящий к снижению функциональных возможностей организма. С увеличением количества людей старшего возраста в популяции приоритетным направлением здравоохранения становится изучение механизмов возраст-ассоциированных заболеваний и поиск лекарственных средств для их коррекции с целью улучшения качества жизни. В ряде экспериментов было показано, что у рыб зебраданио (*Danio rerio*, *Zebrafish*) развиваются девять известных признаков естественного старения организма, свойственных человеку. Хотя геном этих рыб всего на 70% гомологичен человеческому, он обнаруживает более 80% ортологов генов его болезней. Рыбы не требуют высоких затрат в содержании, их изучение возможно с раннего эмбриогенеза до глубокой старости, и живут в лаборатории они гораздо дольше, чем, например, мыши. И несмотря на ограничения, включающие 10-15% различий с человеком в таргетах, дубликацию 25% генов, отличную от теплокровных фармакокинетику, актуальным является использование зебраданио в качестве объекта для моделирования возраст-ассоциированных заболеваний и исследования на них фармакологической активности ряда веществ, способных корректировать возникающие отклонения. **Цель исследования:** Провести анализ литературных данных о возможностях использования модельного объекта зебраданио для изучения возраст-ассоциированных заболеваний. **Материалы и методы:** Были проанализированы научные работы, находящиеся в открытом доступе в базах данных PubMed, Web of Science, Elibrary и Google Scholar. Преимущественно изучались публикации на

английском языке и размещенные в течение последних 5 лет, особое внимание уделялось оригинальным статьям. **Результаты:** В обзоре представлены данные об изучении на зебраданио таких заболеваний как сахарный диабет 2 типа, катаракта, возрастная макулярная дегенерация, атеросклероз, фиброз клапанов сердца, нарушение сердечной деятельности, остеопороз, саркопения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассмотрены возможные фармакологические и генетические модели, а также описаны результаты экспериментов изучения ряда веществ, используемых для коррекции указанных патологий. **Заключение:** Зебраданио находит широкое применение в качестве модельного объекта для изучения заболеваний органа зрения, обмена веществ, сердечно-сосудистой, нервной и опорно-двигательной систем, ассоциированных с возрастом. Описанные модели являются валидными, так как обнаруживают сходство с проявлениями болезни у человека и успешно подвергаются фармакологической коррекции.

**Ключевые слова:** Данио рерио; сахарный диабет; катаракта; атеросклероз; остеопороз; нейродегенеративные заболевания

**Для цитирования:** Лашенова ЛИ, Перфилова ВН, Снигур ГЛ, и др. Использование рыб зебраданио (*Zebrafish*) в качестве модельных объектов для изучения возраст-ассоциированных заболеваний (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):120-141. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-7

## The use of *Zebrafish* (*Danio rerio*) as model subjects for the study of age-associated diseases (review)

Lyudmila I. Lashhenova<sup>1</sup> , Valentina N. Perfilova<sup>1</sup> , Grigorij L. Snigur<sup>1</sup> ,  
Alan V. Kalueff<sup>2,3</sup> 

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

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology,  
1 Olimpiyskiy Ave., Sirius, 354340, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg State University,  
7-9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg, 199034, Russia  
Corresponding author: Lyudmila I. Lashhenova (*mih-li@mail.ru*)

### Abstract

**Background:** Ageing is an evolutionary long-term biological process that leads to a decline in the functional capacity of the human body. As the number of elderly people in the population increases, the priority direction in health care is to study the mechanisms of age-related diseases and to search for drugs to correct these pathologies in order to improve the quality of life. Experiments have shown that zebrafish (*Danio rerio*) develop nine known signs of ageing that are characteristic of humans. Although the genome of these fish is only 70% homologous to the human genome, they have more than 80% of the orthologs of the genes involved in the diseases. These fish do not require high maintenance costs, can be studied from early embryogenesis to old age, and live much longer in the laboratory than mice, for example. Despite the limitations, including 10-15% differences from humans in target genes, duplication of 25% of genes, and different pharmacokinetics from warm-blooded animals, it is relevant to use zebrafish as an object for modelling age-related diseases and

studying the pharmacological activity of a number of substances capable of correcting emerging deviations in them. **The aim of the study:** To analyze the literature data on the possibilities of using the zebrafish model object for the study of age-related pathologies. **Materials and methods:** The scientific works that are publicly available in the databases PubMed, Web of Science, eLibrary and Google Scholar were analyzed. Publications in English and published within the last 5 years were mainly examined, with particular attention paid to original articles. **Results:** This review presents data on the study of pathologies such as type 2 diabetes mellitus, cataracts, age-related macular degeneration, atherosclerosis, fibrosis of the heart valves, cardiac dysfunction, osteoporosis, sarcopenia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease on zebrafish, discusses possible pharmacological and genetic models, and describes the results of experiments studying a number of substances used to correct these pathologies. **Conclusion:** The zebrafish is widely used as a model organism to study age-related diseases of the visual, metabolic, cardiovascular, nervous and musculoskeletal systems. The models described are valid because they show similarities to the manifestations of the disease in humans and can be successfully corrected pharmacologically. **Keywords:** Zebrafish; diabetes mellitus; cataract; atherosclerosis; osteoporosis; neurodegenerative diseases

**For citation:** Lashhenova LI, Perfilova VN, Snigur GL, et al. The use of *Zebrafish* (*Danio rerio*) as model subjects for the study of age-associated diseases (review). Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):120-141. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-7

**Введение.** Старение – эволюционно детерминированный длительный биологический процесс, приводящий к снижению функциональных возможностей организма [1]. Существует две принципиально отличных концепции для обоснования всего множества теорий старения: 1) накопление стохастических повреждений жизненно-важных молекул ДНК, РНК, протеинов и общее изнашивание организма, либо 2) наличие генетически детерминированной программы, неизбежно приводящей к возрастным изменениям и смерти [2]. С увеличением продолжительности жизни в обществе повышается количество хронических заболеваний. Наиболее распространенными являются болезни системы кровообращения, обусловленные изменением архитектоники стенок артерий и формированием атеросклеротических бляшек; органов зрения (развитие катаракты, глаукомы, нарушений рефракции); нервной системы и психические расстройства, особенно возникающие в результате нейродегенерации; опорно-двигательного аппарата, связанные с уменьшением плотности костной ткани и снижением

мышечной массы; органов пищеварения; новообразования, а также нарушения обмена веществ, в частности сахарный диабет [3].

В ряде экспериментов было показано, что у небольшой пресноводной тропической рыбы зебраданио (*Danio rerio*, *Zebrafish*) развиваются девять известных для человека признаков физиологического старения организма: нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические нарушения, изменение протеостаза, снижение чувствительности к питательным веществам, митохондриальная дисфункция, клеточное старение, истощение стволовых клеток и нарушение межклеточной коммуникации [4]. В последнее время зебраданио все чаще используется как объект для проведения доклинических испытаний [5]. Половозрелость особей наступает в 5-8 месяцев, срок жизни этих рыб в лабораторных условиях по разным данным составляет от 3 до 5 лет. Животные неприхотливы, для их содержания требуются минимальные затраты. Области исследования данного модельного объекта чрезвычайно разнообразны, в том числе определение острой токсичности на

эмбрионах и взрослых особях [6, 7], скрининг нейроспецифических химических веществ [8, 9, 10], модели для создания транспортных лекарственных систем [11], генетические исследования [12], а также изучение возрастных заболеваний [13, 14, 15]. Согласно концепции «3R» многие страны снижают интенсивность тестирования химических субстанций на приматах и грызунах. Применение в доклинических исследованиях лекарственных средств рыб позволяет заменить высокоорганизованных животных более низкоорганизованными при этом существенно снизить затраты. За рубежом зебраданию в качестве модельных объектов используют достаточно давно, в последние годы отмечается интенсивное внедрение данной биомодели с целью оптимизации доклинических исследований и в России [16-19]. Ограничениями в использовании зебраданию могут являться 10-15% различий в таргетах и только 70% генетической гомологии с человеком, дупликация 25% генов, иная, в отличие от теплокровных, фармакокинетика, относительно небольшой исторический опыт применения рыб в биомедицине.

**Цель исследования.** Провести анализ литературных данных о возможности и валидности использования модельного объекта зебраданию для изучения возраст-ассоциированных заболеваний.

**Материалы и методы исследования.** Были проанализированы научные работы, находящиеся в открытом доступе в базах данных PubMed, Web of Science, Elibrary и Google Scholar. Преимущественно изучались публикации на английском языке и размещенные в течение последних 5 лет, особое внимание уделялось оригинальным статьям.

### Результаты и их обсуждение

#### Старение и сахарный диабет

С возрастом у людей повышается риск развития сахарного диабета второго типа (СД2). Как осложнение СД2, часто обнаруживается нарушение функции почек, микроциркуляторные патологии, приводящие к инфарктам и инсультам,

изменение когнитивных функций, возможно возникновение гипогликемических состояний [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Использование зебраданию для моделирования сахарного диабета обусловлено сходством с млекопитающими строения поджелудочной железы, механизмом регуляции уровня глюкозы в крови [21]. При этом у всех костистых рыб обнаружены  $\beta$ -клетки, которые сходятся в центральной области поджелудочной железы, соответствующей островку Лангерганса человека, а также инсулин, который гомологичен человеческому и вырабатывается в количествах, эквивалентных таковым у людей [22].

Недорогими и широкодоступными являются методы экспериментального моделирования сахарного диабета у зебраданию, например, с помощью добавления моногидрата глюкозы в аквариум с рыбами. В результате экспериментов у рыб, обработанных глюкозой, обнаружено повышение концентрации сахара в крови натощак и резистентности к инсулину, повышался индекс массы тела, увеличивался уровень аспаратаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, уменьшался диаметр ворсинок кишечника. Коррекция метформином и силимарином показывала положительный эффект [23]. В ряде других исследований с модификацией концентрации глюкозы и длительности погружения рыб в резервуар с углеводом также были обнаружены признаки гипергликемии, нарушение функции зрительного анализатора и когнитивные расстройства [24-27].

При введении стрептозотоцина взрослым рыбам внутрибрюшинно наблюдалось устойчивое гипергликемическое состояние (повышение уровня глюкозы натощак, увеличение содержания гликированных белков сыворотки крови). Микроскопическое исследование поджелудочной железы показало снижение сигнала инсулина у зебраданию с гипергликемией при

иммуногистохимическом окрашивании. Также были отмечены ранние признаки ретинопатии (истончение сетчатки) и нефропатии (утолщение гломерулярной базальной мембраны). При ампутации хвостового плавника наблюдались серьезные нарушения регенерации в группе животных с гипергликемией по сравнению с контролем [28]. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Известно, что инсулин и инсулиноподобный фактор роста (ИФР) работают в единой системе, регулирующей метаболизм, процессы роста и дифференцировки клеток. Низкая концентрация ИФР в крови может являться одной из причин прогрессирования диабетической кардиомиопатии, развития артериальной гипертензии, нарушения процессов регенерации [29]. У старых рыб во всех трех генах, связанных с путями передачи сигнала от инсулиноподобного фактора роста (IGF); *IGF1*, *IGF2BP3* и *IGFBP2A*, исследователи наблюдали значительное снижение экспрессии, причем у самцов она была наиболее выражена у гена *IGF1* [30].

По сравнению с фармакологическими моделями, генетические методы моделирования заболевания являются более точными и специфичными. Например, ген, кодирующий фактор транскрипции, участвующий в развитии поджелудочной железы (*PDX1*, по-другому - фактор-промотор инсулина 1, *IPF1*) играет важную роль как в процессе ее формирования, так и при функционировании зрелых бета-клеток. Мутации с частичной потерей функции увеличивают риск развития СД2. У зебраданио *PDX1* экспрессируется в клетках-предшественниках поджелудочной железы и в зрелых бета-клетках поддерживается его экспрессия. Гомозиготы с нулевой мутацией в *PDX1* доживают до зрелого возраста, но показывают сниженную жизнеспособность и маленький размер по сравнению с рыбами дикого типа. При анализе фенотипа поджелудочной железы отмечается

снижение количества бета-клеток и уровня инсулина, дифференцировка ацинусов нарушается. Отмечается, что стойко повышенный уровень глюкозы у мутантов *PDX1* реагирует на лечение противодиабетическими препаратами [31].

### Возрастные заболевания глаз

Среди офтальмологических заболеваний у людей престарелого возраста наиболее широко распространены аномалии рефракции, возрастная макулярная дегенерация, катаракта, глаукома, диабетическая ретинопатия, в основе которых лежит множество молекулярных и клеточных механизмов [32]. Размер глаз рыбы достаточно велик относительно ее небольшого тела, что позволяет манипулировать их зачатками уже на ранних стадиях эмбриогенеза. Хотя сеть трабекул и динамика изменения водянистой влаги у зебраданио сильно отличаются от человеческой, общее сходство в среднем внутриглазном давлении и структуре тканей, обеспечивающих отток водянистой влаги, делает их отличной моделью для исследования генетики глаукомы человека. Остроту зрения рыб обычно оценивают в поведенческих тестах, исследуется оптокинети́ческая реакция и оптомоторный эффект [33].

С клинической точки зрения, различают возрастную и врожденную катаракту. Использование модели данного заболевания у зебраданио в основном фокусируется на врожденной форме, однако их можно использовать как инструмент для исследования механизмов возраст-ассоциированной катаракты, связанной с нарушением содержания кристаллинов – основных белков, входящих в состав хрусталика. Выявлено, что к помутнению хрусталика, вызванному активацией передачи сигналов глюкокортикоидными рецепторами, приводит мутация гена *CRYAB*, кодирующего  $\alpha$ В-кристаллин. В экспериментах использовали мутантные линии зебраданио с потерей функции гена,

полученные при помощи системы CRISPR/Cas9 [34]. Показано, что мутация в гене *CRYGC* (кодирует  $\gamma$ C-кристаллин), вызванная заменой глицина цистеином в кодоне 129 у рыб зебрэданио, снижает термостабильность  $\gamma$ C-кристаллина и повышает риск помутнения хрусталика при воздействии высоких температур и УФ-излучения, что в конечном итоге приводит к катаракте [35].

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – заболевание, вызывающее потерю зрения у людей старше 50 лет за счет дегенеративных изменений центрального отдела сетчатки. Одна из форм – сухая макулодистрофия, для которой характерно накопление продуктов обмена в области макулы и медленное развитие атрофии пигментного эпителия без признаков отека. Другая форма возникает, когда наряду с атрофией в слое хориокапилляров продолжается ангиогенез, она носит название «влажная» или неоваскулярная ВМД [36]. Трансгенная сверхэкспрессия человеческого *HTRA1* – гена сериновой протеазы, определяющей степень васкуляризации тканей при взаимодействии с трансформирующим фактором роста бета, у зебрэданио демонстрирует определенные морфологические изменения пигментного эпителия сетчатки, гибель фоторецепторных клеток и накопление липофусцина, которые являются признаками ранней макулодистрофии [37]. В ряде исследований представлена модель ретинопатии у зебрэданио, вызванная гипоксией (содержание в резервуаре с низким уровнем кислорода в течение 3-10 дней), которую можно использовать для изучения «влажной» формы ВМД [38, 39]. Мутантная линия *RP1L1*, полученная редактированием генома рыб системой CRISPR/Cas9, используется для моделирования дегенерации фоторецепторов с отложениями субретиальных продуктов метаболизма клеток пигментного эпителия, что является отличительным признаком сухой формы макулодистрофии [14].

Мутанты *PDX1* у рыб зебрэданио представляют собой единственную известную модель для изучения ангиогенеза сетчатки, индуцированного экспериментальной гипергликемией [13]. Мутанты *PDX1* имеют не только сосудистые, но и нейроретинальные нарушения, проявляющиеся дисфункцией и потерей фоторецепторов, сходные с диабетической ретинопатией человека [40].

### Сердечно-сосудистые заболевания

Основными причинами смертности и инвалидизации людей после 60 лет являются болезни системы кровообращения (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, аритмии, и др.) [41]. Работа двухкамерного сердца рыб аналогичная таковой у млекопитающих, структура может быть легко визуализирована, манипуляции возможны *in vivo* (у развивающихся эмбрионов) и *in situ* (в изолированных сердцах) [42]. Исследование микроструктуры сердца у зебрэданио проводится с использованием стандартных методик гистологического окрашивания препаратов. Функциональная диагностика сердечно-сосудистой системы осуществляется с помощью ЭХО-кардиографического исследования [43] и регистрации ЭКГ у особей, анестезированных метансульфонат трикаином [44].

У пожилых зебрэданио были описаны гипертрофия кардиомиоцитов, увеличение плотности миокарда желудочков с одновременным увеличением содержания коллагена, фиброзное поражение клапанов, отек перикарда и сокращение коронарной сосудистой сети [45]. В экспериментах показано, что у старых рыб отмечается увеличение толщины и плотности миокарда желудочка, содержания коллагена и фиброзной ткани; уменьшение диаметра просвета эпикардальных сосудов (что является свидетельством снижения перфузии ткани миокарда); увеличение конечных диастолических размеров желудочка; удлинение времени извольюмического расслабления миокарда;

увеличение времени деполяризации предсердий и атриовентрикулярного узла (на что указывает увеличение интервала PR на ЭКГ); снижение скорости кровотока через желудочек. Гиперэкспрессия сердечных фетальных генов натрийуретического фактора – *NPPA* и *NPPB*, обнаруженных с помощью анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР), наблюдалась у рыб старшего возраста по сравнению с младшей группой [15].

Экспериментально установлено, что у зебрданио при физиологическом старении частота сердечных сокращений, реакция на стимуляцию блуждающего нерва снижены по сравнению с группой контроля, что свидетельствует о возрастных изменениях функции синоатриального узла. Эти изменения сопровождаются различиями во внутрисердечной иннервации, обусловленные возрастом, при этом общее количество и доля холинергических нейронов выше у пожилых животных [46].

Анализ длины теломер в сердечной ткани старых рыб после стрессового воздействия с использованием количественной ПЦР в реальном времени показал снижение длины теломер у животных с высокой стресс-реактивностью вне зависимости от пола. К возможному механизму, объясняющему это явление, можно отнести повышенную реактивность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси у старых зебрданио [47].

Повышенный уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в плазме крови является одним из главных факторов риска развития атеросклероза, приводящих к патологиям сердца и сосудов [48]. Нокаут гена рецептора ЛПНП у зебрданио приводит к гиперхолестеринемии, накоплению отложений липидов в сосудах, показатели повышаются при добавлении в рацион рыб корма с высоким содержанием холестерина. Использование ломитапида – ингибитора микросомального белка-транспортера триглицеридов – приводит к снижению количества холестериновых

бляшек на стенках сосудов у нокаутных рыб [49]. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

### **Изменения опорно-двигательного аппарата, связанные с возрастом**

Наиболее распространенным заболеванием опорно-двигательной системы у пожилых людей является остеопороз, приводящий к высокому риску переломов и деформации костей в связи с уменьшением количества костной ткани [50].

Взрослая рыба зебрданио представляет собой новый и легкодоступный ресурс для изучения регуляторных механизмов метаболизма костей взрослого человека на клеточном и молекулярном уровнях, а также патогенеза заболеваний костей или костных осложнений болезней человека. При общей морфологической оценке рыб при физиологическом старении отмечено прогрессирующее увеличение частоты и тяжести искривлений позвоночника. Рентгенографическое исследование в местах смещения позвоночного столба выявило частичный или полный вывих позвонка и очаговое утолщение кости по периферии сустава. Микроскопическое исследование скелета трехлетних рыб показало широко распространенные морфологические признаки эрозии кости, образования складок и ремоделирования ткани внутри позвонков; однако при оценке минеральной плотности кости не наблюдалось проявлений остеопороза [51]. Фенотип, подобный остеопорозу, связан с метаболическими изменениями, что позволяет предположить, что костные осложнения имеют одни и те же механизмы у людей и рыб [52].

Чешуя и плавники зебрданио являются частью кожного скелета, они содержат минерализованный матрикс и могут быть использованы для быстрой оценки формирования костей и отложений минеральных веществ [53]. Кроме того, эти элементы обладают способностью к регенерации, что позволяет определить

молекулярный профиль остеобластов при восстановлении структуры [54].

Имеются данные, что избыточное накопление железа может нарушить баланс костного метаболизма и вызвать дефекты в процессе формирования кости [55]. Разработана также модель остеопороза на эмбрионах и взрослых рыбах с применением цитрата аммиачного железа (ferric ammonium citrate, FAC) путем добавления его в аквариум в концентрации 500 мкг/мл. Были исследованы такие параметры, как кальцификация костей (окрашивание ализариновым красным), развитие хрящей (окраска препаратов ацилановым синим) и уровни экспрессии генов, связанных с остеобластами. Обнаружено, что ускоренное старение, вызванное FAC, индуцирует фенотип остеопороза, о чем свидетельствует снижение минерализации, а также плотности костной ткани, развитие дефектов хрящей. Патологические изменения поддаются коррекции аллендронатом. Также было обнаружено снижение уровня мРНК генов, специфически экспрессируемых в остеобластах и хрящах [56].

У людей рецессивные мутации, приводящие к потере функции гена *LRP5*, трансмембранного липопротеинового рецептора, корцептора сигнального пути Wnt, вызывают синдром остеопороза-псевдоглиомы, обусловленный нарушением дифференцировки остеобластов [57]. Кроме того, в исследовании ассоциаций на уровне всего генома *LRP5* был идентифицирован как основной локус риска фенотипов, связанных с остеопорозом [58]. Личинки зебраданио с нокаутом *LRP5* в раннем эмбриогенезе проявляют сниженную минерализацию хорды и пороки развития головного хряща. У взрослых особей мутантной линии наблюдается снижение сигнальной активности Wnt при регенерации плавников [59].

Деформация костей в концевых пластинах позвоночника зебраданио во время естественного старения может

привести к ложному повышению минеральной плотности костной ткани, что наблюдается у людей с дегенеративными изменениями поясничного отдела позвоночника. Были проведены эксперименты по изучению заболевания межпозвоночных дисков на зебраданио, которые моделировались путем мутации в генах *SP7* (остерикс, связан с остеодифференцировкой) и *CTSK* (кодирует цистеиновую протеазу, участвующую в ремоделировании костей и их деградации), что приводило к низкой и высокой минеральной плотности костной ткани соответственно. В результате было выявлено, что элементы дисков повторяли симптомы болезни межпозвоночных дисков, обнаруживаемые у людей: в межпозвоночной связке (эквивалент фиброзного кольца человека) обнаружены дезорганизованные коллагеновые волокна и грыжа, тогда как в центре диска (эквивалент пульпозного ядра) наблюдалась дегидратация и клеточные аномалии. В экспериментах использовалось 3D-изображение с высоким разрешением (<0,1 мкм, синхротронное излучение), при этом была определена роль транскрипционного фактора *SP7* в управлении 3D-профилем лакун остецитов [60].

У рыб при физиологическом старении наблюдается повышенное число спонтанных переломов плавников, которые легко обнаружить по наличию мозолей. В исследованиях общегеномных ассоциаций человека показано, что белок Wnt16 связан с хрупкостью костей и остеопорозом. Проводились эксперименты по динамическому изучению его влияния на кости мутантных особей зебраданио, лишенных Wnt16 (*wnt16 -/-*), которые демонстрируют переменную минеральную плотность тканей и были подвержены спонтанным переломам в лепидотрихиях хвостовых плавников и накоплению костных мозолей в раннем возрасте. Минерализация кости и рекрутирование остеобластов во время заживления

переломов также значительно замедлены у мутантов *Wnt16* [61].

У пожилых людей снижение физической работоспособности можно объяснить развитием саркопении. Уменьшение мышечной массы, силы приводит к снижению функциональных возможностей, частым падениям, инвалидизации [62]. В качестве способа коррекции данной патологии возможно применение физических упражнений. Эксперименты по изучению влияния двигательной нагрузки на скелетно-мышечную систему зебраданио с помощью теста интенсивного принудительного плавания – по 6 часов в день 5 дней в неделю в течение 2 недель, затем по 2-3 часа в день 5 дней в неделю в течение 2 недель показали, что принудительные физические нагрузки у рыб увеличивают массу скелетных мышц в зависимости от количества упражнений. Наблюдалась гипертрофия соматической мускулатуры без повышения массы тела, причем масса красных мышечных волокон росла при малом количестве упражнений, а белых - по мере роста интенсивности нагрузки. При увеличении количества упражнений отмечалось повышение уровня экспрессии генов *PGC1 $\alpha$* , *NRF1* и *CS*, это является свидетельством возможности стимуляции физическими нагрузками защитных сил против старения на суборганизменном уровне [63]. Применение повышенных физических нагрузок при плавании зебраданио в тоннеле стимулирует рост костеобразующих остеобластов, объема кости и минерализации [64].

При протеомном исследовании хронологического старения мышц у женщин в постменопаузе выявлено три дифференциально регулируемых белка: карбоангидраза 2 (*CA2*), регуляторная легкая цепь миозина 2 (*MYL2*) и селенсвязывающий белок 1 (*SELENBP1*). В экспериментах изучались характеристики, пространственно-временные и возрастные профили экспрессии этих генов на разных стадиях жизни зебраданио. Гены *CA2* в основном экспрессируется в глазу,

головном мозге, кишечнике и жабрах, *MYL2A* и *MYL2B*, главным образом, в мышцах, жабрах, глазу и сердце, и *SELENBP1* наиболее интенсивно экспрессируются в печени. Показано, что профиль их экспрессии изменяется с возрастом и может быть использован в качестве биомаркеров старения [65].

#### **Нейродегенеративные заболевания**

Подавляющее большинство нейродегенеративных заболеваний у человека обусловлены возрастом. Они возникают в результате прогрессирующей дегенерации и гибели нейронов, входящих в определенные структуры головного мозга, при этом нарушается взаимодействие между отделами ЦНС, связанное с дисбалансом конкретных нейромедиаторов и, как следствие, наблюдаются когнитивные отклонения, дефекты речи и т.д. [66]

Зебраданио традиционно используются для изучения нейродегенеративных заболеваний и процессов старения мозга. При проведении иммуноблоттинга экстрактов ткани мозга у зебраданио разного возраста с определением содержания белков, участвующих в синаптической передаче и являющихся маркерами целостности возбуждающих и тормозных синапсов: синаптофизина (*SYP*), белка *PSD-95* и гефирина (*GEP*), было обнаружено, что *PSD-95* значительно повышался у пожилых самок при физиологическом старении, *SYP* существенно снижался у самцов, а содержание *GEP* не изменялось [67]. Гены *ACHE* (ацетилхолинэстераза), *PPARGC1B* (коактиватор 1 $\alpha$  рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом типа b) демонстрируют значительное снижение при физиологическом старении. Предполагается, что во время старения снижается активность холинергической системы, поэтому снижается экспрессия гена *ACHE*, наблюдается нарушение когнитивных функций [30].

Болезнь Альцгеймера (БА) – хроническое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся

деменцией, дезориентацией, перепадами настроения, спутанной речью и неспособностью к координации движений; при этом отмечается высокий риск развития остеопороза и мышечной атрофии [6868]. Одним из важных факторов развития деменции, является неумеренное снижение уровня ацетилхолина (ACh), гидролизуемого ацетилхолинэстеразой в головном мозге пациентов с БА [69]. В большинстве случаев БА обусловлена мутациями в белке-предшественнике  $\beta$ -амилоида (APP) и в пресенилинах 1 и 2, которые усиливают образование  $\beta$ -амилоида, обычно откладывающегося в виде сенильных бляшек в паренхиме головного мозга и церебральных сосудов. Другим важным морфологическим признаком БА является отложения нейрофибриллярных клубков из гиперфосфорилированного тау-белка, которые приводят к потере синаптических и нейронных связей [70, 71]. Моделирование БА у рыб осуществлялось в условиях ускоренного старения, вызванного омега-3-жирными кислотами (ОЖК). Ее Na-соль растворяли в 95% спирте и разбавляли до конечной концентрации, использовали несколько вариантов: 10 Нм, 100 Нм, 500 Нм или 1 мкМ. Рыб помещали в раствор заданной концентрации. Были зафиксированы основные морфологические признаки исследуемой патологии в мозге: скопления  $\beta$ -амилоида, тау-белка и микрокровоотечения, возникающие на поздних стадиях БА. Изменения также были связаны с дефицитом обучения и памяти, которые изучали в различных тестах через 9 дней после помещения в раствор с ОЖК [72].

Изучалось влияние ройфолина – флавонового гликозида, относящегося к семейству апигенинов, на когнитивные функции зебраданио с экспериментальной БА. Моделирование осуществлялось с использованием скополамина, который может вызывать нарушение памяти и когнитивных функций за счет блокады мускариновых ацетилхолиновых рецепторов. Раствор вещества

концентрацией 100  $\mu$ М готовили в 2 л дистиллированной воды. За 30 мин до проведения поведенческих тестов рыбу помещали в стакан объемом 0,5 л на 30 минут. Изучали характер плавания рыб, поведение в Y-образном лабиринте, производительность памяти в тесте на распознавание объектов. В гомогенате мозга оценивали концентрацию ацетилхолинэстеразы, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, а также уровня карбониллов белков и малонового диальдегида. Применение скополамина вызывало устойчивый анксиогенный ответ у рыб в поведенческих тестах и амнезию, биохимический анализ гомогенатов головного мозга показал высокую концентрацию маркеров окислительного стресса. В группах животных, получавших препарат, отмечался антиоксидантный, анксиолитический эффекты, снижение дефицита памяти [73].

У зебраданио обнаружены гены ортологи и коортологи человека, которые играют важную роль в патогенезе БА. Так, известны *psen1*, *psen2* ортологи человеческих *PSEN1* и *PSEN2*; *bace1* и *bace2* -*BACE1* и *BACE2* ( $\beta$ -секретазы) соответственно. Гены *appa* и *appb* являются “коортологами” человеческого *APP* (ген белка-предшественника бета-амилоида), а *mapta* и *maptb* -тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (*MAPT*). Также выявлены ортологические компоненты гамма-секретазного комплекса *PSENEN*, *NCTN*, *APH1b* [74].

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга, характеризующееся дегенерацией и гибелью дофаминергических нейронов nigrostriарной системы, агрегацией нерастворимых SNCA-фибрилл гена синуклеина (*SNCA*) и образованием телец Леви в черной субстанции, приводящее к нарушению функционирования базальных ганглиев. Заболевание может быть, как спорадическим, так и семейным и

клинически проявляет себя по-разному [75, 76].

Патогенез спорадической БП связывают с нейротоксинами, такими как 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР) и пестицидами - ротеноном, паракватом.

МРТР превращается в 1-метил-4-фенилпиридиний (МРР+) моноаминоксидазой В в головном мозге, и этот метаболит приводит к гибели дофаминергических нейронов Substantia nigra путем ингибирования комплекса I дыхательной цепи митохондрий, что в конечном итоге приводит к гибели клетки [77]. Проводились исследования на зебраданио по моделированию болезни Паркинсона с применением указанного токсина. Перед введением МРТР взрослых рыб анестезировали 0,1% триканом внутривентриально, далее вводили МРТР внутривентриально одну или две дозы раздельно: 1 доза (50 г) и 2 дозы (2×50 г) МРТР в 5 л стерильной воды. Временной интервал между двумя дозами составлял 24 часа. Контрольным рыбам вводили физиологический раствор. Обработанные МРТР зебрафиш демонстрировали снижение подвижности при плавании, увеличение эпизодов замирания, что соответствует фенотипу болезни. Понижающая регуляция белков NEFL (легкие цепи нейрофиламентов) в мозге зебраданио, обработанных МРТР, связана с сигнализацией рецептора ГАМК-В в пресинаптических нервных окончаниях, участвует в ингибировании секреции нейромедиатора в пресинаптических глутаматергических и ГАМКергических нервных окончаниях. На основании вестерн-блот-анализа было обнаружено, что экспрессия гена *SNCGA/B* (ортолог человеческого синуклеина гамма 1 и 2) незначительно повышалась при лечении двойной дозой МРТР. Аналогично на основе иммунофлуоресцентного анализа в области тектума зрительного нерва, высокий уровень экспрессии гена *SNCGA/B* наблюдался у зебраданио, обработанных МРТР [78].

При воздействии МРТР у рыб происходит нарушение двигательных функций, выражающееся в снижении скорости плавания, и аберрантное поведение, что похоже на симптомы брадикинезии у человека. Также рыбы проводят больше времени на дне аквариума, и увеличивается количество эпизодов замирания, что свидетельствует о значительном снижении двигательной активности. Кроме того, МРТР ослабляет сенсорную чувствительность [79].

Ротенон (ROT) – изофлавоноид растительного происхождения является антагонистом дофаминергических нейронов, способен проникать через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в органоидах, преимущественно в митохондриях. Он уменьшает продукцию АТФ и повышает образование активных форм кислорода за счет ингибирования комплекса I митохондриальной цепи переноса электронов [80]. ROT вызывает активацию микроглии, отражающуюся нейровоспалением, и агрегацию  $\alpha$ -синуклеина, приводящую к отложению телец Леви [81]. В экспериментах зебраданио подвергали хроническому воздействию ROT в течение 32 дней. Оценивали уровень агрессии и социальное поведение при вращении против часовой стрелки, в Т-образном лабиринте. Ротенон в эмпирически подобранной дозе 2,5 мкг/л растворяли в дистиллированной воде и вводили внутрь перед кормлением с использованием герметичного баллона объемом 100 мл. В результате выявили, что ротенон приводит к нарушению социального поведения и аномальному вращению против часовой стрелки [82].

Еще одна популярная модель БП обусловлена применением 6-гидроксидофамина (6-OHDA), который вызывает ускоренное старение, инициируя массовую антероградную дегенерацию клеток нигростриатальной системы мозга. Нейроны начинают отмирать в течение первых 12 ч после инъекции, выраженное поражение полосатых дофаминергических

окончаний, сопровождающееся истощением дофамина, устанавливается в течение 2-3 дней [83]. В экспериментах по изучению влияния метанольного экстракта рожкового дерева (*Ceratonia siliqua*) на ухудшение памяти и окислительный стресс у зебраданио моделирование БП осуществлялось при помещении рыб на 60 минут в аквариум, содержащий 160 мМ 6-ОНДА. Отмечалось предотвращение дефицита кратковременной памяти в экспериментальной группе и антиоксидантный эффект [84]. Также в исследованиях используется аналогичная модель с модификацией концентрации 6-ОНДА 250 мМ [85].

Другой способ введения 6-гидроксидофамина – интрацеребровентрикулярная микроинъекция 99,96 мМ нейротоксина рыбам через вентральную часть промежуточного мозга. В результате иммунофлуоресцентного анализа было выявлено, что 85% дофаминэргических нейронов погибло, полное восстановление происходило на 30-й день после вмешательства. После инъекции у зебраданио отмечалось нарушение локомоции, выражающееся в снижении скорости и пройденного расстояния в аквариуме [86].

**Заключение.** Старение – закономерный физиологический процесс, создающий предпосылки для развития заболеваний, ассоциированных с возрастом. Рыбы зебраданио являются универсальным модельным объектом для изучения таких заболеваний человека и тестирования потенциальных терапевтических средств. Содержание малозатратно, половой зрелости достигают быстро, а в лаборатории могут прожить от 3 до 5 лет. Постепенно ученые перестают проводить эксперименты на грызунах, следуя концепции «3R». Применение рыб в качестве модельных объектов заменяет

более высокоорганизованных млекопитающих. Исследователи используют как фармакологические, так и генетические модели, полученные путем нокаута конкретного гена, его сверхэкспрессии или мутации. В экспериментах на рыбах исследуются такие заболевания, ассоциированные с возрастом, как сахарный диабет 2 типа, возрастная макулярная дегенерация, катаракта, атеросклероз, фиброз клапанов сердца, нарушение сердечной деятельности, остеопороз, нарушение костного метаболизма, саркопения, болезни Альцгеймера и Паркинсона. Сходство строения органов, физиологических процессов, метаболитов, гормонов, нейромедиаторов у рыб с млекопитающими позволяет проводить поведенческие, функциональные, микроскопические, биохимические, генетические исследования. Однако в настоящее время отсутствуют стандарты использования зебраданио в доклинических исследованиях лекарственных средств. Применение данной биомодели для оценки эффективности и безопасности химических субстанций возможно лишь при надлежащей валидации и получении одобрения от соответствующих организаций<sup>1</sup>. Несмотря на ряд ограничений представляется перспективным и стратегически важным использовать зебраданио на доклиническом этапе изучения эффектов лекарственных препаратов для коррекции возраст-ассоциированных заболеваний с целью улучшения качества жизни пожилого человека и, в случае получения успешных результатов, данный модельный объект может быть включен в качестве дополнительного в национальные стандарты.

### Информация о финансировании

безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»

<sup>1</sup> Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям

*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. Шабалин ВН, Шатохина СН. Роль старения в эволюционном развитии человека. Вестник Российской академии наук. 2020;90(12):1119-1127. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869587320120233>
2. Hussain F, Kayani HUR. Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. Heliyon. 2020;6(5):e04107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107>
3. Мусаева ОТ, Соатов ММ, Халилова БР. Основные возрастные заболевания и состояния распространенные среди мужчин и женщин пожилого возраста. Research Journal of Trauma and Disability Studies. 2023;2(4):14-25.
4. Khor ES, Noor SM, Wong PF. Understanding the role of ztor in aging-related diseases using the zebrafish model. In Vivo. 2019;33(6):1713-1720. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.11661>
5. Колесникова ТО, Ильин НП, Котова ММ, и др. Зебрданио как перспективная модель в трансляционной нейробиологии и биомедицине. Успехи физиологических наук. 2023;54(3):1-18. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0301179823030037>
6. Zhang C, Zhang J, Zhu L, et al. Fluoxastrobilin-induced effects on acute toxicity, development toxicity, oxidative stress, and DNA damage in Danio rerio embryos. Science of the Total Environment. 2020;715:137069. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137069>
7. Yuan M, Li W, Xiao P. Vixafen causes cardiac toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environmental Science and Pollution Research. 2021;28:36303-36313. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13238-5>
8. Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. Cell Death Discovery. 2018;4:45. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7>
9. Brito RS, Canedo A, Farias D, et al. Transgenic zebrafish (Danio rerio) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. Science of the Total Environment. 2022;848:157665. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157665>
10. de Abreu MS, Demin KA, Costa FV, et al. Neuropharmacology of Aggression in Model Systems: The Zebrafish as a New Narrative. Handbook of Anger, Aggression, and Violence. Cham: Springer International Publishing; 2023. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-98711-4\\_141-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-98711-4_141-1)
11. Rothenbücher TSP, Ledin J, Gibbs D, et al. Zebrafish embryo as a replacement model for initial biocompatibility studies of biomaterials and drug delivery systems. Acta Biomaterialia. 2019;100:235-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.038>
12. Bradford YM, Van Slyke CE, Ruzicka L, et al. Zebrafish information network, the knowledgebase for Danio rerio research. Genetics. 2022;220(4):iyac16. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac016>
13. Ali Z, Zang J, Lagali N, et al. Photoreceptor Degeneration Accompanies Vascular Changes in a Zebrafish Model of Diabetic Retinopathy. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2020;61(2):43. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.61.2.43>
14. Noel NCL, Nadolski NJ, Hocking JC, et al. Progressive Photoreceptor Dysfunction and Age-Related Macular Degeneration-Like Features in rp111 Mutant Zebrafish. Cells. 2020;9(10):2214. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9102214>
15. Murphy LB, Santos-Ledo A, Dhanaseelan T, et al. Exercise, programmed cell death and exhaustion of cardiomyocyte proliferation in aging zebrafish. Disease Models and Mechanisms. 2021;14(7):dmm049013. DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.049013>
16. Кротова НА, Лакстыгал АМ, Таранов АС, и др. Зебрданио (zebrafish) как новая перспективная модель в трансляционной нейробиологии. Российский физиологический журнал им И.М. Сеченова. 2019;105(11):1417-1435. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0869813919110062>
17. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, и др. Моделирование и оценка судорожной активности у зебрданио (Danio

erio). Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2022;20(2):193-199. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202193-199>

18. Державина КА, Ильин НП, Серединская МВ, и др. Зебраданио (zebrafish) как модель редких (орфанных) заболеваний нервной системы. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(2):17-32. DOI: <https://doi.org/10.18705/2782-3806-2022-2-2-17-32>

19. Калуев АВ. Принципы моделирования заболеваний мозга и их терапии на зебраданио (zebrafish). Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2022;20(2):119-122. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202119-122>

20. Ахундова ХР, Дудинская ЕН, Ткачева ОН. Гериатрические аспекты сахарного диабета. Российский журнал гериатрической медицины. 2020;3:250-259. DOI: <https://doi.org/10.37586/2686-8636-3-2020-250-259>

21. Salehpour A, Rezaei M, Khoradmehr A, et al. Which hyperglycemic model of zebrafish (*Danio rerio*) suites my type 2 diabetes mellitus research. A scoring system for available methods. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:652061. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.652061>

22. Moon TW. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2001;129(2-3):243-249. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00316-5)

23. Mohammadi H, Manouchehri H, Changizi R, et al. Concurrent metformin and silibinin therapy in diabetes: Assessments in zebrafish (*Danio rerio*) animal model. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2020;19:1233-1244. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00637-7>

24. Lee Y, Yang J. Development of a zebrafish screening model for diabetic retinopathy induced by hyperglycemia: Reproducibility verification in animal model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;135:111201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111201>

25. Singh A, Castillo HA, Brown J, et al. High glucose levels affect retinal patterning during zebrafish embryogenesis. *Scientific Reports*. 2019;9:4121. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41009-3>

26. Wang JJ, Li Y, Lai K, et al. High-glucose/high-cholesterol diet in zebrafish evokes

diabetic and affective pathogenesis: The role of peripheral and central inflammation, microglia and apoptosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2020;96:109752. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109752>

27. McCarthy E, Dunn J, Augustine K, et al. Prolonged Hyperglycemia Causes Visual and Cognitive Deficits in *Danio rerio*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(17):10167. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231710167>

28. Oyelaja-Akinsipo OB, Dare EO, Katare DP. Protective role of diosgenin against hyperglycaemia-mediated cerebral ischemic brain injury in zebrafish model of type II diabetes mellitus. *Heliyon*. 2020;6(1):e03296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03296>

29. Демидова ТЮ, Зенина СГ. Роль инсулинорезистентности в развитии сахарного диабета и других состояний. Современные возможности коррекции. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2019;10(II):116-122.

30. Arslan-Ergul A, Adams MM. Gene expression changes in aging zebrafish (*Danio rerio*) brains are sexually dimorphic. *BMC Neuroscience*. 2014;15:29. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-29>

31. Wigganhauser LM, Qi H, Stoll SJ, et al. Activation of retinal angiogenesis in hyperglycemic *pdx1*<sup>-/-</sup> zebrafish mutants. *Diabetes*. 2020;69(5):1020-1031. DOI: <https://doi.org/10.2337/db19-0873>

32. Юсеф ЮН, Еричев ВП, Будзинская МВ, и др. Геронтологические аспекты заболеваний органа зрения. *Вестник офтальмологии*. 2022;138(5-2):227-233. DOI: <https://doi.org/10.17116/oftalma2022138052227>

33. Hong Y, Luo Y. Zebrafish model in ophthalmology to study disease mechanism and drug discovery. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):716. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14080716>

34. Mishra S, Wu SY, Fuller AW, et al. Loss of  $\alpha$ B-crystallin function in zebrafish reveals critical roles in the development of the lens and stress resistance of the heart. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(2):740-753. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.808634>

35. Li XQ, Cai HC, Zhou S, et al. A novel mutation impairing the tertiary structure and stability of  $\gamma$ C-crystallin (CRYGC) leads to cataract formation in humans and zebrafish lens. *Human Mutation*. 2012;33(2):391-401. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.21648>

36. Исмаилова СК, Балмуханова АВ. Современное состояние проблемы возрастной макулодистрофии. Вестник Казахского национального медицинского университета. 2018;4:26-32.
37. Pan Y, Fu Y, Baird PN, et al. Exploring the contribution of ARMS2 and HTRA1 genetic risk factors in age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2023;97:101159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101159>
38. Rosa JGS, Lopes-Ferreira M, Lima C. An overview towards zebrafish larvae as a model for ocular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5387. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065387>
39. Ali Z, Mukwaya A, Biesemeier, et al. Intussusceptive vascular remodeling precedes pathological neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019;39(7):1402-1418. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312190>
40. Schmitner N, Recheis C, Thönig J, et al. Differential responses of neural retina progenitor populations to chronic hyperglycemia. *Cells*. 2021;10(11):3265. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113265>
41. Baek J, Lee, H, Lee, HH, et al. Thirty-six year trends in mortality from diseases of circulatory system in Korea. *Korean Circulation Journal*. 2021;51(4):320-332. DOI: <https://doi.org/10.4070/kcj.2020.0424>
42. Dahme T, Katus HA, Rottbauer W. Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. *Disease Models and Mechanisms*. 2009;2(1-2):18-22. DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.000687>
43. Hein S, Hassel D, Kararigas G. The zebrafish (*Danio rerio*) is a relevant model for studying sex-specific effects of 17 $\beta$ -estradiol in the adult heart. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24):6287. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20246287>
44. Zhao Y, Yun M, Nguyen S.A, et al. In vivo surface electrocardiography for adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;150:e60011. DOI: <https://doi.org/10.3791/60011>
45. Cooper TK, Spitsbergen JM. Valvular and mural endocardiosis in aging zebrafish (*Danio rerio*). *Veterinary Pathology*. 2016;53(2):504-509. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985815594853>
46. Stoyek MR, Rog-Zielinska EA, Quinn TA. Age-associated changes in electrical function of the zebrafish heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018;138:91-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.014>
47. Evans JR, Torres-Pérez JV, Petrazzini ME, et al. Stress reactivity elicits a tissue-specific reduction in telomere length in aging zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*. 2021;11(1):339. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79615-1>
48. Ахмедов ВА, Шевченко АС, Исаева АС. Современные взгляды на факторы возникновения и прогрессирования атеросклероза. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2019;3(1-2):57-62.
49. Dubińska-Magiera M, Migocka-Patrzałek M, Lewandowski D, et al. Zebrafish as a model for the study of lipid-lowering drug-induced myopathies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5654. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22115654>
50. Choi MH, Yang, JH, Seo JS, et al. Prevalence and diagnosis experience of osteoporosis in postmenopausal women over 50: Focusing on socioeconomic factors. *PLoS ONE*. 2021;16(3):e0248020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248020>
51. Hayes AJ, Reynolds S, Nowell MA, et al. Spinal deformity in aged zebrafish is accompanied by degenerative changes to their vertebrae that resemble osteoarthritis. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e75787. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075787>
52. Carnovali M, Banfi G, Mariotti M. Zebrafish models of human skeletal disorders: embryo and adult swimming together. *BioMed Research International*. 2019;2019:1253710. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1253710>
53. Dietrich K, Fiedler IAK, Kurzyukova A, et al. Skeletal biology and disease modeling in zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;36(3):436-458. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4256>
54. Kobayashi-Sun J, Yamamori S, Kondo M, et al. Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale. *Communications Biology*. 2020;3:190. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0925-1>
55. Zhang H, Wang A, Li G, et al. Osteoporotic bone loss from excess iron accumulation is driven by NOX4-triggered ferroptosis in osteoblasts. *Free Radical Biology and Medicine*. 2023;198:123-136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.026>

56. Peng W, Zhang W, Wu Q, et al. Agaricus bisporus-derived glucosamine hydrochloride facilitates skeletal injury repair through Bmp signaling in zebrafish osteoporosis model. *Journal of Natural Products*. 2021;84(4):1294-1305. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00002>
57. Papadopoulos I, Bountouvi E, Attilakos A, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: clinical, genetic, and treatment-response study of 10 new cases in Greece. *European Journal of Pediatrics*. 2019;178:323-329. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00431-018-3299-3>
58. Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone*. 2019;126:2-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.005>
59. Bek JW, Shochat C, De Clercq A, et al. Lrp5 Mutant and Crispant Zebrafish Faithfully Model Human Osteoporosis, Establishing the Zebrafish as a Platform for CRISPR. Based Functional Screening of Osteoporosis Candidate Genes. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;36(9):1749-1764. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4327>
60. Kague E, Turci F, Newman E, et al. 3D assessment of intervertebral disc degeneration in zebrafish identifies changes in bone density that prime disc disease. *Bone Research*. 2021;9(1):39. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00156-y>
61. McGowan LM, Kague E, Vorster A, et al. Wnt16 elicits a protective effect against fractures and supports bone repair in zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research Plus*. 2021;5(3):e10461. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm4.10461>
62. Kirk B, Zanker J, Hassan, EB, et al. Sarcopenia definitions and outcomes consortium (SDOC) criteria are strongly associated with malnutrition, depression, falls, and fractures in high-risk older persons. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2021;22(4):741-745. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2020.06.050>
63. Hasumura T, Meguro S. Exercise quantity-dependent muscle hypertrophy in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Physiology B*. 2016;186:603-614. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0977-1>
64. Busse B, Galloway JL, Gray RS, et al. Zebrafish: an emerging model for orthopedic research. *Journal of Orthopaedic Research*. 2020;38(5):925-936. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.24539>
65. Feng S, Wang S, Wang Y, et al. Identification and expression of carbonic anhydrase 2, myosin regulatory light chain 2 and selenium-binding protein 1 in zebrafish *Danio rerio*: Implication for age-related biomarkers. *Gene Expression Patterns*. 2018;29:47-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gep.2018.04.007>
66. Семенова ТН, Гузанова ЕВ, Сорокина ТА. Особенности речевых нарушений и их диагностики при нейродегенеративных заболеваниях. *Практическая медицина*. 2019;17(3):23-27.
67. Karoglu ET, Halim DO, Erkaya B, et al. Aging alters the molecular dynamics of synapses in a sexually dimorphic pattern in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Aging*. 2017;54:10-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.02.007>
68. Monzio Compagnoni G, Di Fonzo A, Corti S, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*. 2020;57:2959-2980. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
69. Alhazmi HA, Albratty M. An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2022;30(12):1755-1764. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.10.004>
70. Сальков ВН, Худоевков РМ. Роль алюминия и свинца в развитии болезней Альцгеймера и Паркинсона. *Архив патологии*. 2021;83(3):56-61. DOI: <https://doi.org/10.17116/patol20218303156>
71. Moloney CM, Lowe VJ, Murray ME. Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: a clinicopathologic perspective for biomarker research. *Alzheimer's and Dementia*. 2021;17(9):1554-1574. DOI: <https://doi.org/10.1002/ALZ.12321>
72. Nada SE, Williams FE, Shah ZA. Development of a novel and robust pharmacological model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease in zebrafish. *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets*. 2016;15(1):86-94. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821105602>
73. Brinza I, Abd-Alkhalek AM, El-Raey MA, et al. Ameliorative effects of rhoifolin in scopolamine-induced amnesic zebrafish (*Danio rerio*) model. *Antioxidants*. 2020;9(7):580. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9070580>

74. Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*. 2014;5:189. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00189>
75. Fukusumi H, Togo K, Sumida M, et al. Alpha-synuclein dynamics in induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons from a Parkinson's disease patient (PARK4) with SNCA triplication. *FEBS Open Bio*. 2021;11(2):354-366. DOI: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13060>
76. Magistrelli L, Contaldi E, Comi C. The impact of SNCA variations and its product alpha-synuclein on non-motor features of parkinson's disease. *Life*. 2021;11(8):804. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11080804>
77. Mitsumoto Y, Mori A. Acute restraint stress augments 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity via increased toxin uptake into the brain in C57BL/6 mice. *Neuroscience Bulletin*. 2018;34(5):849-853. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0254-2>
78. Sarath BN, Murthy CL, Kakara S, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics*. 2016;16(9):1407-1420. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.201500291>
79. Wasel O, Freeman JL. Chemical and genetic zebrafish models to define mechanisms of and treatments for dopaminergic neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):5981. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21175981>
80. Yurtsever İ, Üstündağ ÜV, Ünal İ, et al. Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug and Chemical Toxicology*. 2020;45:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1846549>
81. Hijaz BA, Volpicelli-Daley LA. Initiation and propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*. 2020;15:19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>
82. Ilie OD, Duta R, Jijie R, et al. Assessing Anti-Social and Aggressive Behavior in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Parkinson's Disease Chronically Exposed to Rotenone. *Brain Sciences*. 2022;12(7):898. DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci12070898>
83. Kesh S, Kannan RR, Balakrishnan A. Naringenin alleviates 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in SHSY5Y cells and zebrafish model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 2021;239:108893. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108893>
84. Dumitru G, Abidar S, Nhiri M, et al. Effect of *Ceratonia siliqua* methanolic extract and 6-hydroxydopamine on memory impairment and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Revista de Chimie*. 2018;69(12):3545-3548. DOI: <https://doi.org/10.37358/RC.18.12.6788>
85. Abidar S, Boiangiu RS, Dumitru G. The aqueous extract from *Ceratonia siliqua* leaves protects against 6-hydroxydopamine in zebrafish: understanding the underlying mechanism. *Antioxidants*. 2020;9(4):304. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9040304>
86. Hamzah NM, Lim SM, Vijayanathanet Y, et al. Locomotor assessment of 6-hydroxydopamine-induced adult zebrafish-based Parkinson's disease model. *Journal of Visualized Experiments*. 2021;178:e63355. DOI: <https://doi.org/10.3791/63355>

## Reference

1. Shabalin VN, Shatokhina SN. The role of ageing in human evolutionary development. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 2020;90(12):1119-1127. Russian. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869587320120233>
2. Hussain F, Kayani HUR. Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*. 2020;6(5):e04107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107>
3. Musaeva OT, Soatov MM, Halilova BR. The main age-related diseases and conditions common among elderly men and women. *Research Journal of Trauma and Disability Studies*. 2023;2(4):14-25. Russian.
4. Khor ES, Noor SM, Wong PF. Understanding the role of ztor in aging-related diseases using the zebrafish model. *In Vivo*. 2019;33(6):1713-1720. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.11661>
5. Kolesnikova TO, Ilyin NP, Kotova MM, et al. Zebrafish as a Promising Model in Translational Neurobiology and Biomedicine. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2023;54(3):1-18. Russian. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0301179823030037>
6. Zhang C, Zhang J, Zhu L, et al. Fluoxastrobin-induced effects on acute toxicity, development toxicity, oxidative stress, and DNA damage in *Danio rerio* embryos. *Science of the Total Environment*. 2020;715:137069. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137069>

7. Yuan M, Li W, Xiao P. Bixafen causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28:36303-36313. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13238-5>
8. Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discovery*. 2018;4:45. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7>
9. Brito RS, Canedo A, Farias D, et al. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Science of the Total Environment*. 2022;848:157665. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157665>
10. de Abreu MS, Demin KA, Costa FV, et al. Neuropharmacology of Aggression in Model Systems: The Zebrafish as a New Narrative. *Handbook of Anger, Aggression, and Violence*. Cham: Springer International Publishing; 2023. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-98711-4\\_141-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-98711-4_141-1)
11. Rothenbücher TSP, Ledin J, Gibbs D, et al. Zebrafish embryo as a replacement model for initial biocompatibility studies of biomaterials and drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*. 2019;100:235-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.038>
12. Bradford YM, Van Slyke CE, Ruzicka L, et al. Zebrafish information network, the knowledgebase for *Danio rerio* research. *Genetics*. 2022;220(4):iyac16. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac016>
13. Ali Z, Zang J, Lagali N, et al. Photoreceptor Degeneration Accompanies Vascular Changes in a Zebrafish Model of Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2020;61(2):43. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.61.2.43>
14. Noel NCL, Nadolski NJ, Hocking JC, et al. Progressive Photoreceptor Dysfunction and Age-Related Macular Degeneration-Like Features in rp111 Mutant Zebrafish. *Cells*. 2020;9(10):2214. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9102214>
15. Murphy LB, Santos-Ledo A, Dhanaseelan T, et al. Exercise, programmed cell death and exhaustion of cardiomyocyte proliferation in aging zebrafish. *Disease Models and Mechanisms*. 2021;14(7):dmm049013. DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.049013>
16. Krotova NA, Lakstygala AM, Taranov AS, et al. Zebrafish as a New Perspective Model in *Translational Neurobiology*. *Russian Journal of Physiology*. 2019;105(11):1417-1435. Russian. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0869813919110062>
17. Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, et al. Modeling and assaying seizure activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):193-199. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202193-199>
18. Derzhavina KA, Ilyin NP, Seredinskaya MV, et al. Zebrafish as a model organism for rare diseases of nervous system. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(2):17-32. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18705/2782-3806-2022-2-2-17-32>
19. Kalueff AV. Principles of modeling brain diseases and their therapy based on zebrafish studies. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):119-122. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202119-122>
20. Akhundova KR, Dudinskaya EN, Tkacheva ON. Geriatric aspects of diabetes mellitus. *Russian Journal of Geriatric Medicine*. 2020;(3):250-259. Russian. DOI: <https://doi.org/10.37586/2686-8636-3-2020-250-259>
21. Salehpour A, Rezaei M, Khoradmehr A, et al. Which hyperglycemic model of zebrafish (*Danio rerio*) suits my type 2 diabetes mellitus research. A scoring system for available methods. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:652061. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.652061>
22. Moon TW. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2001;129(2-3):243-249. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00316-5)
23. Mohammadi H, Manouchehri H, Changizi R, et al. Concurrent metformin and silibinin therapy in diabetes: Assessments in zebrafish (*Danio rerio*) animal model. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2020;19:1233-1244. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00637-7>
24. Lee Y, Yang J. Development of a zebrafish screening model for diabetic retinopathy induced by hyperglycemia: Reproducibility verification in animal model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;135:111201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111201>
25. Singh A, Castillo HA, Brown J, et al. High glucose levels affect retinal patterning during zebrafish embryogenesis. *Scientific Reports*.

- 2019;9:4121. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41009-3>
26. Wang JJ, Li Y, Lai K, et al. High-glucose/high-cholesterol diet in zebrafish evokes diabetic and affective pathogenesis: The role of peripheral and central inflammation, microglia and apoptosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2020;96:109752. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109752>
27. McCarthy E, Dunn J, Augustine K, et al. Prolonged Hyperglycemia Causes Visual and Cognitive Deficits in *Danio rerio*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(17):10167. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231710167>
28. Oyelaja-Akinsipo OB, Dare EO, Katare DP. Protective role of diosgenin against hyperglycaemia-mediated cerebral ischemic brain injury in zebrafish model of type II diabetes mellitus. *Heliyon*. 2020;6(1):e03296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03296>
29. Demidova TYu, Zenina SG. Insulin resistance and its role in the development of diabetes and other conditions. Current modalities to improve insulin sensitivity. *RMJ. Medical Review*. 2019;10(II):116-122. Russian.
30. Arslan-Ergul A, Adams MM. Gene expression changes in aging zebrafish (*Danio rerio*) brains are sexually dimorphic. *BMC Neuroscience*. 2014;15:29. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-29>
31. Wiggenhauser LM, Qi H, Stoll SJ, et al. Activation of retinal angiogenesis in hyperglycemic *pdx1*<sup>-/-</sup> zebrafish mutants. *Diabetes*. 2020;69(5):1020-1031. DOI: <https://doi.org/10.2337/db19-0873>
32. Yusef YuN, Elichev VP, Budzinskaya MV, et al. Gerontological aspects of eye diseases. *Russian Annals of Ophthalmology*. 2022;138(5-2):227-233. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17116/oftalma202213805227>
33. Hong Y, Luo Y. Zebrafish model in ophthalmology to study disease mechanism and drug discovery. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):716. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14080716>
34. Mishra S, Wu SY, Fuller AW, et al. Loss of  $\alpha$ B-crystallin function in zebrafish reveals critical roles in the development of the lens and stress resistance of the heart. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(2):740-753. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.808634>
35. Li XQ, Cai HC, Zhou S, et al. A novel mutation impairing the tertiary structure and stability of  $\gamma$ C-crystallin (CRYGC) leads to cataract formation in humans and zebrafish lens. *Human Mutation*. 2012;33(2):391-401. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.21648>
36. Ismailova SK, Balmuhanova AV. The current state of the problem of age-related macular degeneration. *Bulletin of the Kazakh National Medical University*. 2018;4:26-32. Russian.
37. Pan Y, Fu Y, Baird PN, et al. Exploring the contribution of ARMS2 and HTRA1 genetic risk factors in age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2023;97:101159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101159>
38. Rosa JGS, Lopes-Ferreira M, Lima C. An overview towards zebrafish larvae as a model for ocular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5387. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065387>
39. Ali Z, Mukwaya A, Biesemeier, et al. Intussusceptive vascular remodeling precedes pathological neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019;39(7):1402-1418. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312190>
40. Schmitner N, Recheis C, Thönig J, et al. Differential responses of neural retina progenitor populations to chronic hyperglycemia. *Cells*. 2021;10(11):3265. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113265>
41. Baek J, Lee, H, Lee, HH, et al. Thirty-six year trends in mortality from diseases of circulatory system in Korea. *Korean Circulation Journal*. 2021;51(4):320-332. DOI: <https://doi.org/10.4070/kcj.2020.0424>
42. Dahme T, Katus HA, Rottbauer W. Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. *Disease Models and Mechanisms*. 2009;2(1-2):18-22. DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.000687>
43. Hein S, Hassel D, Kararigas G. The zebrafish (*Danio rerio*) is a relevant model for studying sex-specific effects of 17 $\beta$ -estradiol in the adult heart. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24):6287. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20246287>
44. Zhao Y, Yun M, Nguyen S.A, et al. In vivo surface electrocardiography for adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;150:e60011. DOI: <https://doi.org/10.3791/60011>
45. Cooper TK, Spitsbergen JM. Valvular and mural endocardiosis in aging zebrafish (*Danio rerio*). *Veterinary Pathology*. 2016;53(2):504-509. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985815594853>

46. Stoyek MR, Rog-Zielinska EA, Quinn TA. Age-associated changes in electrical function of the zebrafish heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018;138:91-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.014>
47. Evans JR, Torres-Pérez JV, Petrazzini ME, et al. Stress reactivity elicits a tissue-specific reduction in telomere length in aging zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*. 2021;11(1):339. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79615-1>
48. Ahmedov VA, Shevchenko AS, Isaeva AS. Modern views on the factors of the occurrence and progression of atherosclerosis. *RMJ. Medical Review*. 2019;3(1-2):57-62. Russian.
49. Dubińska-Magiera M, Migocka-Patrzałek M, Lewandowski D, et al. Zebrafish as a model for the study of lipid-lowering drug-induced myopathies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5654. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22115654>
50. Choi MH, Yang JH, Seo JS, et al. Prevalence and diagnosis experience of osteoporosis in postmenopausal women over 50: Focusing on socioeconomic factors. *PLoS ONE*. 2021;16(3):e0248020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248020>
51. Hayes AJ, Reynolds S, Nowell MA, et al. Spinal deformity in aged zebrafish is accompanied by degenerative changes to their vertebrae that resemble osteoarthritis. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e75787. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075787>
52. Carnovali M, Banfi G, Mariotti M. Zebrafish models of human skeletal disorders: embryo and adult swimming together. *BioMed Research International*. 2019;2019:1253710. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1253710>
53. Dietrich K, Fiedler IAK, Kurzyukova A, et al. Skeletal biology and disease modeling in zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;36(3):436-458. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4256>
54. Kobayashi-Sun J, Yamamori S, Kondo M, et al. Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale. *Communications Biology*. 2020;3:190. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0925-1>
55. Zhang H, Wang A, Li G, et al. Osteoporotic bone loss from excess iron accumulation is driven by NOX4-triggered ferroptosis in osteoblasts. *Free Radical Biology and Medicine*. 2023;198:123-136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.026>
56. Peng W, Zhang W, Wu Q, et al. *Agaricus bisporus*-derived glucosamine hydrochloride facilitates skeletal injury repair through Bmp signaling in zebrafish osteoporosis model. *Journal of Natural Products*. 2021;84(4):1294-1305. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00002>
57. Papadopoulos I, Bountouvi E, Attilakos A, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: clinical, genetic, and treatment-response study of 10 new cases in Greece. *European Journal of Pediatrics*. 2019;178:323-329. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00431-018-3299-3>
58. Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone*. 2019;126:2-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.005>
59. Bek JW, Shochat C, De Clercq A, et al. Lrp5 Mutant and Crispant Zebrafish Faithfully Model Human Osteoporosis, Establishing the Zebrafish as a Platform for CRISPR. Based Functional Screening of Osteoporosis Candidate Genes. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;36(9):1749-1764. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4327>
60. Kague E, Turci F, Newman E, et al. 3D assessment of intervertebral disc degeneration in zebrafish identifies changes in bone density that prime disc disease. *Bone Research*. 2021;9(1):39. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00156-y>
61. McGowan LM, Kague E, Vorster A, et al. Wnt16 elicits a protective effect against fractures and supports bone repair in zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research Plus*. 2021;5(3):e10461. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm4.10461>
62. Kirk B, Zanker J, Hassan, EB, et al. Sarcopenia definitions and outcomes consortium (SDOC) criteria are strongly associated with malnutrition, depression, falls, and fractures in high-risk older persons. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2021;22(4):741-745. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2020.06.050>
63. Hasumura T, Meguro S. Exercise quantity-dependent muscle hypertrophy in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Physiology B*. 2016;186:603-614. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0977-1>
64. Busse B, Galloway JL, Gray RS, et al. Zebrafish: an emerging model for orthopedic research. *Journal of Orthopaedic Research*.

- 2020;38(5):925-936. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.24539>
65. Feng S, Wang S, Wang Y, et al. Identification and expression of carbonic anhydrase 2, myosin regulatory light chain 2 and selenium-binding protein 1 in zebrafish *Danio rerio*: Implication for age-related biomarkers. *Gene Expression Patterns*. 2018;29:47-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gep.2018.04.007>
66. Semenova TN, Guzanova EV, Sorokina TA. Features of speech disorders and their diagnosis in neurodegenerative diseases. *Practical medicine*. 2019;17(3):23-27. Russian.
67. Karoglu ET, Halim DO, Erkaya B, et al. Aging alters the molecular dynamics of synapses in a sexually dimorphic pattern in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Aging*. 2017;54:10-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.02.007>
68. Monzio Compagnoni G, Di Fonzo A, Corti S, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*. 2020;57:2959-2980. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
69. Alhazmi HA, Albratty M. An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2022;30(12):1755-1764. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.10.004>
70. Salkov VN, Khudoyerkov RM. The role of aluminum and lead in the development of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2021;83(3):56-61. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17116/patol20218303156>
71. Moloney CM, Lowe VJ, Murray ME. Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: a clinicopathologic perspective for biomarker research. *Alzheimer's and Dementia*. 2021;17(9):1554-1574. DOI: <https://doi.org/10.1002/ALZ.12321>
72. Nada SE, Williams FE, Shah ZA. Development of a novel and robust pharmacological model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease in zebrafish. *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets*. 2016;15(1):86-94. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821105602>
73. Brinza I, Abd-Alkhalek AM, El-Raey MA, et al. Ameliorative effects of rhoifolin in scopolamine-induced amnesic zebrafish (*Danio rerio*) model. *Antioxidants*. 2020;9(7):580. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9070580>
74. Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*. 2014;5:189. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00189>
75. Fukusumi H, Togo K, Sumida M, et al. Alpha-synuclein dynamics in induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons from a Parkinson's disease patient (PARK4) with SNCA triplication. *FEBS Open Bio*. 2021;11(2):354-366. DOI: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13060>
76. Magistrelli L, Contaldi E, Comi C. The impact of SNCA variations and its product alpha-synuclein on non-motor features of parkinson's disease. *Life*. 2021;11(8):804. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11080804>
77. Mitsumoto Y, Mori A. Acute restraint stress augments 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity via increased toxin uptake into the brain in C57BL/6 mice. *Neuroscience Bulletin*. 2018;34(5):849-853. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0254-2>
78. Sarath BN, Murthy CL, Kakara S, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics*. 2016;16(9):1407-1420. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.201500291>
79. Wasel O, Freeman JL. Chemical and genetic zebrafish models to define mechanisms of and treatments for dopaminergic neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):5981. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21175981>
80. Yurtsever İ, Üstündağ ÜV, Ünal İ, et al. Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug and Chemical Toxicology*. 2020;45:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1846549>
81. Hijaz BA, Volpicelli-Daley LA. Initiation and propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*. 2020;15:19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>
82. Ilie OD, Duta R, Jijie R, et al. Assessing Anti-Social and Aggressive Behavior in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Parkinson's Disease Chronically Exposed to Rotenone. *Brain Sciences*. 2022;12(7):898. DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci12070898>
83. Kesh S, Kannan RR, Balakrishnan A. Naringenin alleviates 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in SHSY5Y cells and zebrafish

model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 2021;239:108893. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108893>

84. Dumitru G, Abidar S, Nhiri M, et al. Effect of *Ceratonia siliqua* methanolic extract and 6-hydroxydopamine on memory impairment and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Revista de Chimie*. 2018;69(12):3545-3548. DOI: <https://doi.org/10.37358/RC.18.12.6788>

85. Abidar S, Boiangiu RS, Dumitru G. The aqueous extract from *Ceratonia siliqua* leaves protects against 6-hydroxydopamine in zebrafish: understanding the underlying mechanism. *Antioxidants*. 2020;9(4):304. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9040304>

86. Hamzah NM, Lim SM, Vijayanathanet Y, et al. Locomotor assessment of 6-hydroxydopamine-induced adult zebrafish-based Parkinson's disease model. *Journal of Visualized Experiments*. 2021;178:e63355. DOI: <https://doi.org/10.3791/63355>

Статья поступила в редакцию 4 июля 2023 г.  
Поступила после доработки 18 октября 2023 г.  
Принята к печати 26 января 2024 г.

Received 4 July 2023  
Revised 18 October 2023  
Accepted 26 January 2024

### Информация об авторах

**Людмила Ивановна Лашенова**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Волгоград, Российская Федерация, E-mail: [mih-li@mail.ru](mailto:mih-li@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1052-9418>.

**Валентина Николаевна Перфилова**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточных технологий Научного центра инновационных лекарственных средств ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Волгоград, Российская Федерация, E-mail: [vnperfilova@mail.ru](mailto:vnperfilova@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2457-8486>.

**Григорий Леонидович Снигур**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Волгоград,

Российская Федерация, E-mail: [sgrigoryl@mail.ru](mailto:sgrigoryl@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8612-6186>.

**Алан Валерьевич Калуев**, доктор биологических наук, профессор Российской академии наук, заведующий лабораторией биологической психиатрии, Институт трансляционной биомедицины, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург; профессор направления «Нейробиология», Научный центр Генетики и Наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Российская Федерация, E-mail: [avkalueff@gmail.com](mailto:avkalueff@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7525-1950>.

### Information about the authors

**Lyudmila I. Lashhenova**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, E-mail: [mih-li@mail.ru](mailto:mih-li@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1052-9418>.

**Valentina N. Perfilova**, Doct. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Cell Technology, Scientific Centre for Innovative Medicines, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, E-mail: [vnperfilova@mail.ru](mailto:vnperfilova@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2457-8486>.

**Grigoriy L. Snigur**, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, E-mail: [sgrigoryl@mail.ru](mailto:sgrigoryl@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8612-6186>.

**Allan V. Kalueff**, Doct. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Biological Psychiatry, Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg; Professor of Neurobiology, Scientific Centre for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia, E-mail: [avkalueff@gmail.com](mailto:avkalueff@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7525-1950>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-8

УДК 576.54

# Regulation of natural killer cells cytotoxicity by trophoblast cells: proteins and receptors

Polina V. Grebenkina , Valentina A. Mikhailova , Elizaveta V. Tyschuk ,  
Oksana B. Marko , Varvara A. Yukhina , Anastasia M. Gulina ,  
Olesya N. Bepalova , Sergey A. Selkov , Dmitriy I. Sokolov

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology  
3 Mendeleevskaya Line, Saint Petersburg, 199034, Russia  
*Corresponding author: Polina V. Grebenkina (grebenkinap@gmail.com)*

## Abstract

**Background:** Interaction between trophoblast and natural killer cells is determined by microenvironment. Cytotoxicity of NK against targets, including trophoblasts, is associated with production of perforin, granzymes. Trophoblasts are not destroyed by NK but trophoblast-cell resistance is understudied. **The aim of the study:** To evaluate the interaction between NK and trophoblasts in the presence of cytokines typical of the uteroplacental contact microenvironment during pregnancy. We evaluated changes in the expression of proteins responsible for the implementation of cytotoxic function in NK and trophoblast cells under short-term and long-term co-culture. **Materials and methods:** In this study we used cell cultures – NK-92 and JEG-3 as a model of interaction between fetus and mother's immune system. To analyze changes in phenotype, cytokines secretion and amount of cytotoxicity proteins we used flow cytometry. **Results:** We observed that intensity of GrA expression by NK-92 was lower than GrB. There was no transfer of GrA to trophoblast within 24 hours of co-culturing. The appearance of GrA in trophoblast with a simultaneous decrease in expression by NK-92 was noted after 96 hours. NK-92 and JEG-3 cells constitutively expressed serpin B9. Cytokines did not affect the content of GrA, GrB, perforin, and serpin B9 in the NK-92 monoculture. IL-15, IL-18, IL-10 caused a decrease in serpin B9 expression by trophoblasts, but co-culturing with NK-92 diminished this effect. When co-cultured with trophoblasts for 96 hours, intensity of expression of GrA, GrB, perforin and serpin B9 by NK-92 decreased. TNF $\alpha$  and IL-15 decreased the inhibitory effect of trophoblasts on GrA expression by NK. IL-15 and TGF $\beta$  caused an increase in the number of JEG-3 containing GrA. **Conclusion:** The interaction between NK and trophoblasts is a dynamic process accompanied by the transfer of cytotoxic proteins and changes in the expression of serpin B9. The used cytokines affected the transfer of proapoptotic proteins in co-culture.

**Keywords:** granzyme; perforin; serpin B9; trophoblast; NK-cells; HLA-G; IL-10; IL-15; IL-18; TNF $\alpha$ ; IFN $\gamma$ ; TGF $\beta$ 1

**For citation:** Grebenkina PV, Mikhailova VA, Tyschuk EV, et al. Regulation of natural killer cells cytotoxicity by trophoblast cells: proteins and receptors. Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):142-163. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-8

**Introduction.** The main function of natural killer cells (NK cells) is to realize

cytotoxicity against malignant or virus-infected cells [1]. The role of NK cells in

regulating the interaction between immune cells and the microenvironments, including during pregnancy, has been actively studied [2, 3, 4]. Decidual NK (dNK) cells differ in their phenotype and function from peripheral blood NK cells [2]. dNK cells interact with trophoblast cells, which invade the decidua. It is assumed that trophoblast cells and dNK cells influence each other's characteristics due to contact and distant interactions [2, 5]. Trophoblast and NK cells secrete a wide range of cytokines in the uterus to regulate the functions of each other as well as the microenvironment. Both trophoblast and NK cells have been proven to secrete TGF $\beta$  [6, 7]. It has been observed that TGF $\beta$  suppresses the ability of NK cells to proliferate, inhibiting their cytotoxicity [8]. TGF $\beta$  also stimulates trophoblast-cell invasion [9]. The functions of the microenvironment in the uteroplacental contact zone can be controlled by TGF $\beta$  as well as TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-18, and IL-15; these are secreted by trophoblast cells, NK cells, and other microenvironment cells [10-13]. IL-15 and IL-10 are produced by trophoblast, stromal, and dendritic cells; IL-18 is produced both by macrophages and endometrial cells [14, 15].

NK cells realize cytotoxicity against target cells, including trophoblast cells, in several ways. One is the secretion of granzymes, granulysin, and perforin [16]. dNK cells have reduced cytotoxicity [17]. This may be caused by several factors, including a decrease in the activity of cytotoxic protein synthesis under the influence of microenvironmental factors (trophoblast cells and cytokines) or the transfer of a part of cytotoxic proteins to nearby cells [18]. It has been demonstrated that the cytotoxic function of NK cells changes under the action of cytokines with an increase in exposure time. Co-culturing in the presence of TNF $\alpha$  for 24 hours increased the cytotoxicity of NK cells toward trophoblasts; a prolongation of the co-culture time diminished this effect. Different results were obtained for TGF $\beta$  [19]. Despite their reduced cytotoxicity, dNK cells should retain a baseline level; a decrease may cause obstetric pathologies.

It is believed that one method to restore the dNK cell pool is the migration of NK cells from peripheral blood. It has been observed that in patients with recurrent implantation failures, peripheral blood NK cells have reduced cytotoxicity as well as a low expression of activating receptors and granzyme B (GrB) compared with fertile women [20].

Serpins are inhibitors of serine proteinases. They regulate the activity of granzymes and protect target cells from their action. The interaction between serpin B9 and GrB is the most studied [7]. Another protective mechanism of trophoblast cells is their expression of a nonclassical MHC class I molecule, HLA-G [21]. HLA-G binds to the receptor on the NK cell surface, causing a decrease in the synthesis of IFN $\gamma$  by NK cells [22] as well as their cytotoxic activity [23]. The reduced cytotoxicity of uterine dNK cells may be caused by their differentiation from regulatory phenotypes under the effect of trophoblast cells. Populations of NK cells with reduced levels of CD56 tend to have a greater cytotoxic activity [23], whereas NK cells of the decidua have increased CD56 levels and a low cytotoxic activity [24]. An increase in CD56 expression was considered to be a marker of NK cell differentiation in a decidual population [25]. Trophoblast cells may be regulators of this transformation; the intensity of CD56 expression levels by NK cells increased when they were co-cultured [26].

During pregnancy, a unique balanced system develops in the uterus between NK, trophoblast, and other cells of the microenvironment. This is necessary for the maintenance and development of physiological pregnancy [27]. Despite the importance of these processes that occur in the uterus during pregnancy, the molecular mechanisms of the interaction between NK cells and trophoblast cells have not been fully studied. This may be due to both the complexity of dNK cell isolation and the difficulties associated with the modeling of cell interactions.

**The aim of the study.** To evaluate the interaction between NK and trophoblasts in the

presence of cytokines typical of the uteroplacental contact microenvironment during pregnancy. We considered changes in the expression of the proteins to be responsible for the realization of the cytotoxic function by NK cells. We also evaluated the content of these proteins in trophoblast cells after their

short-term and long-term co-culture in the presence of cytokines. Information regarding the content of cytokines and proteins in the natural killer or trophoblast cells used in this work and their functions are described in Table.

Table

**Content and functions of some proteins in NK cells and in trophoblast cells**

Protein	NK cells	NK-92	Trophoblast	JEG-3	Function
TNF $\alpha$	Found [28, 29]	Found [30-32] Or can be less than detection limit [33]	No data	No data	Regulation of the NK cell cytotoxicity [28], stimulation of trophoblast cells invasion [34]
IFN $\gamma$	Found [28, 29]	Found [31, 32]	No data	No data	Enhancement of cytotoxic properties of NK cells [28], reduction of invasion and viability of trophoblast cells [35]
TGF $\beta$	Found [36, 37]	No data	Found [38, 39]	Found [40, 41]	Regulation of cytotoxic activity of NK cells [42, 43]
IL-15	No data	No data	Found [44, 45]	Found [45]	Maturation, differentiation, proliferation of NK cells [46], regulation of cell resistance to apoptosis [47]
IL-18	No data	No data	No data	No data	Enhancement of IFN $\gamma$ synthesis by NK cells, regulation of their cytotoxic activity [48]
IL-10	Found [49]	Found [33]	Found [50, 51]	Found [52]	Regulation of cytotoxicity and stimulation of NK cell proliferation [53], induction of HLA-G expression by trophoblast cells [54], reduction of invasive ability of trophoblast cells [55], decrease in the rate of apoptosis [56], and increased resistance to apoptosis [57]
RANTES	Found [58, 59]	Found [60, 61]	Found [51, 58]	Found [62]	Stimulation of trophoblast cells invasion [58], increased migration activity of NK cells, proliferation and activation [63-65]
VEGF	Found [66, 67]	Found [68]	Found [69, 70]	Found [71]	Regulation of trophoblast cells invasion [72, 73]
CD56	Found [74, 75]	Found [76, 77]	No data	No data	Adhesion [78], marker of NK cells, decidualization [79]
HLA-G	No data	No data	Found [80, 81]	Found [82, 83]	Ensuring immune tolerance, avoiding cytotoxicity reactions [84], regulation of invasion [82]
Perforin	Found [85, 86]	Found [87, 88]	No data	No data	Participation in the realization of the cytotoxic function of NK cells [89]
GrA	Found [90, 91]	Found [92]	No data	No data	
GrB		Found [90, 91]	No data	No data	
Serpin B9	Found [94]	Found [95]	No data	No data	Protection from the action of GrB [96]

**Materials and Methods.** We performed this study using JEG-3 and NK-92 cell lines (ATCC, USA), which reflect the main characteristics of extravillous trophoblasts and natural killer cells, respectively [97, 98, 99]. The cells were cultured according to the manufacturer's recommendations in a humid environment at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The viability of the cells was controlled by trypan blue exclusion; this was 95±3.4%.

The following inducers were used: TNF $\alpha$  (50 U/mL), IFN $\gamma$  (1000 U/mL), TGF $\beta$ 1 (5 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), IL-18 (10 ng/mL), and IL-10 (10 ng/mL) (RnD, USA). These concentrations were chosen according to the concentrations of human biological fluids, including in the area of uteroplacental contact [100, 101, 102].

*Cultivation of NK-92 cells in a monoculture or co-culture with JEG-3 cells.* The cells were cultivated as previously described in [103]. Briefly, 2×10<sup>4</sup> cells of the JEG-3 line were cultured in the wells of a 96-well plate (Sarstedt, Germany) in 100  $\mu$ L of a complete growth medium (DMEM) (Biolot, Russia). After 24 hours, NK-92 cells were added to parts of the wells, with a formed monolayer of trophoblast cells in 100  $\mu$ L of a medium of 20,000 cells (the co-culture). NK-92 cells were also placed in empty wells to receive a monoculture. IL-2 (500 U/mL) was added to all wells (Biotech, Russia). Cytokines were added to a few of the wells, then the cells were cultured for 24 hours in the presence of TGF $\beta$ 1 or 96 hours in the presence of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, IL-15, IL-18, or IL-10. Subsequently, analyses of the cell expressions of the surface receptors and intracellular proteins were conducted. Four experiments were conducted, with two technical repetitions for each experiment.

*Analysis of the surface and intracellular protein levels in NK-92 and JEG-3 cells under mono- and co-culture conditions.* After the co-cultivation of JEG-3 and NK-92 cells, fixation and permeabilization were performed for 24 and 96 hours using a Cytofix/Cytoperm kit

(BD, USA). GrA, GrB, perforin (BD, USA), and serpin B9 (NOVUS, USA) monoclonal antibodies were used for intracellular staining according to the manufacturers' instructions. To separate the NK cells and trophoblast cells, we used CD45, CD56, cytokeratin 7 (BD, USA), and HLA-G antibodies (Biolegend, USA). The level of expression of HLA-G by the JEG-3 cells was also analyzed. The control of nonspecific binding was identified using isotypic antibodies. We studied two parameters: the relative number of cells that expressed/contained proteins and the mean fluorescence intensity (MFI). These parameters were assessed using a FACS Canto II flow cytometer (BD, USA). We did not observe any data to confirm that JEG-3 cells could spontaneously express cytotoxic-related proteins. We used "expression" to describe changes in the content of GrA, GrB, and perforin in JEG-3 cells. The gating strategy is presented in Supplementary Materials, Figure 1.

*Statistical analysis.* Statistical analysis of the data obtained was performed using a non-parametric analogue of the Mann-Whitney test with Bonferroni correction. For multiple comparisons, we used the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. All tests were performed using GraphPad Prism, version 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal State Budgetary Scientific Institution "D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology" (Protocol No.118, 9 June 2022).

## Results and discussion

*Evaluation of HLA-G expression by JEG-3 cells after cultivation for 24 and 96 hours.* Under mono- and co-culture conditions for 24 hours, the JEG-3 cells did not change the expression of HLA-G (both the relative number of cells and the MFI) in the presence or absence of TGF $\beta$ 1 (Fig. 1a, 1b).

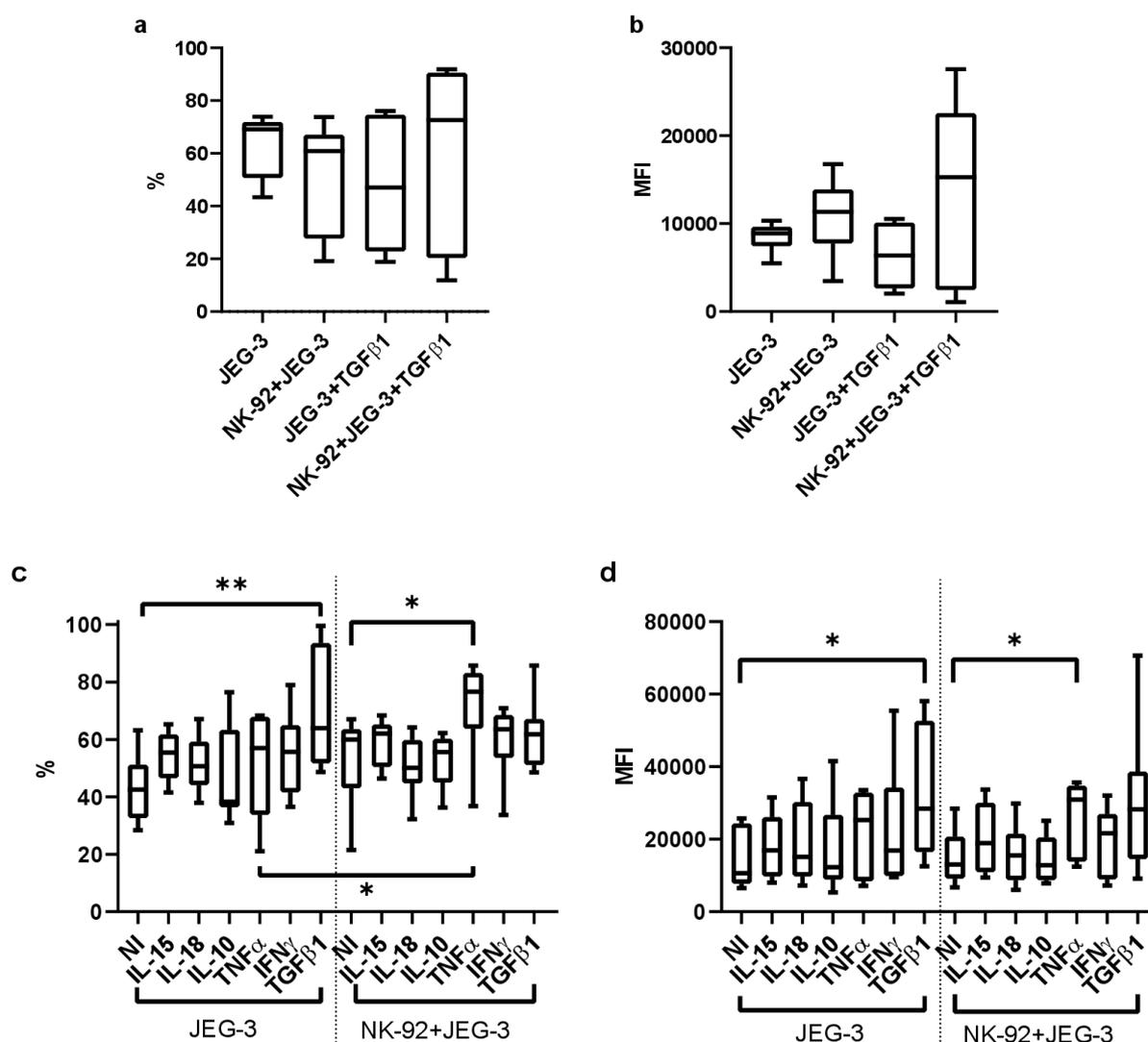


Fig. 1. Expression of HLA-G by JEG-3 cells in monoculture and in coculture with NK-92 cells in the presence of TGF $\beta$ 1 for 24 hours (a, b) or for 96 hours (c, d): relative number of JEG-3 cells expressing HLA-G (a, c); the intensity of expression of HLA-G JEG-3 cells (b, d). NI – JEG-3 cells without inducers. Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

In monoculture conditions (96 hours), the relative number of JEG-3 trophoblast cells expressing HLA-G and the intensity of the HLA-G expression were higher in the presence of TGF $\beta$ 1 compared with the trophoblast cells cultivated without it (Fig. 1c, 1d). The other cytokines in the monoculture (96 hours) did not affect the expression of HLA-G by the trophoblast cells. In the presence of TNF $\alpha$  (96 hours), the number of trophoblast cells expressing HLA-G was higher in co-culture conditions with NK-92 cells compared with trophoblast cells in a co-culture without cytokines as well as in a monoculture with

cytokines (Fig. 1c). In the presence of TNF $\alpha$  (96 hours), the intensity of the expression of HLA-G by JEG-3 cells in the co-culture was higher than without cytokines, but did not differ from the monoculture of the same cells with cytokines (Fig. 1d).

*Expression level of cytotoxicity-related proteins in NK cells and trophoblast cells after co-cultivation with or without TGF $\beta$ 1 for 24 hours.* The NK-92 cells contained the cytotoxic proteins GrA, GrB, and perforin (Fig. 2). Neither the number of NK-92 cells containing GrA and perforin nor the intensity of expression of these proteins changed under

different culture conditions for 24 hours (Fig. 2). Under the same conditions, the number of NK-92 cells containing GrB also did not change (Fig. 2b). However, the intensity of the GrB expression was reduced after the

incubation of NK cells with trophoblast cells compared with the monoculture. This difference was established both in cultivation in an environment with TGF $\beta$ 1 and without it (Fig. 2e).

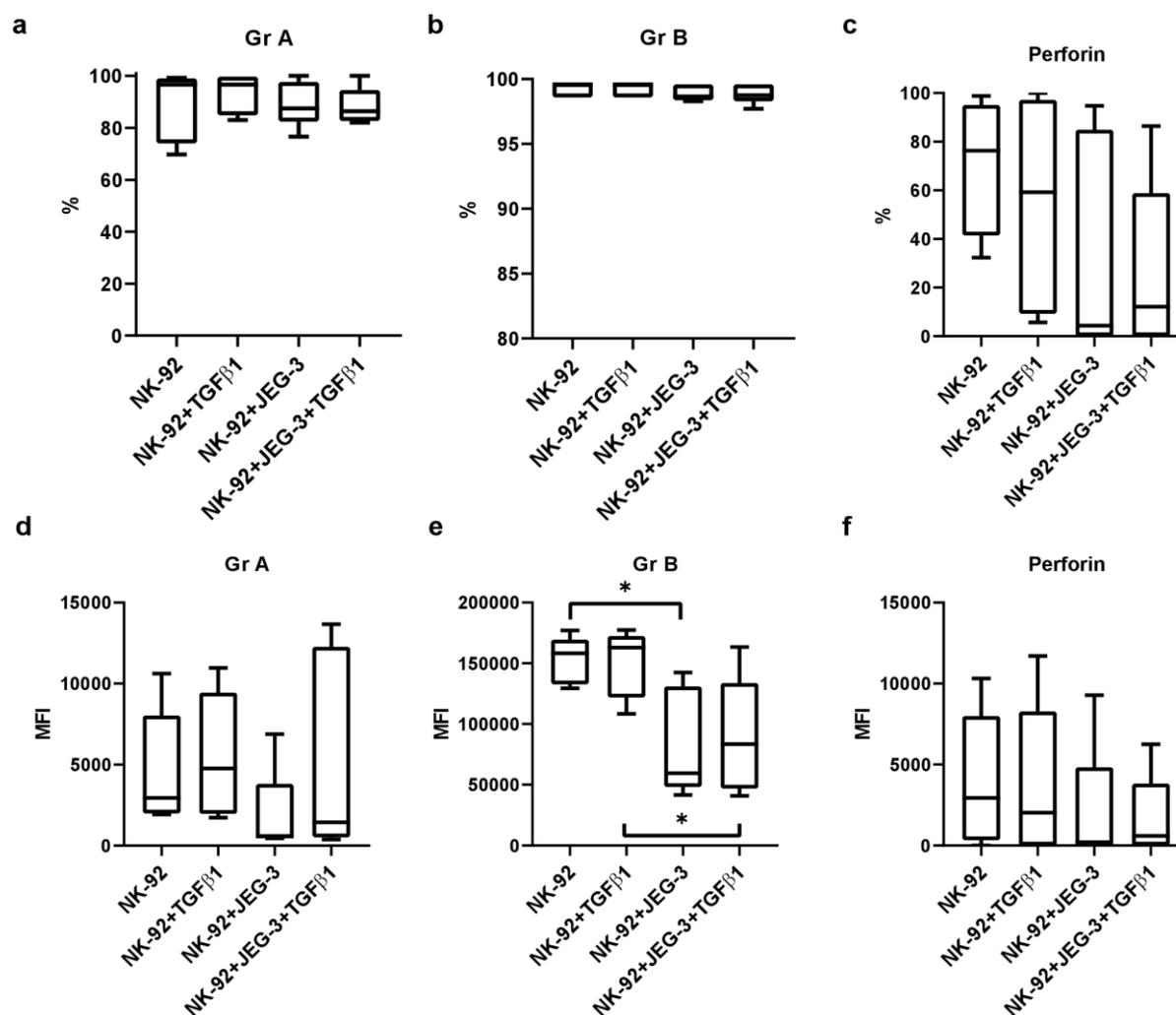


Fig. 2. Expression of cytotoxic proteins GrA, GrB and perforin by NK-92 cells in monoculture and in coculture with JEG-3 cells in the presence of TGF $\beta$ 1 for 24 hours: relative number of cells expressing GrA (a), GrB (b), perforin (c); intensity of expression of GrA (d), GrB (e), perforin (f). Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ .

JEG-3 cells did not express GrA, GrB, or perforin (Fig. 3 and 7). In the conditions of a co-culture with NK-92 cells, the number of JEG-3 cells expressing GrB increased within 24 hours (Fig. 3b). These results were established both in the presence of TGF $\beta$ 1 and

without it in co-culture conditions. Under the conditions of a co-culture with trophoblast cells, the intensity of the expression of GrB and perforin increased both in the medium with TGF $\beta$ 1 and without it (Fig. 3e, 3f).

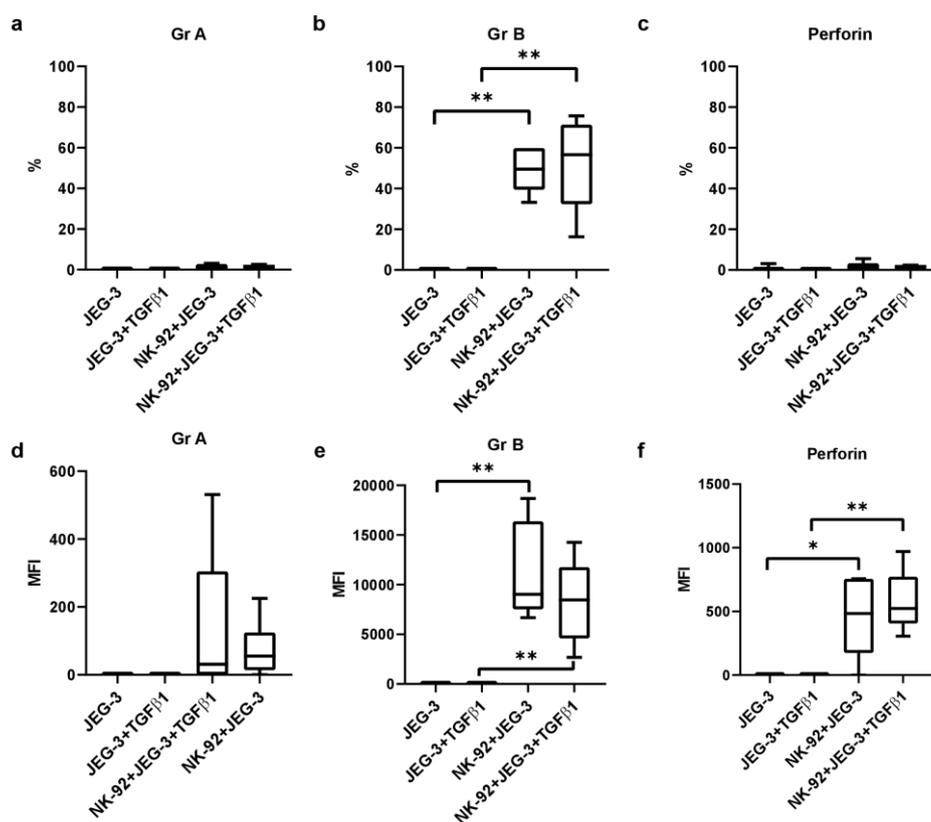


Fig. 3. Expression of cytotoxic proteins in JEG-3 cells in monoculture and in coculture with NK-92 cells in the presence of TGFβ1 for 24 hours: relative number of cells expressing GrA (a), GrB (b), perforin (c); intensity of expression of GrA (d), GrB (e), perforin (f). Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ .

The number of NK cells expressing serpin B9 (Fig. 4a) and the intensity of its expression by NK cells (Fig. 4b) were reduced in co-culture conditions compared with a monoculture of NK-92 cells. After 24 hours of incubation with NK-92 cells, neither the number of trophoblast cells expressing this protein (Fig. 4c) nor the intensity of the serpin B9 expression (Fig. 4d) changed.

*Content of cytotoxicity-related proteins in NK and trophoblast cells in conditions of their mono- and co-culture for 96 hours in the presence of cytokines.* After 96 hours in the co-culture, the relative number of NK-92 cells containing GrA did not change in comparison with the monoculture.

Cytokines did not affect the number of NK-92 cells expressing GrA in the

monoculture or in the co-culture with trophoblast cells (Fig. 5a). Cytokines did not affect the intensity of the GrB expression by the NK cells under monoculture conditions. The intensity of the GrA expression in NK-92 cells was lower in the presence of JEG-3 trophoblast cells compared with nonactivated cells (Fig. 5d). In the presence of the cytokines IL-15, IL-18, IL-10, IFNγ, and TGFβ1, the intensity of the GrA expression by the NK-92 cells was lower in the co-culture relative to the NK cells in the presence of corresponding cytokines in the monoculture (Fig. 6d). IL-15 and TNFα caused an increase in the intensity of the GrA expression in the NK-92 cells in the co-culture compared with the NK cells in the co-culture without cytokines (Fig. 5d).

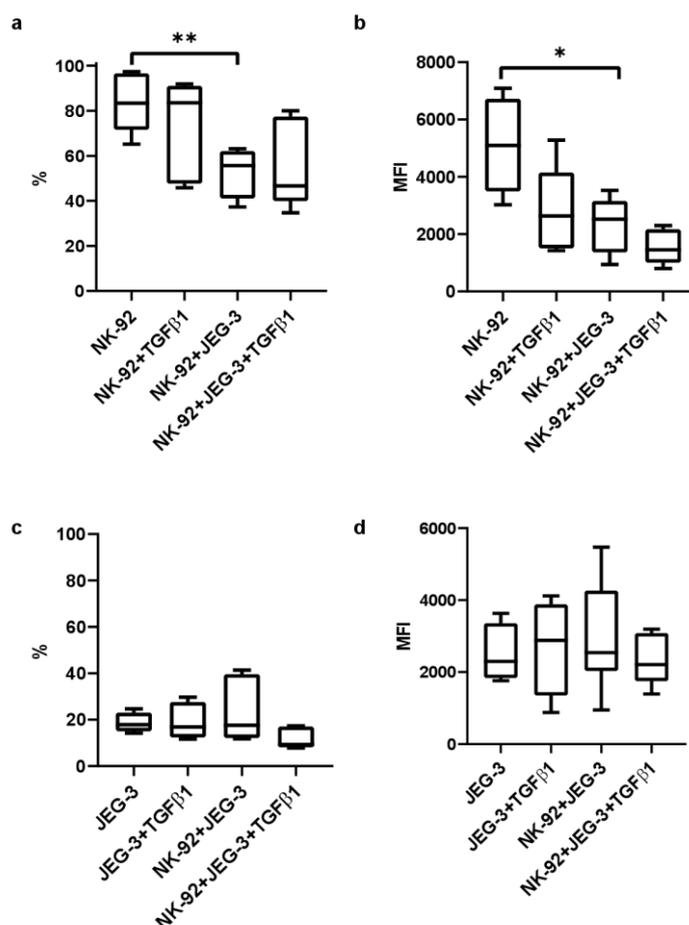


Fig. 4. Expression of serpin B9 by NK-92 (a, b) or JEG-3 (c, d) cells in monoculture and in coculture in the presence of TGFβ1 for 24 hours: relative amount (a, c); intensity of expression (b, d). Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ .

Cytokines did not affect the number of NK-92 cells expressing GrB or the intensity of protein in the monoculture. The relative number of NK cells expressing GrB was lower in the co-culture without cytokines and in the presence of IFN $\gamma$ ; other cytokines did not affect this parameter. TNF $\alpha$  canceled the effect of the trophoblast cells on the expression of GrB by the NK cells in the co-culture (Fig. 5b). The intensity of the GrB expression in the NK-92 cells was lower in the co-culture without cytokines. Cytokines did not affect the

intensity of the GrB expression in the NK cells in the co-culture with trophoblasts (Fig. 5e).

The relative number of NK-92 cells expressing perforin was reduced in co-culture conditions compared with the NK cells in the monoculture (Fig. 5c). This effect did not change when cytokines were added to the system (Fig. 5c). The intensity of the perforin expression in the NK-92 cells was reduced in the co-culture conditions compared with its expression in the NK-92 cells cultured in the monoculture. This effect did not change in the presence of cytokines (Fig. 5f).

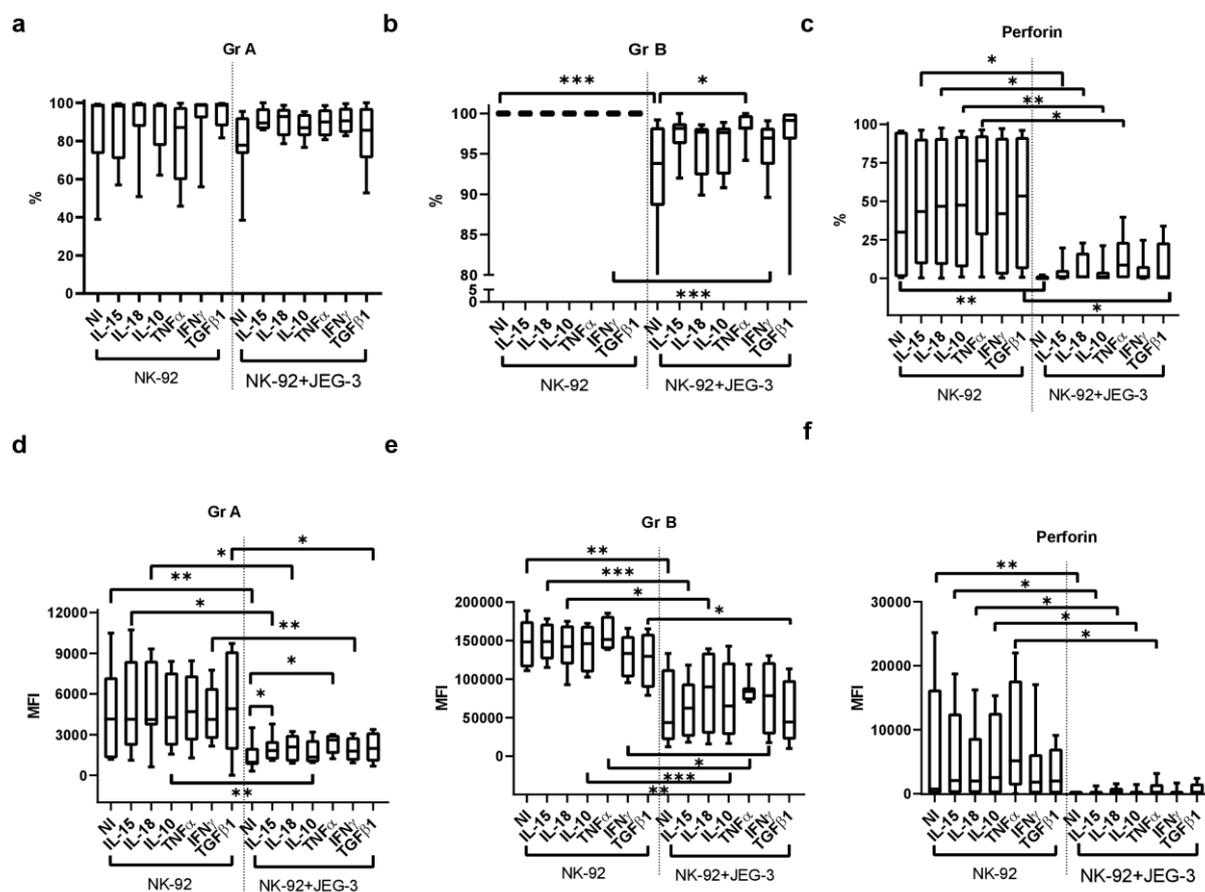


Fig. 5. Expression of cytotoxic proteins by NK-92 cells in monoculture and in coculture with JEG-3 cells for 96 hours: relative number of cells expressing GrA (a), GrB (b), perforin (c); intensity of expression of GrA (d), GrB (e), perforin (f). NI –NK-92 cells without inducers. Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

The relative number of JEG-3 cells containing GrA increased in the presence of the NK-92 cells. Of all the cytokines used in the co-culture, only IL-15 and TGFβ1 caused an increase in the relative number of JEG-3 cells containing GrA compared with intact cells (Fig. 6a).

The relative number of JEG-3 cells containing GrB did not change under the conditions of the co-culture. There was an increase in the intensity of the GrB expression by the trophoblast cells in the co-culture conditions (Fig. 6b, 6e). Under co-culture conditions, only IL-10 and IFNγ increased the

relative number of JEG-3 cells expressing GrB compared with intact cells in the co-culture.

The relative number of JEG-3 cells containing perforin and its MFI did not change under co-cultivation conditions with NK cells. Cytokines did not affect the MFI of perforin, either in the monoculture or the co-culture. The relative number of JEG-3 cells containing perforin was higher in the co-culture with NK cells with the addition of IL-10 or IFNγ compared with the trophoblasts in the monoculture with these cytokines, but did not differ from the trophoblast cells in the intact co-culture (Fig. 6c, 6f).

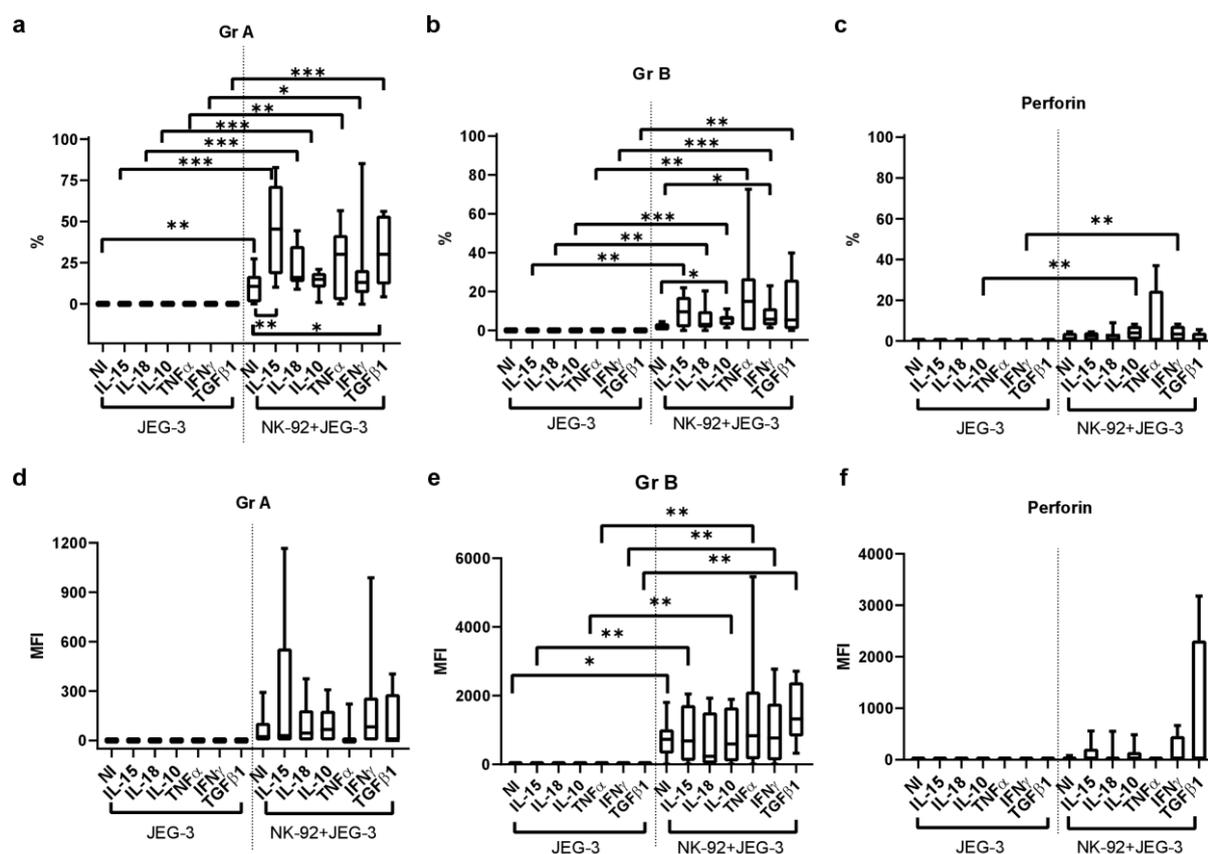


Fig. 6. Cytotoxic protein content in JEG-3 cells in monoculture and in coculture with NK-92 cells for 96 hours: relative number of cells expressing GrA (a), GrB (b), perforin (c); intensity of expression of GrA (d), GrB (e), perforin (f). NI – JEG-3 cells without inducers. Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

The NK-92 and JEG-3 cells expressed serpin B9 at a base level. Cytokines did not affect the number of NK cells expressing serpin B9 or the intensity of the serpin B9 expression in the monoculture. The relative number of NK-92 cells containing serpin B9 and its MFI were reduced in the co-culture compared with the intact NK-92 cells in the monoculture. The cytokines did not change this effect (Fig. 7a, 7b). In the monoculture, the relative number of JEG-3 cells containing serpin B9 and the MFI were reduced in the presence of IL-15, IL-18, or IL-10 compared with the intact cells (Fig. 7c).

In the co-culture, the relative number of trophoblast cells and the intensity of the serpin B9 expression did not change in comparison with the monoculture. In the co-culture, the NK-92 cells canceled the reducing effect of IL-15 and IL-10 on the intensity of the serpin B9

expression by the trophoblast cells (Fig. 7c, 7d).

NK cells can realize cytotoxicity against trophoblast cells [104]. They also express death receptors such as TRAIL-R and CD95 [101, 105]. Their ligands (TRAIL and CD95L) are expressed by trophoblast cells [106, 107, 108], indicating the possibility of an induction of apoptosis in natural killer cells by trophoblast cells. Despite this, there is no total destruction of these cells in the area of uteroplacental contact. This indicates the existence of short-term and long-term programs of interactions between these cells, depending on the situation. These may include [i] the existence of checks and balances in the mode of tolerance in the mother-fetus system; [ii] a restriction of trophoblast hyper-invasion [35, 109]; and [iii] a restriction in the cytotoxicity of NK cells against fetal cells [110, 111].

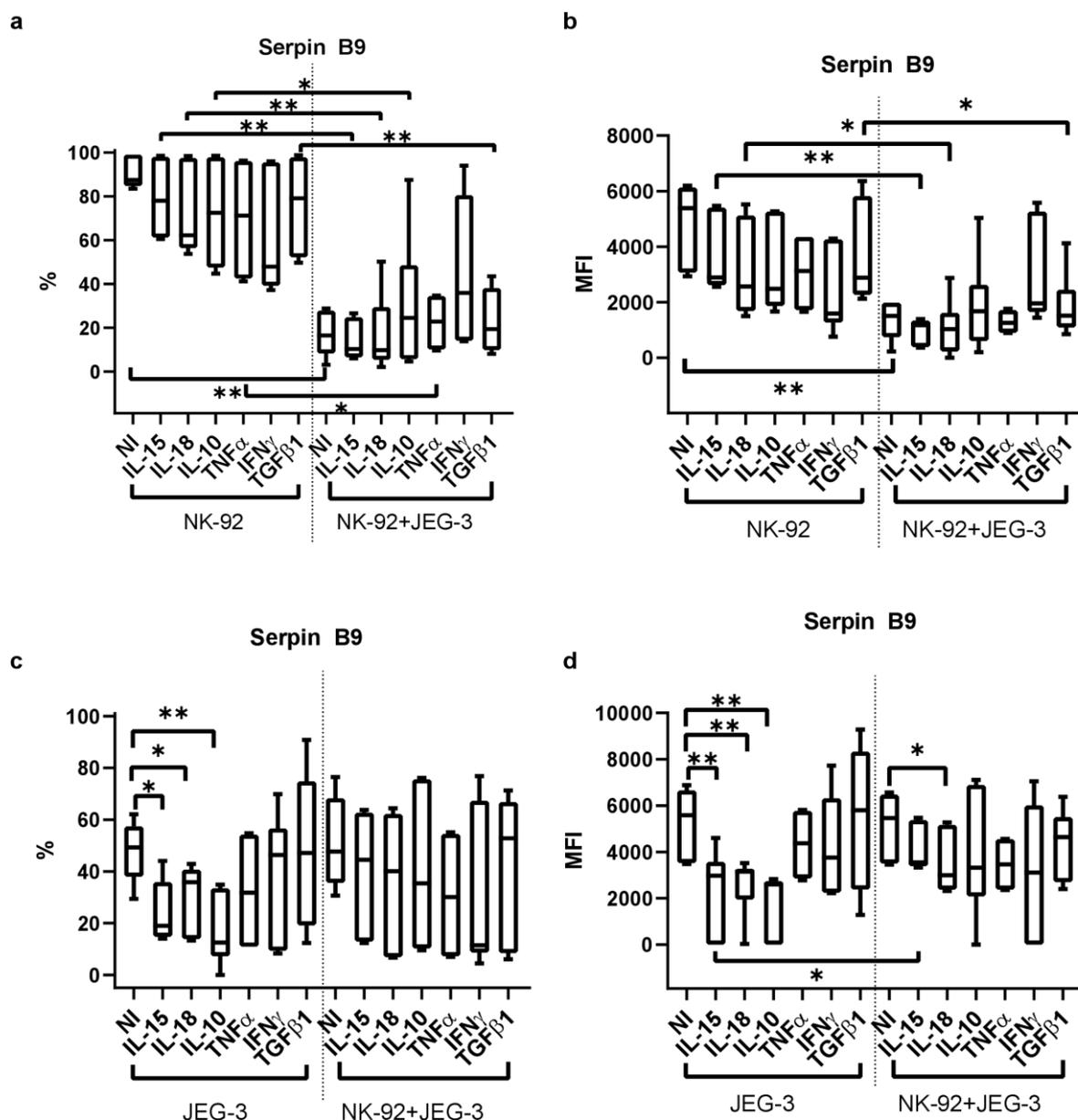


Fig. 7. Expression of serpin B9 by NK-92 (a, b) and JEG-3 (c,d) cells in monoculture and in coculture with in the presence of cytokines for 96 hours: relative number of cells expressing serpin B9 (a, c); intensity of expression of serpin B9 (b, d). NI – NK-92 or JEG-3 cells without inductors. Significance of differences: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

We posited that the co-cultivation of NK and trophoblast cells for 24 hours may not be sufficient to demonstrate their mutual influence on the level of cytotoxic proteins and surface receptors [42]. In previous research, we have observed that long-term interaction between NK cells and trophoblast cells leads to a change in NK cell phenotype and an increase in CD56 expression [42]. The cytotoxic function of NK cells against trophoblast cells

also differed after the preincubation of cells with cytokines for 24 and 96 hours [42]. Incubation for 24 hours was not enough for the mutual regulation of cells. We limited the evaluation of the level of expression of certain receptors and proteins associated with cytotoxicity. We focused on the assessment of the TGF $\beta$  effect under 24-hour co-culture conditions because TGF $\beta$  is one of the key cytokines in the uteroplacental contact zone

[112] and is capable of altering the functional activity of both trophoblast cells [38, 113] and NK cells [8, 43]. We conducted an extended assessment of the effect of cytokines on the expression of the receptors and proteins associated with cytotoxicity using the cells in the monoculture and co-culture for 96 hours. According to our data, it was possible to detect the long-term effect of cells on each other at this point [42, 114-117].

In this study, we established the content of GrA, GrB, and perforin in NK-92 cells. This concurred with the data on the content of these proteins in NK cells (Table 1). We did not observe GrA, GrB, or perforin in the trophoblast cells of the JEG-3 cell line without preculturing with NK-92 cells.

The production of GrA, GrB, and perforin by NK cells is one method to realize cytotoxicity against target cells. A decrease in the content of GrA and GrB in NK cells leads to a decline in the cytotoxicity of NK cells and an increase in tumor growth [89]. Perforin is also involved in the realization of the cytotoxic properties of NK cells; this protein is necessary for the formation of pores in the membranes of the target cells that are required for Gr transport 10.1080/20013078.2019.1588538. Approximately 40% of patients suffering from malignant tumors of the blood and circulatory system have a perforin deficiency [118].

Decidual NK cells are in close contact with cells of fetal origin (including trophoblast cells). They also contain cytotoxic proteins. Despite this, dNK cells have reduced cytotoxicity compared with peripheral NK cells [17]. We noted that after co-cultivation with NK cells, perforin and GrB were observed inside JEG-3 cells within 24 hours and the amount of GrB, but not perforin, decreased in the NK-92 cells. The transfer of these proteins from NK cells to trophoblast cells was not accompanied by a decrease in cell viability. This result agreed with data previously obtained using a Western blot analysis [119].

We discovered that the intensity of the GrA expression by the NK-92 cells was ten times lower than that of GrB. There was no transfer of GrA from the NK-92 cells to the trophoblast cells within 24 hours. The

appearance of GrA in the trophoblast cells was accompanied by a simultaneous decrease in its expression by NK-92 cells only after 96 hours of co-cultivation. The data obtained indicated a predominantly early (24 hours) transport of GrB. In the process of serial killing, NK cells lose most of their perforin and GrB [16]. We did not notice a significant decrease in the level of perforin in the NK-92 cells in the co-culture with trophoblast cells after 24 hours, but we did observe a decrease after 96 hours. This indicates the active synthesis of perforin by NK cells to maintain cytotoxic capabilities on the first day of contact with trophoblasts, accompanied by a reduction in the activity of perforin synthesis after long-term co-cultivation.

The activity of granzymes is blocked by protease inhibitors or serpins. For example, serpin B9 blocks GrB [95]. It has been demonstrated that a high content of serpin B9 in CD8+ T lymphocytes correlates with the increased cytotoxicity of these cells [120]. This is attributed to the fact that cells expressing serpin B9 specifically resist GrB-mediated death whilst remaining sensitive to other inducers of apoptosis [94]. Serpin B9 has been observed to prevent NK cell death due to autotoxicity during viral infections; an increase in the GrB-mediated apoptosis of NK cells was observed in mice knocked out by serpin B9 [94].

We discovered the presence of serpin B9 in the NK-92 cells. This concurred with the data in the literature (Table 1). We also observed that the trophoblast cells of the JEG-3 line spontaneously expressed serpin B9. According to literature data, we did not observe any expression of serpin B9 by the trophoblast cells, including the JEG-3 cells. Despite the transfer of granzymes to the trophoblast cells, there was no decrease in the viability of the trophoblast cells in our model. This supports the existence of a strategy protecting the trophoblast from the excessive cytotoxic effects of NK cells, including the activity of serpin B9. It has previously been established that trophoblasts can use the mechanism of the limited activation of caspase-8 and caspase-3 to initiate syncytium

formation [121]. The assumption that trophoblast cells apply a restriction to granzyme activity using serpin B9 to initiate their own syncytialization requires further experimental confirmation. Considering the predominantly early (24 hours) transport of granules containing GrB and perforin to the trophoblasts and the later (96 hours) transport of granules containing GrA, it is plausible that there is a different degree of participation of these proteins in the activation of caspases in trophoblast cells. The expression of serpin B9 by trophoblast cells indicates the presence of a programmed resistance of these cells to the cytotoxic action of NK cells and cytotoxic T-lymphocytes. This may trigger the mechanisms of the induction of peripheral tolerance in the maternal-fetal interface. We observed that under co-culture conditions, the content of serpin B9 in the NK-92 cells decreased; it did not change in the trophoblast cells. This effect was detected after incubation for both 24 and 96 hours. None of the cytokines used canceled the inhibitory effect of trophoblasts on the expression of serpin B9 by the NK cells. Consequently, trophoblasts may increase NK cell death caused by autotoxicity after reducing the synthesis of serpin B9 [94]. This may be the basis for limiting the excessive cytotoxicity of NK cells.

A large number of cytokines are produced in the area of uteroplacental contact. Currently, there are insufficient data on their effect on trophoblast cells and NK cells under the conditions of their long-term co-cultivation. We observed that TGF $\beta$  had no effect on the expression of GrA, GrB, perforin, and serpin B9 in trophoblast and NK cells after their 24-hour incubation in mono- and co-culture conditions. After 96 hours of co-cultivation, the content of GrA in the trophoblasts increased in the presence of TGF $\beta$ . There was no decrease in the GrA content in the NK-92 cells co-cultured with JEG-3 cells but without cytokines. Thus, TGF $\beta$  supported the production of GrA by the NK cells under the conditions of long-term interactions, contributing to its enhanced transport to the trophoblasts. TGF $\beta$  is an anti-inflammatory cytokine that promotes the

differentiation of regulatory NK cells, reducing their cytotoxicity [122] and changing the ability of trophoblast cells to invade [123]. The stimulation of increased GrA transport by TGF $\beta$  from NK cells to trophoblasts may be a mechanism for the activation of caspase-8 and caspase-3, which is limited under the action of serpin B9, to initiate syncytium formation by trophoblasts [124]. This hypothesis also requires experimental confirmation. The source of TGF $\beta$  for such a process in the uteroplacental contact zone may be the trophoblast cells themselves [38, 39] or the main cells of the microenvironment: macrophages [125, 126] and NK cells [36, 37].

We observed that in the monoculture of the NK cells, cytokines TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-15, IL-18, IL-10, and TGF $\beta$ 1 did not affect the expression of GrA, GrB, perforin, or serpin B9. We observed that IL-10 reduced the content of serpin B9 in trophoblast cells.

It has been demonstrated that proinflammatory cytokines IL-15 [127], TNF $\alpha$  [28], IL-18 [48], and IFN $\gamma$  [28] stimulate the cytotoxic activity of NK cells. IL-10 can also indirectly stimulate the cytotoxicity of NK cells through the stimulation of IFN $\gamma$  production [128]. We observed that neither TNF $\alpha$  nor IFN $\gamma$  in co-culture conditions affected the expression of serpin B9 by trophoblast cells, indicating that they do not reduce the rate of protection of the trophoblasts in inflammatory conditions from the cytotoxic action of killer cells. TNF $\alpha$  canceled the inhibitory effect of trophoblasts on the expression by NK cells of proteins GrA and GrB; IL-15 had the same effect on the expression of GrA by NK cells. With long-term co-cultivation (96 hours), IL-15 increased the content of GrA in the trophoblasts; IL-10 and IFN $\gamma$  increased the content of GrB in the trophoblast cells. Under the conditions of trophoblast monocultivation in the presence of IL-15 and IL-10, the serpin B9 expression decreased; under the conditions of co-culturing, the NK cells canceled the inhibitory effect of cytokines on the serpin B9 expression by the trophoblast cells. Thus, the data obtained after co-cultivation indicated the maintenance of the expression of serpin B9 by

trophoblast cells with the increased transport of granzymes from NK cells in the presence of most of the pro- and anti-inflammatory cytokines used. This could help trophoblasts to maintain resistance to the cytotoxic action of killer cells under the conditions of an inflammatory process.

One of the mechanisms that trophoblast cells use to avoid the cytotoxic effect of killer cells is their expression of molecules of the nonclassical main histocompatibility complex HLA-G [80]. We observed that the cells of the JEG-3 line expressed HLA-G; this coincided with the literature data [129]. The binding of HLA-G on the trophoblast surface by the NK cell receptor KIR2DL4 [130] suppresses the cytotoxic activity of killer cells [130]. We observed that under short-term (24 hour) co-culture conditions with NK cells, the expression of HLA-G by the JEG-3 cells did not change. Of all the used cytokines, only TGF $\beta$  and TNF $\alpha$  affected the expression of HLA-G by trophoblast cells. TGF $\beta$  did not affect the expression of HLA-G by JEG-3 cells under monocultivation or co-cultivation for 24 hours. TGF $\beta$  increased its expression by trophoblast cells in the monoculture but not in the co-culture after 96 hours. These results confirmed the participation of TGF $\beta$  in the creation of a microenvironment that protects fetal cells. The obtained results also demonstrated the ability of natural killer cells to cancel the TGF $\beta$  effect of the stimulation of the HLA-G expression by trophoblasts under the conditions of prolonged co-cultivation. The expression of HLA-G by the trophoblast cells increased in the presence of TNF $\alpha$  after long-term cultivation (96 hours) in co-culture conditions. This suggests the existence of protective mechanisms of the trophoblast cells in conditions of inflammation, which are necessary to avoid an immune response of the maternal organism.

The interaction between NK-92 cells and JEG-3 cells was mainly accompanied by the early (24 hours) transport of GrB and perforin to trophoblast cells and the later (96 hours) transport of GrA to trophoblast cells. Only the expression of GrB decreased in the NK cells after 24 hours of co-cultivation; the

expressions of perforin and GrA only decreased after 96 hours. The transfer of perforin and granzymes from the NK cells to the trophoblast cells was not accompanied by a decrease in their viability. This may have been due to the spontaneous expression of serpin B9 by the trophoblast cells of the JEG-3 line that we established. Trophoblasts reduced the expression of serpin B9 by the NK cells, indicating that they could increase the probability of NK cell death due to autotoxicity and trigger the restriction of the excessive cytotoxicity of natural killers as well as peripheral tolerance in the mother–fetus system. Trophoblasts retained a serpin B9 expression under the conditions of granzyme transport from the NK cells in the presence of most of the pro- and anti-inflammatory cytokines used. Under co-culture conditions, the NK cells canceled the inhibitory effect of IL-15 and IL-18 cytokines on the level of serpin B9 in the trophoblast cells. This may have contributed to the resistance of the trophoblasts to the cytotoxic action of the NK cells during the inflammatory process. Under the conditions of a long-term interaction, TGF $\beta$  supported the production of GrA by NK cells, contributing to its enhanced transport to the trophoblasts. In the presence of TGF $\beta$ , the NK cells also canceled the stimulating effect of these cytokines on the expression of HLA-G by trophoblasts, which increased the control of the NK cells over the trophoblast invasion. TNF $\alpha$  stimulated the expression of HLA-G by the trophoblast cells under the conditions of a long-term co-cultivation with NK cells, increasing its protective properties against excessive NK cell activity.

**Conclusion.** In summary, the interaction between NK and trophoblast cells is a dialogue in which the trophoblast receives cytotoxic proteins from NK cells without reducing its own viability and uses the effects of TGF $\beta$  to increase surveillance of NK cells. NK cells reduce the effect of the pro-inflammatory cytokines IL-15 and IL-18 and increase the expression of serpin B9 by trophoblasts. This leads to the inhibition of the activity of granzymes transported to trophoblasts.

## Financial support

*This study was funded by the project "Development of diagnostic criteria for predicting and overcoming reproductive losses", head O.N. Bepalova. State registration number 122041500061-8.*

## Conflict of interests

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

## References

1. Vitale M, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. An Historical Overview: The Discovery of How NK Cells Can Kill Enemies, Recruit Defense Troops, and More. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1415. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01415>
2. Liu S, Diao L, Huang C, et al. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2017;124:44-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.045>
3. Petroff MG, Nguyen SL, Ahn SH. Fetal-placental antigens and the maternal immune system: Reproductive immunology comes of age. *Immunological Reviews*. 2022;308(1):25-39. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.13090>
4. Zhuang B, Shang J, Yao Y. HLA-G: An Important Mediator of Maternal-Fetal Immune-Tolerance. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:744324. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744324>
5. Wang F, Qualls AE, Marques-Fernandez L, et al. Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 2021;18(9):2101-2113. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00739-z>
6. Hsu P, Nanan RKH. Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:125. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00125>
7. Xu X, Zhou Y, Fu B, et al. Uterine NK cell functions at maternal-fetal interface. *Biology of Reproduction*. 2022;107(1):327-338. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac094>
8. Regis S, Dondero A, Caliendo F, et al. NK Cell Function Regulation by TGF-beta-Induced Epigenetic Mechanisms. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:311. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00311>
9. Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling. *Cancers*. 2020;12(4):952. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12040952>
10. Abel AM, Yang C, Thakar MS, et al. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1869. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
11. Tyshchuk EV, Mikhailova VA, Selkov SA, et al. Natural killer cells: origin, phenotype, function. *Medical Immunology (Russia)*. 2021;23(6):1207-1228. Russian. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-NKC-2330>
12. Gaynor LM, Colucci F. Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:467. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467>
13. Le Bouteiller P. Human decidual NK cells: unique and tightly regulated effector functions in healthy and pathogen-infected pregnancies. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:404. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00404>
14. de Mendonca Vieira R, Meagher A, Crespo AC, et al. Human Term Pregnancy Decidual NK Cells Generate Distinct Cytotoxic Responses. *Journal of Immunology*. 2020;204(12):3149-3159. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901435>
15. Lédée-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, et al. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertility and Sterility*. 2005;83(3):598-605. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.021>
16. Prager I, Liesche C, van Ooijen H, et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;216(9):2113-2127. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20181454>
17. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(43):15563-15568. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.050783510>
18. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine natural killer cells: To protect and to

- nurture. *Birth Defects Research*. 2018;110(20):1531-1538. DOI: <https://doi.org/10.1002/bdr2.1419>
19. Mahajan D, Sharma NR, Kancharla S, et al. Role of Natural Killer Cells during Pregnancy and Related Complications. *Biomolecules*. 2022;12(1):68. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12010068>
20. Male V, Trundley A, Gardner L, et al. Natural killer cells in human pregnancy. *Natural Killer Cell Protocols: Cellular and Molecular Methods*. 2010;612:447-463. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6_30)
21. Neykova K, Tosto V, Giardina I, et al. Endometrial receptivity and pregnancy outcome. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2020;35(13):2591-2605. DOI: <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1787977>
22. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Human Reproduction Update*. 2012;18(4):458-471. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dms015>
23. James JL, Boss AL, Sun C, et al. From stem cells to spiral arteries: A journey through early placental development. *Placenta*. 2022;125:68-77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.11.004>
24. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, et al. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *American Journal of Pathology*. 2009;174(5):1959-1971. DOI: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080995>
25. Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, et al. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Molecular Human Reproduction*. 2011;17(10):637-652. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gar033>
26. Fu Q, Tao Y, Piao H, et al. Trophoblasts and decidual stromal cells regulate decidual NK cell functions via interaction between collagen and LAIR-1. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2014;71(4):368-378. DOI: <https://doi.org/10.1111/aji.12211>
27. Lu H, Jin LP, Huang HL, et al. Trophoblast-derived CXCL12 promotes CD56[bright] CD82[-] CD29[+] NK cell enrichment in the decidua. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2020;83(2):aji.13203. DOI: <https://doi.org/10.1111/aji.13203>
28. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, et al. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91(2):299-309. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0611308>
29. Vitale M, Chiesa MD, Carlomagno S, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*. 2005;106(2):566-571. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4035>
30. Wang L, Jiang S, Xiao L, et al. Inhibition of granzyme B activity blocks inflammation induced by lipopolysaccharide through regulation of endoplasmic reticulum stress signaling in NK92 cells. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(1):580-586. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8995>
31. Tabarsa M, Jafari A, You S, et al. Immunostimulatory effects of a polysaccharide from *Pimpinella anisum* seeds on RAW264.7 and NK-92 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;213:546-554. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.174>
32. Gómez-Lomelí P, Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, et al. Increase of IFN- $\gamma$  and TNF- $\gamma$  production in CD107a + NK-92 cells co-cultured with cervical cancer cell lines pre-treated with the HO-1 inhibitor. *Cancer Cell International*. 2014;14(1):100. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-014-0100-1>
33. Braunschweig A, Poehlmann TG, Busch S, et al. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 [STAT3] and Suppressor of Cytokine Signaling [SOCS3] Balance Controls Cytotoxicity and IL-10 Expression in Decidual-Like Natural Killer Cell Line NK-92. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;66(4):329-335. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.00989.x>
34. Li W, Li H, Bocking AD, et al. Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to I $\kappa$ B $\kappa$ -NF $\kappa$ B and MAPK1/3 pathway. *Biology of Reproduction*. 2010;83(3):481-487. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082578>
35. Lash GE, Otun HA, Innes BA, et al. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB Journal*. 2006;20(14):2512-2518. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.06-6616com>

36. Jiang Y, Yang M, Sun X, et al. IL-10[+] NK and TGF- $\beta$ [+] NK cells play negative regulatory roles in HIV infection. *BMC Infectious Diseases*. 2018;18(1):80. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2991-2>
37. Lin F, Yang C, Feng T, et al. The Maternal–Fetal Interface in Small-for-Gestational-Age Pregnancies Is Associated With a Reduced Quantity of Human Decidual NK Cells With Weaker Functional Ability. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:633. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00633>
38. Li Y, Yan J, Chang HM, et al. Roles of TGF- $\beta$  Superfamily Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2021;32(3):170-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.12.005>
39. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, et al. Localization of transforming growth factor- $\beta$  at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biology of Reproduction*. 1992;46(4):561-572. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.4.561>
40. Li Y, Xu Q, Zhang Z, et al. The impact of TGF- $\beta$ 1 on the mRNA expression of T $\beta$ R I, T $\beta$ R II, Smad4 and the invasiveness of the JEG-3 placental choriocarcinoma cell line. *Oncology Letters*. 2012;4(6):1344-1348. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2012.906>
41. Xu G, Chakraborty C, Lala PK. Expression of TGF- $\beta$  Signaling Genes in the Normal, Premalignant, and Malignant Human Trophoblast: Loss of Smad3 in Choriocarcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;287(1):47-55. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5533>
42. Mikhailova V, Grebenkina P, Khokhlova E, et al. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Context of NK Cell-Trophoblast Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(4):2387. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23042387>
43. Viel S, Marcais A, Guimaraes FS, et al. TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Science Signaling*. 2016;9(415):ra19. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1884>
44. Park SY, Yun S, Ryu BJ, et al. Trophoblasts regulate natural killer cells via control of interleukin-15 receptor signaling. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017;78(2):e12628. DOI: <https://doi.org/10.1111/aji.12628>
45. Li J, Li Y, Zhou X, et al. Upregulation of IL-15 in the placenta alters trophoblasts behavior contributing to gestational diabetes mellitus. *Cell and Bioscience*. 2021;11(1):33. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00533-4>
46. Mingari MC, Vitale C, Cantoni C, et al. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *European Journal of Immunology*. 1997;27(6):1374-1380. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.1830270612>
47. Demirci G, Li XC. IL-2 and IL-15 exhibit opposing effects on Fas mediated apoptosis. *Cellular and Molecular Immunology*. 2004;1(2):123-128.
48. Tomura M, Zhou X-Y, Maruo S, et al. A Critical Role for IL-18 in the Proliferation and Activation of NK1. *Journal of Immunology*. 1998;160(10):4738-4746.
49. Clark SE, Burrack KS, Jameson SC, et al. NK Cell IL-10 Production Requires IL-15 and IL-10 Driven STAT3 Activation. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:2087. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02087>
50. Roth I, Corry DB, Locksley RM, et al. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(2):539-548. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.539>
51. Naruse K, Innes BA, Bulmer JN, et al. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2010;86(2):148-150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.04.004>
52. Dong Q, Fan R, Zhao S, et al. Overexpression of SOCS-3 gene promotes IL-10 production by JEG-3 trophoblast cells. *Placenta*. 2009;30(1):11-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.10.008>
53. Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- $\gamma$  when combined with IL-18. *European Journal of Immunology*. 1999;29(9):2658-2665. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199909\)29:09<2658::AID-IMMU2658>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2658::AID-IMMU2658>3.0.CO;2-G)
54. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes.

International Immunology. 1999;11(5):803-811. DOI: <https://doi.org/10.1093/intimm/11.5.803>

55. Roth I, Fisher SJ. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Developmental Biology*. 1999;205(1):194-204. DOI: <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9122>

56. Li SJ, Liu W, Wang JL, et al. The role of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014;18(6):905-909.

57. Zeng L, O'Connor C, Zhang J, et al. IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines. *Cytokine*. 2010;49(3):294-302. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.015>

58. Fujiwara H, Higuchi T, Sato Y, et al. Regulation of human extravillous trophoblast function by membrane-bound peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2005;1751(1):26-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.04.007>

59. Roda JM, Parihar R, Magro C, et al. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Research*. 2006;66(1):517-526. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2429>

60. Temples MN, Adjei IM, Nimocks PM, et al. Engineered Three-Dimensional Tumor Models to Study Natural Killer Cell Suppression. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2020;6(7):4179-4199. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.0c00259>

61. Korenevsky AV, Shcherbitskaia AD, Berezkina ME, et al. MALDI-TOF mass spectrometric protein profiling of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line. *Medical Immunology [Russia]*. 2020;22(4):633-646. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-mms-1976>

62. Ishii M, Hayakawa S, Suzuki M-K, et al. Expression of Functional Chemokine Receptors of Human Placental Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000;44(6):365-373. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2000.440608.x>

63. Weiss ID, Shoham H, Wald O, et al. Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions. *Cytokine*. 2011;54(3):249-257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.01.011>

64. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, et al. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology*. 1995;155(8):3877-3888. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.155.8.3877>

65. Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *European Journal of Immunology*. 1996;26(2):315-319. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.1830260207>

66. Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*. 2017;83:22-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.02.005>

67. Hawke LG, Whitford MKM, Ormiston ML. The Production of Pro-angiogenic VEGF-A Isoforms by Hypoxic Human NK Cells Is Independent of Their TGF- $\beta$ -Mediated Conversion to an ILC1-Like Phenotype. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1903. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01903>

68. Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 [FLT-1]. *In Vivo*. 2002;16(6):439-445.

69. Choi SJ, Park JY, Lee YK, et al. Effects of Cytokines on VEGF Expression and Secretion by Human First Trimester Trophoblast Cell Line. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2002;48(2):70-76. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.01071.x>

70. Shore VH, Wang TH, Wang CL, et al. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*. 1997;18(8):657-665. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(97\)90007-2](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(97)90007-2)

71. Ichikawa G, Yamamoto T, Chishima F, et al. Effects of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibody on PlGF, VEGF and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2011;37(8):1076-1083. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2010.01490.x>

72. Aldo PB, Krikun G, Visintin I, et al. A novel three-dimensional in vitro system to study trophoblast-endothelium cell interactions. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2007;58(2):98-110. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00493.x>

73. Scarpellini F, Klinger FG, Rossi G, et al. Immunohistochemical Study on the Expression of G-CSF, G-CSFR, VEGF, VEGFR-1, Foxp3 in First Trimester Trophoblast of Recurrent

Pregnancy Loss in Pregnancies Treated with G-CSF and Controls. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;21(1):285. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21010285>

74. Béziat V, Duffy D, Quoc SN, et al. CD56brightCD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *Journal of Immunology*. 2011;186(12):6753-6761. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100330>

75. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology*. 2001;31(10):3121-3126. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10<3121::aid-immu3121>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::aid-immu3121>3.0.co;2-4)

76. Gunesch JT, Dixon AL, Ebrahim TAM, et al. CD56 regulates human NK cell cytotoxicity through Pyk2. *eLife*. 2020;9:e57346. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.57346>

77. Wex T, Wex H, Hartig R, et al. Functional involvement of cathepsin W in the cytotoxic activity of NK-92 cells. *FEBS Letters*. 2003;552(2-3):115-119. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00895-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00895-0)

78. Soroka V, Kolkova K, Kastrup JS, et al. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure*. 2003;11(10):1291-1301. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.006>

79. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine*. 2006;12(9):1065-1074. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1452>

80. Kovats S, Main EK, Librach C, et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 1990;248(4952):220-223. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.23266>

81. Hackmon R, Pinnaduwege L, Zhang J, et al. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017;77(6):e12643. DOI: <https://doi.org/10.1111/aji.12643>

82. Liu X, Gu W, Li X. HLA-G regulates the invasive properties of JEG-3 choriocarcinoma cells by controlling STAT3 activation. *Placenta*. 2013;34(11):1044-1052. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.07.070>

83. Yie SM, Li LH, Li GM, et al. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Human Reproduction*. 2006;21(1):46-51. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/dei305>

84. Ding DC, Chou HL, Chang YH, et al. Characterization of HLA-G and Related Immunosuppressive Effects in Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells. *Cell Transplantation*. 2016;25(2):217-228. DOI: <https://doi.org/10.3727/096368915X688182>

85. Smyth MJ, Thia KYT, Cretney E, et al. Perforin Is a Major Contributor to NK Cell Control of Tumor Metastasis. *Journal of Immunology*. 1999;162(11):6658-6662. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.11.6658>

86. Kodama T, Takeda K, Shimozato O, et al. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *European Journal of Immunology*. 1999;29(4):1390-1396. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199904\)29:04<1390::AID-IMMU1390>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1390::AID-IMMU1390>3.0.CO;2-C)

87. Lu CC, Wu TS, Hsu YJ, et al. NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014;96(6):1119-1129. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0713-363RR>

88. Lu C-C, Chen J-K. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 2010;223(2):343-351. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.22043>

89. Pardo J, Balkow S, Anel A, et al. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *European Journal of Immunology*. 2002;32(10):2881-2887. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-4141\[2002010\]32:10<2881::AID-IMMU2881>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-4141[2002010]32:10<2881::AID-IMMU2881>3.0.CO;2-K)

90. Bratke K, Kuepper M, Bade B, et al. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. *European Journal of Immunology*. 2005;35(9):2608-2616. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200526122>

91. Chen R, Qin S, Zhu H, et al. Dynamic monitoring of circulating CD8+ T and NK cell function in patients with septic shock. *Immunology*

- Letters. 2022;243:61-68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2022.02.004>
92. Kolt S, Janiszewski T, Kaiserman D, et al. Detection of Active Granzyme A in NK92 Cells with Fluorescent Activity-Based Probe. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;63(6):3359-3369. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02042>
93. Prakash MD, Bird CH, Bird PI. Active and zymogen forms of granzyme B are constitutively released from cytotoxic lymphocytes in the absence of target cell engagement. *Immunology and Cell Biology*. 2008;87(3):249-254. DOI: <https://doi.org/10.1038/icb.2008.98>
94. Mangan MS, Melo-Silva CR, Luu J, et al. A pro-survival role for the intracellular granzyme B inhibitor Serpinb9 in natural killer cells during poxvirus infection. *Immunology and Cell Biology*. 2017;95(10):884-894. DOI: <https://doi.org/10.1038/icb.2017.59>
95. Bird CH, Christensen ME, Mangan MS, et al. The granzyme B-Serpinb9 axis controls the fate of lymphocytes after lysosomal stress. *Cell Death and Differentiation*. 2014;21(6):876-887. DOI: <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.7>
96. Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(Suppl 1):26-34. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x>
97. Urlaub D, Hofer K, Muller ML, et al. LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *Journal of Immunology*. 2017;198(5):1944-1951. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601004>
98. Zamai L, Galeotti L, Del Zotto G, et al. Identification of a NCR+/NKG2D+/LFA-1[low]/CD94[-] immature human NK cell subset. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009;75(11):893-901. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20789>
99. Montaldo E, Vitale C, Cottalasso F, et al. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood*. 2012;119(17):3987-3996. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379693>
100. Yamaguchi T, Kitaya K, Daikoku N, et al. Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16[-] natural killer cells into human endometrium. *Biology of Reproduction*. 2006;74(1):35-40. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045971>
101. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013;83A(8):702-713. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22302>
102. Barber DF, Faure M, Long EO. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *Journal of Immunology*. 2004;173(6):3653-3659. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3653>
103. Mikhailova V, Khokhlova E, Grebenkina P, et al. NK-92 cells change their phenotype and function when cocultured with IL-15, IL-18 and trophoblast cells. *Immunobiology*. 2021;226(5):152125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152125>
104. Tan H-X, Yang S-L, Li M-Q, et al. Autophagy suppression of trophoblast cells induces pregnancy loss by activating decidual NK cytotoxicity and inhibiting trophoblast invasion. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(1):73. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00579-w>
105. Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL] and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2004;104(8):2418-2424. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1294>
106. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, et al. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*. 2004;10(1):55-63. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gah006>
107. Balkundi DR, Ziegler JA, Watchko JF, et al. Regulation of FasL/Fas in human trophoblasts: possible implications for chorioamnionitis. *Biology of Reproduction*. 2003;69(2):718-724. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013102>
108. Bai X, Williams JL, Greenwood SL, et al. A placental protective role for trophoblast-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL]. *Placenta*. 2009;30(10):855-860. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.07.006>
109. Lash GE, Bulmer JN, Robson SC, et al. editors. Inhibition of first trimester human extravillous trophoblast invasion by TNF-alpha and IFN-gamma. In: 10th European Placenta

Group Meeting: Comparative, Experimental and Clinical Aspects of Placentation; 2003.

110. King A, Birkby C, Loke YW. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cellular Immunology*. 1989;118(2):337-344. DOI: [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90382-1](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90382-1)

111. Sun J, Yang M, Ban Y, et al. Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147186. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147186>

112. Chuva de Sousa Lopes SM, Alexdottir MS, Valdimarsdottir G. The TGFbeta Family in Human Placental Development at the Fetal-Maternal Interface. *Biomolecules*. 2020;10(3):453. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10030453>

113. Yi Y, Cheng JC, Klausen C, et al. TGF-beta1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2. *Placenta*. 2018;68:44-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.06.313>

114. Uppendahl LD, Felices M, Bendzick L, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells have enhanced function, proliferation, and in vivo expansion against ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*. 2019;153(1):149-157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.01.006>

115. Biswas BK, Guru SA, Sumi MP, et al. Natural Killer Cells Expanded and Preactivated Exhibit Enhanced Antitumor Activity against Different Tumor Cells in Vitro. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2020;21(6):1595-1605. DOI: <https://doi.org/10.31557/apjcp.2020.21.6.1595>

116. Terren I, Mikelez I, Odriozola I, et al. Implication of Interleukin-12/15/18 and Ruxolitinib in the Phenotype, Proliferation, and Polyfunctionality of Human Cytokine-Preactivated Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:737. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00737>

117. Ewen EM, Pahl JHW, Miller M, et al. KIR downregulation by IL-12/15/18 unleashes human NK cells from KIR/HLA-I inhibition and enhances killing of tumor cells. *European Journal of Immunology*. 2018;48(2):355-365. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201747128>

118. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(6):388-400. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3839>

119. Milyutina YP, Mikhailova VA, Pyatygina KM, et al. Role of Caspases in the Cytotoxicity of NK-92 Cells in Various Models of Coculturing with Trophoblasts. *Biochemistry [Mosc]*. 2019;84(10):1186-1196. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297919100079>

120. Hirst CE, Buzza MS, Bird CH, et al. The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *Journal of Immunology*. 2003;170(2):805-815. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.805>

121. Gauster M, Huppertz B. The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta*. 2010;31(2):82-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.007>

122. Dimeloe S, Gubser P, Loeliger J, et al. Tumor-derived TGF-beta inhibits mitochondrial respiration to suppress IFN-gamma production by human CD4[+] T cells. *Science Signaling*. 2019;12(599):3334. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav3334>

123. Huang Z, Li S, Fan W, et al. Transforming growth factor beta1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via TGF-beta/Smad3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):33560-33570. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16826>

124. Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood*. 2003;102(5):1569-1577. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0517>

125. Tu B, Li J, Sun Z, et al. Macrophage-Derived TGF-beta and VEGF Promote the Progression of Trauma-Induced Heterotopic Ossification. *Inflammation*. 2023;46(1):202-216. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01723-z>

126. Mercnik MH, Schlieffsteiner C, Fluhr H, et al. Placental macrophages present distinct polarization pattern and effector functions depending on clinical onset of preeclampsia. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1095879. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1095879>

127. Wagner J, Pfannenstiel V, Waldmann A, et al. A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin [IL]-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:676. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00676>

128. Wang Z, Guan D, Huo J, et al. IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:619195. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.619195>

129. Persson G, Bork JBS, Isgaard C, et al. Cytokine stimulation of the choriocarcinoma cell line JEG-3 leads to alterations in the HLA-G expression profile. *Cellular Immunology*. 2020;352:104110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104110>

130. Bai Y, Liang J, Liu W, et al. Possible roles of HLA-G regulating immune cells in pregnancy and endometrial diseases via KIR2DL4. *Journal of Reproductive Immunology*. 2020;142:103176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103176>

Received 30 May 2024

Revised 29 June 2024

Accepted 24 July 2024

#### Information about the authors

**Polina V. Grebenkina**, Junior Researcher at the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [grebenkinap@gmail.com](mailto:grebenkinap@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5229-9732>.

**Valentina A. Mikhailova**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [mva\\_spb@mail.ru](mailto:mva_spb@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1328-8157>.

**Elisaveta V. Tyschuk**, Junior Researcher at the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail:

[tyshhuk.elizaveta@gmail.com](mailto:tyshhuk.elizaveta@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6051-9048>.

**Oksana B. Marko**, Junior Researcher at the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [okmarko@ya.ru](mailto:okmarko@ya.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6078-1791>.

**Varvara A. Yukhina**, Student at the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [juchinawarja@gmail.com](mailto:juchinawarja@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6510-1916>.

**Anastasia M. Gulina**, Student at the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [anastautomne@gmail.com](mailto:anastautomne@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9102-2047>.

**Olesya N. Bepalova**, Doct. Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Work, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [shiggerra@mail.ru](mailto:shiggerra@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6542-5953>.

**Sergey A. Selkov**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [selkovsa@mail.ru](mailto:selkovsa@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1560-7529>.

**Dmitriy I. Sokolov**, Doct. Sci. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, E-mail: [falcojugger@yandex.ru](mailto:falcojugger@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5749-2531>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-9

УДК 614.8:352.14(871.24+315.64)

# Особенности тестирования базовой функциональной активности пациентов с саркопеническим ожирением и зрительным дефицитом

Н.М. Агарков<sup>1,2</sup> , В.Н. Агаркова<sup>1</sup> , А.Е. Копылов<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Юго-Западный государственный университет», ул. 50 лет Октября, д. 94, г. Курск, 305040, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», Рассказовское шоссе, д. 1, г. Тамбов, 392000, Российская Федерация  
*Автор для переписки: Н.М. Агарков (vitalaxen@mail.ru)*

## Резюме

**Актуальность:** Различные функциональные дефициты, в том числе зрительный дефицит, а также саркопеническое ожирение, вызывают снижение деятельности в повседневной жизни таких пациентов, которые представляют сложность для идентификации существующими шкалами, в том числе для шкалы Бартел, не отражающей произошедших нарушений в органе зрения. **Цель исследования:** Апробация в клинической геронтологической практике разработанного и валидированного нами теста оценки базовой функциональной активности пациентов с саркопеническим ожирением и нарушением зрения вследствие различной офтальмопатологии. **Материалы и методы:** Обследовано в клинических условиях 125 пациентов пожилого возраста с саркопеническим ожирением и катарактой, 138 пациентов такого же возраста с саркопеническим ожирением и первичной глаукомой. Изучение саркопенического ожирения выполнено по шкале European working group on sarcopenia in older people и методом кистевой динамометрии. Изучение деятельности в повседневной жизни в указанных группах пациентов проведено по разработанному и валидированному нами ранее тесту оценки базовой функциональной активности при зрительном дефиците. **Результаты:** Наибольшую зависимость от окружающих у пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой вызывает проведение нитки в иглу ( $1,84 \pm 0,03$  балла) со статистически значимым различием как по отношению к пациентам с саркопеническим ожирением и глаукомой ( $1,52 \pm 0,02$  балла) ( $p < 0,01$ ), так и к другим видам деятельности ( $p < 0,01$ ). Выраженные ограничения деятельности в повседневной жизни пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой вызывает стрижка ногтей ( $1,75 \pm 0,03$  балла) против  $1,43 \pm 0,04$  балла при глаукоме ( $p < 0,01$ ). Однако написание текста у пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой вызывает большую зависимость ( $1,68 \pm 0,04$  балла) и занимает третье ранговое место среди всех составляющих базовой функциональной активности, тогда как у пациентов с саркопеническим ожирением и глаукомой на данной позиции находится прочтение текста ( $1,38 \pm 0,03$  балла) со статистически значимым различием. **Заключение:** Использование

созданного нами теста оценки деятельности в повседневной жизни пациентов с саркопеническим ожирением и нарушением зрения позволило установить ведущие ограничения и их особенности у пациентов со зрительным дефицитом различного генеза.

**Ключевые слова:** повседневная жизнь; саркопеническое ожирение; базовая функциональная активность; зрительный дефицит; пожилые; катаракта; глаукома

**Для цитирования:** Агарков НМ, Агаркова ВН, Копылов АЕ. Особенности тестирования базовой функциональной активности пациентов с саркопеническим ожирением и зрительным дефицитом. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):164-177. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-9

# Features of testing the basic functional activity of patients with sarcopenic obesity and visual impairment

Nikolay M. Agarkov<sup>1,2</sup> , Vera N. Agarkova<sup>1</sup> , Andrey E. Kopylov<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Southwest State University,

94 50 Let Oktyabrya St., Kursk, 305040, Russia

<sup>2</sup> Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution,

1 Rasskazovskoe Hgw., Tambov, 392000, Russia

Corresponding author: Nikolay M. Agarkov ([vitalaxen@mail.ru](mailto:vitalaxen@mail.ru))

## Abstract

**Background:** Various functional deficits, including visual deficits, as well as sarcopenic obesity, cause a decrease in activity in the daily life of patients. These deficits are challenging to identify with existing assessment tools, including the Barthel scale, which does not fully capture the extent of visual impairment. **The aim of the study:** Approbation in clinical gerontological practice of a test developed and validated by us to assess the basic functional activity of patients with sarcopenic obesity and visual impairment due to various ophthalmopathy. **Materials and methods:** 125 elderly patients with sarcopenic obesity and cataracts, 138 patients of the same age with sarcopenic obesity and primary glaucoma were examined in clinical conditions. The study of sarcopenic obesity was conducted in accordance with the criteria established by the European Working Group on Sarcopenia in Older People and the method of carpal dynamometry. The investigation of activity in the everyday lives of these patient groups was conducted in accordance with a test that had been previously developed and validated by our research team for the assessment of basic functional activity in visual impairments. **Results:** Threading a needle causes the greatest dependence on others in patients with sarcopenic obesity and cataracts (1,84±0,03 points) with a statistically significant difference both in relation to patients with sarcopenic obesity and glaucoma (1,52±0,02 points) ( $p<0,01$ ) and to other types of activity ( $p<0,01$ ). Severe limitations of activity in the daily life of patients with sarcopenic obesity and cataracts are caused by nail clipping (1,75±0,03 points) versus 1,43±0,04 points in glaucoma ( $p<0,01$ ). However, text writing in patients with sarcopenic obesity and cataracts is highly dependent (1,68±0,04 points) and occupies the third rank among all components of basic functional activity, whereas in patients with sarcopenic obesity and glaucoma, text reading is in this position (1,38±0,03 points) with a statistically significant difference. **Conclusion:** The use of the activity assessment test created by us in the daily life of patients with sarcopenic obesity and visual

impairment allowed us to establish the leading limitations and their features in patients with visual deficits of various origins.

**Keywords:** daily life; sarcopenic obesity; basic functional activity; visual deficit; elderly; cataract; glaucoma

**For citation:** Agarkov NM, Agarkova VN, Kopylov AE. Features of testing the basic functional activity of patients with sarcopenic obesity and visual deficit. Research Results in Biomedicine. 2025;11(1):164-177. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-9

**Введение.** Зрительный дефицит, обусловленный нарушением зрения вследствие различной офтальмологической патологии – диабетической ретинопатии, глаукомы, катаракты, возрастной макулярной дегенерации – выступает распространённой причиной снижения базовой функциональной активности различных возрастных групп населения и особенно пожилых людей во всём мире и его распространённость увеличивается с возрастом [1-9]. Во всём мире распространённость нарушения зрения составляет 7,7%, из которых 64,2% приходится на население в возрасте 50 лет и старше, а у 419 миллионов пожилых зрительный дефицит вызван нескоррегированной пресбиопией [10]. Учитывая быстрое старение населения и продолжающийся рост частоты нарушения зрения ожидается увеличение людей с различной офтальмопатологией, имеющих снижение активности (деятельности) в повседневной жизни, относящейся к фундаментальным навыкам, необходимым для повседневного ухода за собой.

Наиболее часто используемым инструментом для оценки активности в повседневной жизни пациентов, в том числе с нарушением зрения и саркопеническим ожирением, является шкала Activities of Daily Living Scale (ADL) или шкала Бартел. Однако шкала Бартел для оценки базовой функциональной активности не всегда оказывается пригодной для пациентов с нарушением зрения, поскольку не учитывает специфические изменения в нарушении зрительных функций таких пациентов, связанных со снижением центральной остроты зрения и полей зрения при офтальмологических заболеваниях.

Снижение же остроты зрения без коррекции, максимальной корригированной остроты зрения, полей зрения и контрастной чувствительности у пациентов с офтальмопатологией не позволяет им самостоятельно и эффективно выполнять отдельные виды деятельности, требующие точных действий и связанные с мелкими и нечётко различающимися предметами или объектами [10]. Такие виды деятельности в повседневной жизни пациентов со зрительным дефицитом не позволяет выявить шкала базовой функциональной активности Бартел и требуются новые подходы.

Поэтому для оценки базовой функциональной активности пациентов со зрительным дефицитом и саркопеническим ожирением необходимо использовать специфические критерии, показатели, ассоциированные со зрительным дефицитом, которые в наибольшей степени влияют на базовую функциональную активность и значительно её снижают именно из-за нарушения зрительных функций в виде снижения остроты зрения, прежде всего.

**Цель исследования.** Апробация в клинической геронтологической практике разработанного и валидированного нами теста оценки базовой функциональной активности пациентов с саркопеническим ожирением и нарушением зрения вследствие различной офтальмопатологии.

**Материалы и методы исследования.** В исследовании, проведённом в Тамбовском филиале «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» приняли участие 125 пациентов пожилого возраста с саркопеническим ожирением и катарактой и 138 пациентов аналогичного возрастного

ценза, страдающих саркопеническим ожирением и первичной глаукомой.

Анализ клинико-anamnestических данных, обследованных двух групп пациентов пожилого возраста, не выявил статистически значимых различий по рассматриваемым показателям (Табл. 1). Пациенты с саркопеническим ожирением и катарактой были незначительно старше, но различие не имело статистической значимости. Среди пациентов с

саркопеническим ожирением и катарактой оказался несущественно выше удельный вес, страдающих артериальной гипертензией без достоверных различий. По количеству лиц с наличием сахарного диабета 2-го типа, ишемической болезни сердца сравниваемые группы статистически значимо не различались. Количество одинокопроживающих в обеих группах было практически одинаковым.

Таблица 1

**Клинико-anamnestические данные о пациентах с саркопеническим ожирением и катарактой, саркопеническим ожирением и глаукомой (P±SD)**

Table 1

**Clinical and anamnestic data on patients with sarcopenic obesity and cataracts, sarcopenic obesity and glaucoma (P±SD)**

Характеристики обследованных пациентов	Пациенты с саркопеническим ожирением и катарактой	Пациенты с саркопеническим ожирением и глаукомой	P
Средний возраст, лет	71,34±2,18	70,19±2,45	>0,05
Мужчины, абс.ч. (процент)	52 (41,60±1,97)	67 (48,55±2,89)	>0,05
Женщины, абс.ч. (процент)	73 (58,40±3,09)	71 (51,45±2,46)	>0,05
Статус занятости: работающие, абс.ч. (процент)	28 (22,44±1,78)	34 (24,64±2,18)	>0,05
Сахарный диабет, абс.ч. (процент)	36 (28,84±3,12)	37 (26,81±2,05)	>0,05
Артериальная гипертензия, абс.ч. (процент)	69 (55,21±2,87)	65 (47,10±3,12)	>0,05
Ишемическая болезнь сердца, абс.ч. (процент)	49 (32,20±2,64)	53 (38,41±2,37)	>0,05
Одинокое проживание, абс.ч. (процент)	11 (8,80±1,14)	15 (10,87±2,1)	>0,05

Пациенты с глаукомой имели 2 стадию развития с остротой зрения без коррекции 0,5 и ниже и снижение полей зрения до 25-32°. Пациенты с катарактой имели катаракту с остротой зрения без коррекции 0,5 и ниже и снижение полей зрения до 18-24°. Диагностика катаракты и первичной глаукомы проводилась на основе результатов комплексного клинического и аппаратного офтальмологического обследования пациентов. Выявление саркопенического ожирения осуществлялось по шкале European working group on sarcopenia in older people, дополненной кистевой динамометрией [11]. В исследование не включались пациенты с синдромом старческой астении, выраженными когнитивными нарушениями, так как это

могло исказить достоверность полученных результатов. Тестирование в указанных группах пациентов осуществлялось непосредственно авторами в период оказания пациентам амбулаторной или стационарной офтальмологической специализированной медицинской помощи по разработанному и валидированному ранее нами тесту оценку базовой функциональной активности при зрительном дефиците [12].

Предлагаемый нами тест по оценке базовой функциональной активности пациентов со зрительным дефицитом включал следующие вопросы:

1. Как Вы вставите нитку в «ушко» иглы?
2. Сложно ли Вам читать текст?

3. Сложно ли для Вам отрезать бумагу заданных размеров?
4. Сложно ли Вам подстричь ногти?
5. Сложно ли Вам различать цифры на телефоне?
6. Сложно ли Вам писать текст?
7. Сложно ли Вам посчитать деньги?
8. Сложно ли Вам различать цвет предметов (одежды)?

На каждый вопрос предлагалось три варианта ответов: легко (0 баллов); сложно сделать, но я с этим справлюсь (1 балл); не смогу сделать (2 балла).

Максимальное количество баллов, которое может набрать пациент с нарушением зрения, достигает 16 баллов. В зависимости от набранного количества баллов базовая функциональная активность классифицировалась на:

- лёгкую зависимость в посторонней помощи (0-6 баллов);
- умеренную (среднюю) зависимость в посторонней помощи (7-10 баллов);
- выраженную (полную) зависимость в посторонней помощи (11-16 баллов).

Валидность теста по коэффициенту  $\alpha$ -Кронбаха составила 0,85 против критического уровня 0,70.

При оценке достоверности использовался непараметрический критерий  $X^2$  и программа «Statistica 10.0». Статистически значимым считалось различие при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение.

Проведённое тестирование деятельности в повседневной жизни пациентов сравнимых групп выявило статистически значимые различия по многим составляющим базовой функциональной активности. При этом наиболее существенно пациенты с саркопеническим ожирением и катарактой отличались от пациентов с саркопеническим ожирением и глаукомой по такому виду деятельности как проведение нитки в иглу и имели высокие баллы, что свидетельствует о сложности и проблематичности его выполнения обследованными пациентами и особенно пациентами с саркопеническим ожирением и катарактой.

Для пациентов обеих групп со зрительным дефицитом трудно выполнить стрижку ногтей и в большей степени для пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой. По третьей ранговой позиции, отражающей наличие ограничений в деятельности в повседневной жизни, пациенты сравнимых групп различаются. Так, у пациентов с саркопеническим ожирением и глаукомой снижена автономность по прочтению текста, тогда как у пациентов с наличием саркопенического ожирения и катаракты – по написанию текста (Табл. 2).

Таблица 2

#### Деятельность в повседневной жизни пациентов с катарактой и глаукомой по данным тестирования ( $M \pm m$ , баллы)

Table 2

#### Activities of daily living of patients with cataract and glaucoma according to test data ( $M \pm m$ , scores)

Критерий деятельности в повседневной жизни	Пациенты с саркопеническим ожирением и катарактой	Пациенты с саркопеническим ожирением и глаукомой	p
Прочтение текста	1,53±0,04	1,38±0,03	<0,05
Проведение нитки в иглу	1,84±0,03	1,52±0,02	<0,01
Отрезание бумаги заданных размеров	1,18±0,01	0,95±0,02	<0,01
Стрижка ногтей	1,75±0,03	1,43±0,04	<0,01
Различение цифр на телефоне	1,52±0,03	1,26±0,02	<0,01
Написание текста	1,68±0,04	1,32±0,02	<0,01
Подсчёт денег	1,47±0,02	1,28±0,01	<0,05
Определение цвета предметов (одежды)	1,21±0,03	1,04±0,02	<0,05
Всего	12,18±0,4	10,18±0,5	<0,05

Ранговые места других видов деятельности в повседневной жизни при самостоятельном выполнении среди пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой и саркопеническим ожирением и глаукомой также различаются. У пациентов с саркопеническим ожирением и глаукомой на четвертой позиции находятся ограничения с прочтением текста, а у пациентов с саркопеническим ожирением и глаукомой – ограничения с написанием текста. У пациентов рассматриваемых групп существенно снижена способность самостоятельно различать цифры на телефоне и более существенно при катаракте. В меньшей степени пациенты с саркопеническим ожирением и катарактой и саркопеническим ожирением и глаукомой имеют ограничения самостоятельно отрезать бумагу заданных размеров и определить цвета предметов (одежды).

По величине интегрального показателя деятельности в повседневной жизни пациенты с саркопеническим

ожирением и катарактой имеют, согласно принятой градации, выраженную (полную) зависимость в посторонней помощи, а пациенты того же возраста с саркопеническим ожирением и глаукомой – умеренную (среднюю) зависимость со статистически значимым различием (Рисунок).

Такое существенное различие в зависимости от посторонней помощи у пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой, на наш взгляд, связано с утратой центрального и периферического зрения вследствие данного заболевания и с относительным сохранением центрального зрения при потере периферического зрения при саркопеническом ожирении и глаукоме. Поэтому пациенты с саркопеническим ожирением и катарактой, несмотря на отсутствие различий в возрасте, в большей степени имеют ограничения в деятельности в повседневной жизни, нежели пациенты с саркопеническим ожирением и первичной глаукомой.

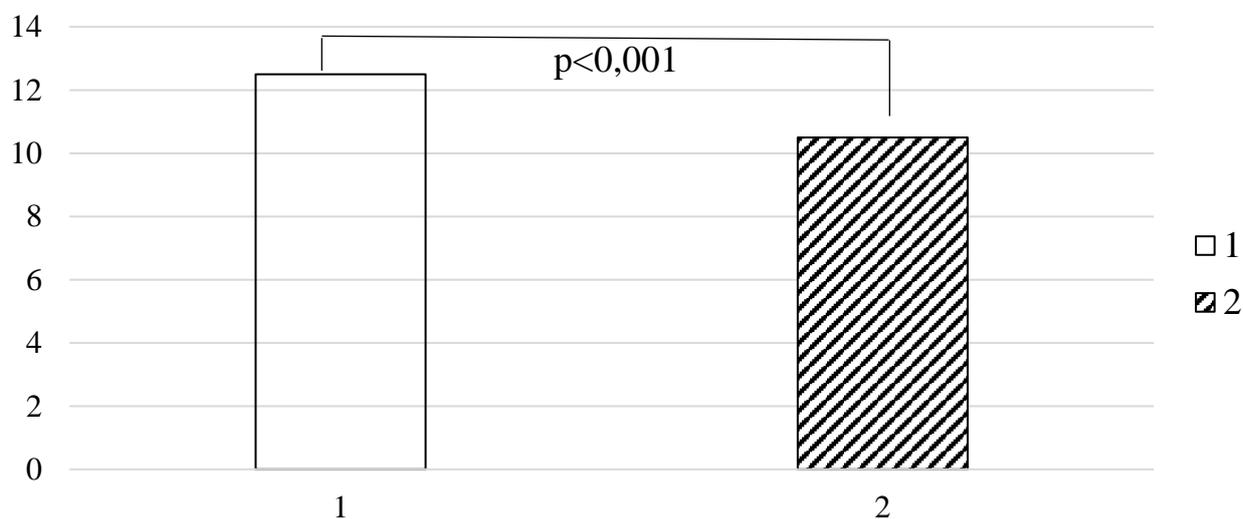


Рис. Интегральная величина базовой функциональной активности пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой (1) и саркопеническим ожирением и глаукомой (2) (M±m, баллы)

Примечание: По оси абсцисс представлены сравниваемые группы пациентов, по оси ординат – интегральная величина деятельности в повседневной жизни

Fig. The integral value of the basic functional activity of patients with sarcopenic obesity and cataract (1) and sarcopenic obesity and glaucoma (2) (M±m, points)

Note: The compared groups of patients are represented along the abscissa axis, and the integral value of activity in daily life is represented along the ordinate axis

Следовательно, нарушения зрения приводят к несоответствию человека в окружающей среде, вызывая трудности в решении повседневных задач даже в знакомой ситуации [10]. Однако доказательств такой связи между зрительным дефицитом и деятельностью в повседневной жизни и используемых для этой цели тестов, специфичных и адекватных для пациентов с нарушением зрения и саркопеническим ожирением, в настоящее время недостаточно и поэтому у пациентов с офтальмологическими заболеваниями применяются шкалы, предложенные для оценки деятельности в повседневной жизни пациентов с соматической патологией без учёта зрительного дефицита, не позволяющие идентифицировать рассмотренные и включённые нами виды деятельности в повседневной жизни в тест оценки базовой функциональной активности пациентов с нарушением зрения.

Шкала деятельности в повседневной жизни (ADL) оценивает способность выполнять самостоятельно 10 основных видов деятельности в повседневной жизни: питание, перемещение со стула на кровать и обратно, личная гигиена и уход за собой, гигиена туалета, купание и принятие душа, перемещение, подъём и спуск по лестнице, одевание и поддержание контроля за кишечником и мочеиспусканием [13]. Как видно из вышеприведённых видов деятельности в повседневной жизни шкалы Бартел, многие из них не требуют наличия высокой остроты зрения как центрального, так и периферического. В частности, к таким видам деятельности в повседневной жизни следует, по нашему мнению, отнести питание, перемещение со стула на кровать и обратно, личная гигиена и уход за собой, гигиена туалета, купание и принятие душа, одевание и поддержание контроля за кишечником и мочеиспусканием. Нарушение зрения может влиять на такие виды деятельности в повседневной жизни, оцениваемые шкалой Бартел, как перемещение, подъём и спуск по лестнице в случае крайне низкой остроты зрения.

Исследование, проведенное среди пожилых людей, проживающих в учреждениях долгосрочного ухода в четырех странах (Канада, Соединенные Штаты, Финляндия, Бельгия), показало, что пожилые люди с нарушениями зрения с большей вероятностью имели сильно скомпрометированную независимость по ADL [14]. Обнаружено, что пожилые люди Сингапура с одним или обоими нарушениями зрения связаны с более длительными ограничениями физических функций по ADL [13]. Пожилые люди с нарушениями зрения также чаще сообщали о трудностях при ADL — например, при ходьбе, выходе на улицу, вставании с кровати или стула, приеме лекарств и приготовлении пищи - чем пожилые люди без нарушений зрения вследствие разных офтальмологических заболеваний. Выявлено, что пожилые люди с нарушениями слуха чаще называли подобные трудности по ADL, чем пожилые люди без зрительных нарушений [15]. Среди пожилых людей из двух домов социального обеспечения в Малайзии показано, что пожилые люди с нарушениями зрения испытывали больше трудностей по ADL [16].

Также отмечается в исследовании, оценивавшем связь нарушений слуха и зрения с негативным самочувствием среди пожилых людей, проживающих по месту жительства, установлена связь нарушения зрения со снижением функциональной активности у представителей обоих полов. Данные свидетельствуют о том, что, хотя женщины имеют более высокую продолжительность жизни, у них выше доля лет нетрудоспособности по сравнению с мужчинами [17].

Получены результаты модели логистической регрессии, которая иерархически описывает связи между нарушениями зрения и ограничениями по ADL [17]. У респондентов мужского пола нескорректированный показатель OR ограничений по зрению или по поводу нарушения зрения и ADL составил 7,35 (95%ДИ 4,25-12,72). Включение

социально-демографических ковариат уменьшило степень связи между нарушениями зрения и ограничениями по ADL (OR 5,52; 95% ДИ 3,05-9,99). Добавление ковариат, связанных со здоровьем, дополнительно уменьшило величину ассоциации до OR 4,96 (95%ДИ 2,72-6,38). Добавление социальных ковариат дополнительно снизило OR до 3,79 (95%ДИ 2,26-6,38). Аналогичная картина наблюдалась среди респондентов женского пола. Нескорректированный показатель OR по поводу нарушения зрения и ограничений по ADL составил 4,13 (95% ДИ 2,22-7,67). В полностью скорректированной модели связь снизилась до OR 2,66 (95%ДИ 1,36-5,21) [17].

Более существенно показатели базовой функциональной активности у пациентов с офтальмологической патологией снижаются при сочетании зрительного дефицита с другим сенсорным дефицитом – нарушением слуха [17]. Показано на основе моделей логистической регрессии, иерархически описывающих связь между нарушениями слуха и ограничениями по ADL для каждого пола. У респондентов мужского пола нескорректированный показатель OR по нарушению слуха и ограничений ADL составил 7,97 (95%ДИ 5,19-12,23). Включение социально-демографических ковариат уменьшило степень связи между нарушениями слуха и снижением функциональности по ADL (OR 6,43; 95%ДИ 4,18-9,90). Добавление ковариат, связанных со здоровьем, немного уменьшило величину ассоциации до 6,30 OR (95%ДИ 4,01-9,90). Добавление социальных ковариат дополнительно снизило величину OR до 5,76 (95%ДИ 3,52-9,40). Среди респонденток женского пола была обнаружена аналогичная тенденция. Показатель ограниченной функциональной активности без учета нарушений слуха по ADL без коррекции OR составил 4,57 (95%ДИ 1,67-12,50). В полностью скорректированной модели связь была снижена до OR 3,30 (95%ДИ 1,17-9,33) [17].

Использованный нами тест оценки деятельности в повседневной жизни пациентов с нарушением зрения и саркопеническим ожирением ориентирован на анализ составляющих базовой функциональной активности, выполнение которых в повседневной жизни невозможно с существенным нарушением зрения, поскольку идентифицирует виды повседневной деятельности, ассоциированные с мелкими объектами, оценить которые не позволяет шкала Бартел, так как не содержит таких критериев.

В исследовании, выполненном в Малайзии с использованием традиционной шкалы Бартел, установлено, что нарушение зрения в значительной степени связано с ограничениями по ADL после поправки на ковариаты у обоих полов и возраст. Это согласуется с исследованием, проведенным среди пожилых людей из двух домов социального обеспечения, установившем, что пожилые люди с нарушениями зрения испытывали больше трудностей при ADL [18]. Сообщалось об аналогичных результатах, в которых была обнаружена значительная связь со снижением функциональной активности у представителей обоих полов с нарушением зрения. Аналогичным образом, нарушение зрения связано со снижением функциональности после поправки на социально-демографические характеристики и хронические заболевания у пожилых женщин. Пожилые люди с нарушениями зрения также чаще сообщали о трудностях при ходьбе, выходе на улицу, вставании с кровати или стула, приеме лекарств и приготовлении пищи по сравнению с пожилыми людьми без нарушения зрения [15]. Поэтому важно обеспечить адекватное лечение или коррекцию нарушений зрения у пожилых людей, особенно среди лиц с ограничениями по ADL, чтобы ограничить нежелательные последствия нарушений зрения для жизни пожилых людей.

Способность же выполнять виды деятельности в повседневной жизни,

предусмотренные шкалой ADL, зависит от когнитивных (рассуждения, планирование), двигательных (баланс, ловкость) и перцептивных (включая сенсорные) способностей [18]. Также существует важное различие между способностью человека выполнять задачу (физическая и / или когнитивная способность) и способностью признать, что задача должна быть выполнена без подсказки (когнитивная способность). Оценка способности к ADL часто выполняется на средних или поздних стадиях деменции, но может осуществляться и в процессе выздоровления. Направление для оценки способности ADL может включать вопросы когнитивных, эмоциональных или поведенческих факторов, мешающих функционированию этих основных навыков, и способы преодоления этих ограничений для повышения независимости. Предложенный и использованный же нами тест оценки ADL пациентов с нарушением зрения и саркопеническим ожирением исключает влияние на его результаты когнитивной дисфункции кроме такого вида деятельности в повседневной жизни как подсчёт денег.

Снижение ограничений базовой функциональности может достигаться путем повышения информированности или медицинской грамотности пациентов, обследованных нами и других категорий пациентов, так как показано, что респонденты с более высоким уровнем образования связаны с более низкими шансами получить ограничения по ADL [17]. Этот вывод согласуется с предыдущими исследованиями, проведенными среди пожилых жителей сельской местности и показавшими, что низкий уровень образования является одним из факторов риска ограничений по ADL [19]. Национальный опрос пожилых людей в Таиланде показал, что респонденты без образования подвергаются более высокому риску ограничений. В Испании более низкий

образовательный статус был связан с более высоким риском ограничений по ADL среди пожилых людей [20]. Аналогичным образом, отсутствие формального образования было связано с более высоким риском ограничений по ADL среди пожилых людей Индии [21]. Следовательно, уровень образования должен приниматься во внимание при разработке рекламных программ или политики, связанных с нарушениями зрения и ограничениями по ADL среди пожилых людей.

Разработанный нами тест оценки базовой функциональной активности пациентов с дефицитом зрительных функций исключает влияние не только, как отмечено ранее, когнитивных нарушений, но и воздействие другого распространенного среди пациентов с офтальмологическими заболеваниями гериатрического синдрома – депрессии [12], поскольку у пожилых пациентов обнаружена ассоциация депрессии с наличием отдельных ограничений по шкале Бартел [22]. Деятельность в повседневной жизни снижается с возрастом и многие повседневные действия трудно выполнять самостоятельно. Физическое ухудшение считается ключевой проблемой для способности пожилых людей к самообслуживанию. Ограничения в повседневной деятельности и физических функциях приводят к тому, что пожилые люди теряют независимость, что приводит к симптомам депрессии. Это состояние может привести к психосоциальным и финансовым трудностям. Существенные данные свидетельствуют о том, что ограничения по ADL подвержены люди с более высоким риском развития симптомов депрессии, а физическая дисфункция ассоциировалась с симптомами депрессии у взрослых китайцев в возрасте 55 лет. Пожилые люди с повышенным уровнем функциональных ограничений могут иметь симптомы депрессии, ограничения по ADL, что может способствовать, в свою очередь, развитию симптомов депрессии. Авторы демонстрируют, как и предыдущие

исследования, связь между физической функцией, ADL и симптомами депрессии. Пожилые люди с депрессией чаще имели физическую дисфункцию и ограничения по ADL. Выявлена сильная связь между ограничениями по ADL и физической дисфункцией и риском развития симптомов депрессии. Таким образом, необходимо уделять внимание физическому здоровью пожилых людей, особенно с нарушением зрения. Правительство и общество должны оказывать дополнительную помощь пожилым людям с нарушениями ADL и физической дисфункцией. У пациентов с нарушением зрения малоподвижный образ жизни приводит к снижению способности выполнять повседневную деятельность. Поэтому пожилым людям требуется достаточная физическая активность для повышения их функциональных возможностей и психического здоровья [22].

В проспективном исследовании 2713 пожилых китайцев, которые прошли обследования в рамках Чикагского исследования китайской популяции пожилого возраста, была обнаружена значительная взаимосвязь между симптомами депрессии и возникновением функциональных ограничений [22]. В исследовании изменений уровня симптомов депрессии у пожилых китайцев было обнаружено, что ограничения по ADL являются группой высокого риска развития симптомов депрессии. В исследовании, проведенном в Пекине, было указано, что пожилые люди в возрасте 60-74 лет с ограниченными возможностями чаще испытывают симптомы депрессии. Аналогичным образом, установлена связь ограничений по ADL с повышенным риском развития симптомов депрессии у людей среднего и пожилого возраста. Данные одного исследования показали, что физическая дисфункция у пожилых людей достоверно связана с распространенностью симптомов депрессии. Кроме того, анализ факторов, влияющих на психическое здоровье пожилых людей 60-74 лет, показал, что физическая функция и ADL

были тесно связаны с симптомами депрессии [20].

Наряду с этим продемонстрировано, что респонденты с более высоким уровнем образования, занятости и более высоким уровнем социальной поддержки связаны с более низкими шансами получить ограничения по ADL. У замужних женщин более низкие шансы получить ограничения по ADL. С другой стороны, падения были связаны с более высокими шансами ограничений по ADL среди мужчин [17].

Кроме того, исследование, изучающее связь между нарушениями зрения и снижением функциональной активности, не выявило существенной связи после поправки на социально-демографические характеристики и медицинские состояния. Несоответствия результатов, вероятно, вызваны различными методами, используемыми при сборе данных о нарушениях зрения. Предыдущие исследования оценивали нарушения зрения с использованием объективного метода, либо в соответствии со стандартным протоколом, как и в нашем исследовании, но по неспецифическим тестам, в отличие от данного исследования.

Практическое значение разработанного нами теста по оценке базовой функциональной активности определяется тем, что он позволяет выявить виды деятельности в повседневной жизни, которые требуют хороших зрительных функций и, прежде всего, остроты зрения. Выполнение же видов деятельности, представленных в обсуждаемом тесте, лицами со зрительным дефицитом вызывает зависимость в посторонней помощи, а выявление данных видов деятельности невозможно ранее предложенными шкалами – ADL, Katz и другими.

Использование созданного теста может быть реализовано офтальмологом, подобно тому, как офтальмолог определяет остроту зрения или поля зрения. Применяя наш тест офтальмолог может выявить ограничения в деятельности в повседневной жизни пациентов со

зрительным дефицитом и предложить рекомендации для родственников или сотрудников социальной защиты по оказанию помощи в их реализации.

**Заключение.** Деятельность в повседневной жизни пациентов с саркопеническим ожирением и нарушением зрения, обусловленным катарактой и глаукомой, согласно результатам использованного нами специфического теста оценки базовой функциональной активности, существенно различается и характеризуется соответственно выраженной (полной) зависимостью и умеренной зависимостью в посторонней помощи. Однако наибольшая зависимость от окружающих в обеих группах установлена по выполнению таких видов деятельности в повседневной жизни как проведение нитки в иглу и стрижка ногтей. Далее среди рассматриваемых ограничений у пациентов с саркопеническим ожирением и катарактой находится затруднение в написании текста самостоятельно, а у пациентов с саркопеническим ожирением и глаукомой – прочтение текста. Использование созданного нами теста оценки деятельности в повседневной жизни не зависит от когнитивных способностей, за исключением выполнения подсчёта денег, и позволяет выявить ограничения видов деятельности в повседневной жизни, которые обусловлены, прежде всего, зрительным дефицитом.

### **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. Barkmeier AJ. Toward Optimal Screening for Diabetic Retinopathy: Balancing Precision and Pragmatism. *Mayo Clinic Proceedings.* 2021;96(2):282-284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.12.008>
2. Kwon JW, Jee D, La TY. Neovascular glaucoma after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Medicine.* 2017;96(10):6263-6268. DOI: <https://doi.org/10.1097/md.0000000000006263>
3. Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. *Frontiers in Endocrinology.* 2023;13:1077669. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1077669>
4. Wu TH, Jiang B, Liu WM, et al. Time trends and gender disparities of Chinese cataract burden and their predictions. *International Journal of Ophthalmology.* 2023;16(9):1527-1534. DOI: <https://doi.org/10.18240/ijo.2023.09.21>
5. Han X, Zou M, Liu Z, et al. Time trends and heterogeneity in the disease burden of visual impairment due to cataract, 1990-2019: A global analysis. *Frontiers in Public Health.* 2023;11:1140533. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1140533>
6. Lin Y, Jiang B, Cai Y, et al. The Global Burden of Glaucoma: Findings from the Global Burden of Disease 2019 Study and Predictions by Bayesian Age-Period-Cohort Analysis. *Journal of Clinical Medicine.* 2023;12(5):1828. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm12051828>
7. Seth PK, Senthil S, Das AV, et al. Prevalence of glaucoma types, clinical profile and disease severity at presentation: Tertiary Institute based cross-sectional study from South India. *Indian Journal of Ophthalmology.* 2023;71(10):3305-3312. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijo.ijo\\_3305\\_22](https://doi.org/10.4103/ijo.ijo_3305_22)
8. Galuszka M, Pojda-Wilczek D, Karska-Basta I. Age-Related Macular or Retinal Degeneration? *Medicina.* 2023;59(5):920. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina59050920>
9. Hamati J, Prashanthi S, Narayanan R, et al. Prevalence of age-related macular degeneration and associated factors in Indian cohort in a tertiary care setting. *Indian Journal of Ophthalmology.* 2023;71(10):3361-3366. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijo.ijo\\_199\\_23](https://doi.org/10.4103/ijo.ijo_199_23)
10. Kee QT, Rahman MH, Fadzil NM, et al. The impact of near visual impairment on instrumental activities of daily living among community-dwelling older adults in Selangor.

BMC Research Notes. 2021;14(1):395. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05813-3>

11. Pasdar Y, Darbandi M, Rezaeian S, et al. Association of Obesity, Sarcopenia, and Sarcopenic Obesity With Hypertension in Adults: A Cross-Sectional Study From Ravansar, Iran During 2014-2017. *Frontiers in Public Health*. 2022;9:705055. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.705055>

12. Копылов АЕ, Османов РЭ. Тест базовой функциональной активности пациентов с нарушением зрения. Проблемы и успехи современной геронтологии и гериатрии. 2019;1:26-28. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17031006>

13. Tornero-Quinones I, Saez-Padilla J, Diaz AE, et al. Functional Ability, Frailty and Risk of Falls in the Elderly: Relations with Autonomy in Daily Living. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(3):1006-1015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17031006>

14. Guthrie DM, Declercq A, Finne-Soveri H, et al. The Health and Well-Being of Older Adults with Dual Sensory Impairment (DSI) in Four Countries. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155073. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155073>

15. Crews JE, Campbell VA. Vision impairment and hearing loss among community-dwelling older Americans: implications for health and functioning. *American Journal of Public Health*. 2004;94(5):823-829. DOI: <https://doi.org/10.2105/ajph.94.5.823>

16. Moreno X, Albala C, Lera L, et al. Gender, nutritional status and disability-free life expectancy among older people in Santiago, Chile. *PLoS ONE*. 2018;13(3):e0194074. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194074>

17. Chan YM, Sahril N, Chan YY, et al. Vision and Hearing Impairments Affecting Activities of Daily Living among Malaysian Older Adults by Gender. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(12):6271. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18126271>

18. Falahaty K, Cheong LS, Isa MBHM. Disability among Elderly People with Visual Impairment in Two Welfare Homes in Malaysia. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2015;8(2):1369-1382. DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/897>

19. Norliana I. Pattern and Risk Factors of Functional Limitation and Physical Disability among Community-Dwelling Elderly in Kuala

Piloh, Malaysia: A 12-Month Follow-Up Study. [dissertation]. Kuala Lumpur; 2016.

20. Carmona-Torres JM, Rodríguez-Borrego MA, Laredo-Aguilera JA, et al. Disability for basic and instrumental activities of daily living in older individuals. *PLoS ONE*. 2019;14(7):e0220157. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220157>

21. Duba AS, Rajkumar AP, Prince M, et al. Determinants of disability among the elderly population in a rural south Indian community: the need to study local issues and contexts. *International Psychogeriatrics*. 2012;24(2):333-341. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1041610211001669>

22. Yan Y, Du Y, Li X, et al. Physical function, ADL, and depressive symptoms in Chinese elderly: Evidence from the CHARLS. *Frontiers in Public Health*. 2023;11:1017689. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1017689>

## References

1. Barkmeier AJ. Toward Optimal Screening for Diabetic Retinopathy: Balancing Precision and Pragmatism. *Mayo Clinic Proceedings*. 2021;96(2):282-284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.12.008>

2. Kwon JW, Jee D, La TY. Neovascular glaucoma after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Medicine*. 2017;96(10):6263-6268. DOI: <https://doi.org/10.1097/md.00000000000006263>

3. Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;13:1077669. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1077669>

4. Wu TH, Jiang B, Liu WM, et al. Time trends and gender disparities of Chinese cataract burden and their predictions. *International Journal of Ophthalmology*. 2023;16(9):1527-1534. DOI: <https://doi.org/10.18240/ijo.2023.09.21>

5. Han X, Zou M, Liu Z, et al. Time trends and heterogeneity in the disease burden of visual impairment due to cataract, 1990-2019: A global analysis. *Frontiers in Public Health*. 2023;11:1140533. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1140533>

6. Lin Y, Jiang B, Cai Y, et al. The Global Burden of Glaucoma: Findings from the Global Burden of Disease 2019 Study and Predictions by Bayesian Age-Period-Cohort Analysis. *Journal of Clinical Medicine*. 2023;12(5):1828. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm12051828>

7. Seth PK, Senthil S, Das AV, et al. Prevalence of glaucoma types, clinical profile and

disease severity at presentation: Tertiary Institute based cross-sectional study from South India. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2023;71(10):3305-3312. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijo.ijo\\_3305\\_22](https://doi.org/10.4103/ijo.ijo_3305_22)

8. Galuszka M, Pojda-Wilczek D, Karska-Basta I. Age-Related Macular or Retinal Degeneration? *Medicina*. 2023;59(5):920. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina59050920>

9. Hamati J, Prashanthi S, Narayanan R, et al. Prevalence of age-related macular degeneration and associated factors in Indian cohort in a tertiary care setting. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2023;71(10):3361-3366. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijo.ijo\\_199\\_23](https://doi.org/10.4103/ijo.ijo_199_23)

10. Kee QT, Rahman MH, Fadzil NM, et al. The impact of near visual impairment on instrumental activities of daily living among community-dwelling older adults in Selangor. *BMC Research Notes*. 2021;14(1):395. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05813-3>

11. Pasdar Y, Darbandi M, Rezaeian S, et al. Association of Obesity, Sarcopenia, and Sarcopenic Obesity With Hypertension in Adults: A Cross-Sectional Study From Ravansar, Iran During 2014-2017. *Frontiers in Public Health*. 2022;9:705055. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.705055>

12. Kopylov AE, Osmanov RE. Test of basic functional activity of patients with visual impairment. *Problems and successes of modern gerontology and geriatrics*. 2019;1:26-28. Russian.

13. Tornero-Quinones I, Saez-Padilla J, Diaz AE, et al. Functional Ability, Frailty and Risk of Falls in the Elderly: Relations with Autonomy in Daily Living. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(3):1006-1015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17031006>

14. Guthrie DM, Declercq A, Finne-Soveri H, et al. The Health and Well-Being of Older Adults with Dual Sensory Impairment (DSI) in Four Countries. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155073. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155073>

15. Crews JE, Campbell VA. Vision impairment and hearing loss among community-dwelling older Americans: implications for health and functioning. *American Journal of Public Health*. 2004;94(5):823-829. DOI: <https://doi.org/10.2105/ajph.94.5.823>

16. Moreno X, Albala C, Lera L, et al. Gender, nutritional status and disability-free life expectancy among older people in Santiago, Chile. *PLoS ONE*. 2018;13(3):e0194074. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194074>

17. Chan YM, Sahril N, Chan YY, et al. Vision and Hearing Impairments Affecting Activities of Daily Living among Malaysian Older Adults by Gender. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(12):6271. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18126271>

18. Falahaty K, Cheong LS, Isa MBHM. Disability among Elderly People with Visual Impairment in Two Welfare Homes in Malaysia. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2015;8(2):1369-1382. DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/897>

19. Norliana I. Pattern and Risk Factors of Functional Limitation and Physical Disability among Community-Dwelling Elderly in Kuala Pilah, Malaysia: A 12-Month Follow-Up Study. [dissertation]. Kuala Lumpur; 2016.

20. Carmona-Torres JM, Rodríguez-Borrego MA, Laredo-Aguilera JA, et al. Disability for basic and instrumental activities of daily living in older individuals. *PLoS ONE*. 2019;14(7):e0220157. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220157>

21. Duba AS, Rajkumar AP, Prince M, et al. Determinants of disability among the elderly population in a rural south Indian community: the need to study local issues and contexts. *International Psychogeriatrics*. 2012;24(2):333-341. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1041610211001669>

22. Yan Y, Du Y, Li X, et al. Physical function, ADL, and depressive symptoms in Chinese elderly: Evidence from the CHARLS. *Frontiers in Public Health*. 2023;11:1017689. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1017689>

Статья поступила в редакцию 11 декабря 2023 г.

Поступила после доработки 8 июня 2024 г.

Принята к печати 15 июля 2024 г.

Received 11 December 2023

Revised 8 June 2024

Accepted 15 July 2024

#### Информация об авторах

**Николай Михайлович Агарков**, доктор медицинских наук, профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; научный консультант, Тамбовский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс

«Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», г. Тамбов, Российская Федерация, E-mail: vitalaxen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4821-3692>.

**Вера Николаевна Агаркова**, студент ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [lqmpl@yandex.ru](mailto:lqmpl@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7373-0264>.

**Андрей Евгеньевич Копылов**, кандидат медицинских наук, заведующий отделением лазерного рефракционного центра Тамбовского филиала ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», г. Тамбов, Российская Федерация, E-mail: [mntk@mntk-tambov.ru](mailto:mntk@mntk-tambov.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3536-1645>.

#### Information about the authors

**Nikolay M. Agarkov**, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Biomedical Engineering, Southwest State University, Kursk; Scientific Adviser, Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution (Tambov Branch), Tambov, Russia, E-mail: [vitalaxen@mail.ru](mailto:vitalaxen@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4821-3692>.

**Vera N. Agarkova**, Student, Southwest State University, Kursk, Russia, E-mail: [lqmpl@yandex.ru](mailto:lqmpl@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7373-0264>.

**Andrey E. Kopylov**, Cand. Sci (Medicine), Head of the Department of the Laser Refraction Center, Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution (Tambov Branch), Tambov, Russia, E-mail: [mntk@mntk-tambov.ru](mailto:mntk@mntk-tambov.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3536-1645>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-1-1-0

УДК 616.8

# Ассоциация полиморфизмов генов нейромедиаторных систем мозга с риском развития психических нарушений у детей, оставшихся без попечения родителей

Е.А. Бодагова , Н.В. Говорин , В.А. Мудров

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия», ул. Горького, д. 39 «а», г. Чита, 672000, Российская Федерация  
Автор для переписки: Е.А. Бодагова (*bodagova.ea@yandex.ru*)

## Резюме

**Актуальность:** Социальные сироты имеют разнообразные поведенческие и интеллектуальные расстройства. Ряд определенных полиморфизмов генов дофаминовой и серотониновой нейромедиаторных систем мозга имеет патогенетическое значение в формировании различных психических заболеваний. В связи с чем, изучение генов-кандидатов, связанных с риском возникновения эмоциональных и поведенческих нарушений, является на сегодняшний день наиболее актуальным и перспективным в плане дифференцированного подхода к последующей психопрофилактике и лечению психической патологии у детей, оставшихся без попечения родителей. **Цель исследования:** Изучение вклада полиморфных вариантов генов *TPH1*, *MAOA*, *HTR2A*, *DRD4*, *COMT*, *DBH*, *DRD2* в развитие психических нарушений у детей, оставшихся без попечения родителей. **Материалы и методы:** Было проведено клиническое обследование 516 социальных сирот в период с 2018 г. по 2020 г., которое также включало молекулярно-генетическое типирование следующих генов: rs1800532 *TPH1*(A218C), rs6323 *MAOA* (R297R), rs6313 *HTR2A* (T102C), rs1800955 *DRD4* (C-521T), rs4680 *COMT* (G472A), rs1611115 *DBH* (C-1021T), rs1800497 *DRD2* (*Taq1A*), проведенное путём анализа ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови. Были определены частоты генотипов и аллелей данных генов. Распределение частот генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия хи-квадрата Пирсона ( $\chi^2$ ). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . **Результаты:** В группе детей-сирот с поведенческими нарушениями генотип AA и аллель A полиморфного маркера rs1800532 гена *TPH1*(A218C) встречались чаще, чем в группе контроля ( $p = 0,006$ ). Генотип AA и аллель A rs4680 гена *COMT* (G472A) и генотип T/T и аллель T rs1800497 гена *DRD2* (*Taq1A*) также имели значимые различия в исследуемых группах: они чаще встречались у социальных сирот, имеющих поведенческие психические расстройства ( $p = 0,01$  и  $p = 0,003$  соответственно). **Заключение:** Наличие полиморфизмов генов rs1800532 *TPH1*(A218C), rs4680 *COMT* (G472A) и rs1800497 *DRD2* (*Taq1A*) у социальных сирот сопровождается повышением риска возникновения психических нарушений в 1,65 и более раз.

**Ключевые слова:** дети, оставшиеся без попечения родителей; социальные сироты; полиморфизм генов; *TPH1*; *MAOA*; *HTR2A*; *DRD4*; *COMT*; *DBH*; *DRD2*

**Для цитирования:** Бодагова ЕА, Говорин НВ, Мудров ВА. Ассоциация полиморфизмов генов нейромедиаторных систем мозга с риском развития психических нарушений у детей, оставшихся без попечения родителей. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(1):178-195. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-1-0

# Association of polymorphisms of genes in neurotransmitter systems of the brain with the risk of developing mental disorders in children left without parental care

Ekaterina A. Bodagova , Nikolai V. Govorin , Victor A. Mudrov 

Chita State Medical Academy,  
39 "a" Gorky St., Chita, 672000, Russia

Corresponding author: Ekaterina A. Bodagova (bodagova.ea@yandex.ru)

## Abstract

**Background:** Social orphans have a variety of behavioural and intellectual disorders. A number of specific polymorphisms in genes involved in the brain's dopamine and serotonin neurotransmitter systems have been implicated in the pathogenesis of various mental disorders. In this context, the study of candidate genes associated with the risk of emotional and behavioural disorders is by far the most relevant and promising in terms of a differentiated approach to subsequent psychoprophylaxis and treatment of mental pathology in children left without parental care. **The aim of the study:** To study the contribution of polymorphic variants of the *TPHI*, *MAOA*, *HTR2A*, *DRD4*, *COMT*, *DBH*, *DRD2* genes to the development of mental disorders in children left without parental care. **Materials and methods:** A clinical examination of 516 social orphans was conducted in the period from 2018 to 2020, which also included molecular genetic typing of the following genes: rs1800532 *TPHI*(A218C), rs6323 *MAOA* (R297R), rs6313 *HTR2A* (T102C), rs1800955 *DRD4* (C-521T), rs4680 *COMT* (G472A), rs1611115 *DBH* (C-1021T), rs1800497 *DRD2* (Taq1A). The examination was conducted by analyzing DNA obtained from peripheral blood leukocytes. The frequencies of genotypes and alleles of these genes were determined. The distribution of genotype frequencies across the studied polymorphic loci was checked for compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium using the Pearson chi-square criterion ( $\chi^2$ ). The differences were considered significant at a significance level of  $p < 0.05$ . **Results:** In the group of orphans with behavioral disorders, genotype AA and allele A of the polymorphic marker rs1800532 of the *TPHI*(A218C) gene were more common than in the control group ( $p = 0.006$ ). Genotype AA and allele A rs4680 of the *COMT* gene (G472A) and genotype T/T and allele T rs1800497 of the *DRD2* gene (Taq1A) also showed significant differences between the study groups: they were more frequent in social orphans with conduct disorder ( $p = 0.01$  and  $p = 0.003$ , respectively). **Conclusion:** The presence of polymorphisms of the rs1800532 *TPHI*(A218C), rs4680 *COMT* (G472A) and rs1800497 *DRD2* (Taq1A) genes in social orphans is accompanied by an increased risk of mental disorders by 1.65 times or more.

**Keywords:** children left without parental care; social orphans; gene polymorphism; *TPHI*; *MAOA*; *HTR2A*; *DRD4*; *COMT*; *DBH*; *DRD2*

**For citation:** Bodagova EA, Govorin NV, Mudrov VA. Association of polymorphisms of genes in neurotransmitter systems of the brain with the risk of developing mental disorders in children left

without parental care. *Research Results in Biomedicine*. 2025;11(1):178-195. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2025-11-1-1-0

**Введение.** Состояние здоровья детей, оставшихся без попечения родителей, значительно отличается от здоровья детей, проживающих в полных семьях. Воспитанники интернатных учреждений имеют крайне негативные показатели психического и физического здоровья [1, 2]. Так, результаты зарубежных и отечественных исследований показывают, что сироты имеют разнообразные поведенческие и интеллектуальные нарушения [3, 4], они отличаются склонностью к агрессивности, делинквентности и употреблению психоактивных веществ [5, 6].

При этом в качестве причин формирования психических расстройств выделяют не только средовые и социальные факторы, но и генетическую предрасположенность [7, 8, 9]. В настоящее время наиболее важные патогенетические механизмы психических расстройств связаны с нарушениями нейромедиаторных систем мозга. Исследования показали, что ряд определенных полиморфизмов генов дофаминовой и серотониновой нейромедиаторных систем может иметь патогенетическое значение в формировании различных эмоциональных и поведенческих нарушений [8, 10, 11, 12]. Так, авторы относят к категории высокого риска по развитию склонности к антисоциальному поведению, депрессии, тревожности и алкоголизации наличие следующих полиморфизмов генов: rs1800532 *TPH1*(A218C), rs6323 *MAOA* (R297R), rs6313 *HTR2A* (T102C), rs1800955 *DRD4* (C-521T), rs4680 *COMT* (G472A), rs1611115 *DBH* (C-1021T), rs1800497 *DRD2* (*Taq1A*) [12, 13, 14].

Полиморфизм гена триптофангидроксилазы 1 (*TPH1*) тесно ассоциирует со склонностью к суицидальному поведению, с развитием депрессивных психозов и высокой тревожностью [13]. Мутации в дофаминовых рецепторах второго и четвертого типов *DRD2* и *DRD4* могут

являться маркерами импульсивности, делинквентного поведения и употребления ПАВ [15, 16]. Ассоциация гена *COMT* (катехол-О-метилтрансферазы) с агрессивным поведением установлена многими учеными [8, 11, 12]. Полиморфные варианты гена *DBH* (дофамин-β-гидроксилазы) влияют на развитие зависимости от алкоголя [17]. Исследования зарубежных авторов выявили также связь суицидального поведения с полиморфизмом гена рецептора 2А серотонина – *HTR2A* [18]. Ген моноаминоксидазы А (*MAOA*) является наиболее изученным, его особенности привлекают повышенное внимание исследователей в виду наличия его патогенетической связи с формированием агрессивного поведения [19, 20]. Полиморфизм гена *MAOA* считается вероятным геном-кандидатом антисоциального поведения и склонности к алкоголизации [7, 21, 22, 23].

В связи с вышеперечисленным по-прежнему остается актуальным исследование полиморфизмов генов нейромедиаторных систем мозга. Потребность в более глубоком анализе также объясняется тем, что наиболее точное, научное представление о психогенетических механизмах, которые находятся в основе возникновения психических расстройств, будет способствовать оказанию своевременной профилактики и помощи социальным сиротам.

**Цель исследования.** Изучение вклада полиморфных вариантов генов *TPH1*, *MAOA*, *HTR2A*, *DRD4*, *COMT*, *DBH*, *DRD2* в развитие психических нарушений у детей, оставшихся без попечения родителей.

**Материалы и методы исследования.** На первом этапе исследования в период с 2018 г. по 2020 г. было проведено клиническое обследование 516 детей из 15 Центров помощи детям, оставшимся без попечения родителей

(ЦПДОПР). После чего было проведено молекулярно-генетическое типирование исследуемых генов 400 воспитанникам из ЦПДОПР (основная группа). В группу контроля были включены 100 детей и подростков, обучающихся в общеобразовательной школе и проживающих в своих биологических полных семьях. Группы были сопоставимы по возрастной структуре ( $U=23870,5$ ,  $p=0,23$ ). Для клинической интерпретации психических и поведенческих расстройств применялись критерии МКБ-10.

Молекулярно-генетическое типирование для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов rs1800532 *TPH1(A218C)*, rs6323 *MAOA (R297R)*, rs6313 *HTR2A (T102C)*, rs1800955 *DRD4 (C-521T)*, rs4680 *COMT (G472A)*, rs1611115 *DBH (C-1021T)*, rs1800497 *DRD2 (Taq1A)* проведено путём анализа ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови («Синтол», НПФ «Литех», г. Москва) с использованием SNP-наборов, соответствующих заявленному полиморфизму («Синтол», НПФ «Литех», г. Москва). Метод исследования: PCR-EPh, PCR-Rt – полимеразная цепная реакция с детекцией продукта амплификации в агарозном геле (PCR-EPh) либо в режиме реального времени (PCR-Rt) (амплификаторы «ДТ-96», НПФ «ДНК-Технология», г. Москва).

При проведении статистического анализа авторы руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL). Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в исследуемой и контрольной группах использовали критерий хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2$ ). Оценка значимости различий

показателей проводилась также за счет определения отношения шансов (OR). Статистическая значимость отношения шансов оценивалась исходя из значений 95 % доверительного интервала (95 % CI) [24]. Значения уровня  $p<0,05$  рассматривались как статистически значимые. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США).

**Этический аспект.** В работе соблюдали этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и Правилами клинической практики в Российской Федерации. От всех обследованных несовершеннолетних в возрасте 15-17 лет было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Информированное согласие детей младше 15 лет подписывалось родителями, для детей-сирот – директорами (законными представителями) ГУСО ЦПДОПР Забайкальского края (Государственное учреждение социального обслуживания «Центр помощи детям, оставшимся без попечения родителей»). Данное исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 87 от 30.11.2017 г.).

**Результаты и их обсуждение.** Результаты проведенного исследования показали, что социальные сироты и дети из полных семей отличаются по важным клинико-эпидемиологическим параметрам. Воспитанники ЦПДОПР имеют отягощенную алкоголизмом родителей наследственность, безнадзорное воспитание, низкую школьную успеваемость и поведенческие нарушения ( $p<0,001$ ). Сравнительный анализ основных клинико-эпидемиологических показателей представлен в таблице 1.

Таблица 1

**Сравнительная характеристика клинико-эпидемиологических показателей социальных сирот и детей, проживающих в полных семьях**

Table 1

**Comparative characteristics of clinical and epidemiological indicators of social orphans and children living in full families**

Параметры исследования		Исследуемые группы		Тестовая статистика
		Дети из ЦПДОПР (n=516)	Дети из полных семей (n=100)	
Возраст, лет		14,0 (13,4; 14,0)	13,0 (13,0; 13,4)	$U=23870,5$ , $p=0,23$
Пол	женский	39,3% (203/516)	46,0% (46/100)	$\chi^2=1,542$ $df=1$ $p=0,21$
	мужской	60,7% (313/516)	54,0% (54/100)	
Отягощенная наследственность	нет	11,2% (58/516)	97,0% (97/100)	$\chi^2=305,36$ $df=3$ $p<0,001$
	алкоголизм	87,6% (452/516)	3,0% (3/100)	
	шизофрения	0,6% (3/516)	0,0% (0/100)	
	умственная отсталость	0,6% (3/516)	0,0% (0/100)	
Алкоголизм родителей	нет	12,4% (64/516)	97,0% (97/100)	$\chi^2=319,46$ $df=3$ $p<0,001$
	отца	1,0% (5/516)	3,0% (3/100)	
	матери	37,4% (193/516)	0,0% (0/100)	
	обоих	49,2% (254/516)	0,0% (0/100)	
Состав семьи	полная	58,7% (303/516)	100,0% (100/100)	$\chi^2=63,1$ $df=1$ $p<0,001$
	неполная	41,3% (213/516)	0,0% (0/100)	
Воспитание	безнадзорное	96,5% (498/516)	0,0% (0/100)	$\chi^2=546,42$ $df=3$ $p<0,001$
	гипоопека	1,2% (6/516)	0,0% (0/100)	
	жесткое	2,3% (12/516)	0,0% (0/100)	
	адекватное	0,0% (0/516)	100,0% (100/100)	
Успеваемость в школе	низкая	48,6% (251/516)	4,0% (4/100)	$\chi^2=198,18$ $df=2$ $p<0,001$
	средняя	48,3% (249/516)	49,0% (49/100)	
	высокая	3,1% (16/516)	47,0% (47/100)	
Нарушения поведения	нет	38,4% (198/516)	98,0% (98/100)	$\chi^2=119,32$ $df=1$ $p<0,001$
	есть	61,6% (318/516)	2,0% (2/100)	
Психическое расстройство	нет	30,6% (158/516)	90,0% (90/100)	$\chi^2=122,8$ $df=1$ $p<0,001$
	есть	69,4% (358/516)	10,0% (10/100)	

Примечание:  $n$  – количество обследованных,  $df$  – степени свободы,  $\chi^2$  – хи-квадрат Пирсона,  $U$  – критерий Манна-Уитни,  $p$  – уровень значимости между исследуемыми группами.

Note:  $n$  – the number of examined,  $df$  – the degrees of freedom,  $\chi^2$  – the Pearson chi-square,  $U$  – the Mann-Whitney criterion,  $p$  – the significance level between the studied groups.

У 69,4% (358/516) воспитанников ЦПДОПР были диагностированы различные психические расстройства, структура выявленных психических нарушений была представлена следующим образом (по МКБ-10): ведущее место занимают «Органические легкие когнитивные расстройства» (F06.7) – 33,8%

(121/358) и «Социализированное расстройство поведения» (F91.2) – 25,2% (90/358). Также часто у воспитанников диагностировались «Смешанные специфические расстройства развития» (ЗПР) (F83) – 18,2% (65/358). Небольшая доля приходилась на «Тревожное расстройство поведения» (F92.8) – 6,2%

(22/358), «Органическое непсихотическое расстройство в связи со смешанными заболеваниями» (F06.82) – 5,3% (19/358), «Гиперкинетическое расстройство» (F90.1) – 4,7% (17/358) и «Депрессивное расстройство поведения» (F92.0) – 4,4% (16/358). В меньшей степени у детей было выявлено «Несоциализированное расстройство поведения» (F91.1) – 2,2% (8/358). Кроме того, у детей-сирот определены следующие наркологические расстройства: употребление алкоголя с вредными последствиями (F10.1) диагностировано в 18,0% случаев (93/516), употребление каннабиноидов с вредными последствиями (F12.1) – в 1,9% (10/516) случаев, употребление летучих растворителей с вредными последствиями (F18.1) – в 1,4% (7/516) случаев.

При обследовании учащихся общеобразовательной школы подавляющее большинство детей – 90,0% (90/100) было отнесено к группе здоровых, 10,0% (10/100) имели следующие нарушения: «Расстройство адаптации» (F43.2) – 3,0% (3/100), «Гиперкинетическое расстройство» (F90.1) – 2,0% (2/100), «Несоциализированное расстройство поведения» (F91.1) – 2,0% (2/100), «Преимущественно навязчивые мысли или размышления» (F42.0) – 1,0% (1/100), «Специфические расстройства речевой артикуляции» (F80.0) – 1,0% (1/100) и «Специфическое расстройство чтения» (F81.0) – 1,0% (1/100), т.е. грубых интеллектуальных и эмоционально-поведенческих психических расстройств у детей из полных семей зарегистрировано не было. Также, как и отсутствуют у них наркологические расстройства. Так при проведении теста «AUDIT» от 0 до 7 баллов (безопасное употребление алкоголя) набрали 100,0% (100/100) опрошенных.

На втором этапе проведено исследование образцов ДНК 400 социальных сирот (основная группа) и 100 детей из полных семей (контрольная группа). После распределения исследуемых групп по критерию наличия/отсутствия психической патологии, было проведено сравнение частот генотипов в подгруппах детей-сирот с психическими расстройствами (n=295) и детей из полных семей, не имеющих психических нарушений (здоровые) (n=90). Статистически значимые различия частот генотипов в исследуемых подгруппах были выявлены только для полиморфного варианта rs1800532 гена *TPH1(A218C)* ( $p=0,03$ ). При применении мультипликативной модели наследования показано, что частота аллеля А полиморфного маркера rs1800532 гена *TPH1(A218C)* была значимо выше в основной группе (0,42), чем в контрольной (0,33), что может указывать на ассоциацию данного аллеля с увеличением вероятности развития психических нарушений у социальных сирот (OR = 1,42 [95 % CI: 1,00-2,02],  $p=0,04$ ). Аллель С, напротив, встречался чаще у детей из полных семей (0,67), чем у основной группы (0,58), что указывает на протективную роль данного аллеля в отношении развития психических расстройств (OR=0,70 [95 % CI: 0,50-1,00],  $p=0,04$ ). Распределение частот генотипов генов rs6323 *MAOA (R297R)* и rs1800497 *DRD2 (Taq1A)* не соответствовало равновесию Харди-Вайнберга в основной группе, в отличие от контрольной, где уровень значимости был более 0,05 для генотипов всех исследуемых генов. Поэтому данные гены rs6323 *MAOA (R297R)* и rs1800497 *DRD2 (Taq1A)* были проанализированы только с применением общей модели (Табл. 2).

Таблица 2

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с психическими расстройствами (n=295) и контроля (n=90)**

Table 2

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with mental disorders (n=295) and control (n=90)**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
<b>TPH1(A218C) rs1800532</b>							
Соц. сироты	A	0,42	$\chi^2=3,87$ df=1 p=0,04	A/A	14,6	p=0,17	$\chi^2=7,21$ df=2 p=0,03
	C	0,58		C/A	53,9		
				C/C	31,5		
Контроль	A	0,33		A/A	13,3	p=0,51	
	C	0,67		C/A	40,0		
				C/C	46,7		
<b>MAOA (R297R) rs6323</b>							
Соц. сироты	A	0,64	$\chi^2=0,08$ df=1 p=0,78	A/A	45,8	p=0,004	$\chi^2=7,57$ df=2 p=0,02
	C	0,36		C/A	35,2		
				C/C	19,0		
Контроль	A	0,62		A/A	36,7	p=0,52	
	C	0,38		C/A	51,1		
				C/C	12,2		
<b>HTR2A (T102C) rs6313</b>							
Соц. сироты	C	0,63	$\chi^2=0,08$ df=1 p=0,78	C/C	44,1	p=0,05	$\chi^2=4,57$ df=2 p=0,1
	T	0,37		C/T	38,6		
				T/T	17,3		
Контроль	C	0,62		C/C	36,7	p=0,52	
	T	0,38		C/T	51,1		
				T/T	12,2		
<b>DRD4 (C-521T) rs1800955</b>							
Соц. сироты	C	0,51	$\chi^2=0,25$ df=1 p=0,62	C/C	27,5	p=0,51	$\chi^2=0,44$ df=2 p=0,8
	T	0,49		T/C	47,1		
				T/T	25,4		
Контроль	C	0,48		C/C	26,7	p=0,5	
	T	0,52		T/C	44,4		
				T/T	28,9		
<b>COMT (G472A) rs4680</b>							
Соц. сироты	G	0,54	$\chi^2=4,36$ df=1 p=0,04	G/G	29,2	p=0,74	$\chi^2=4,73$ df=2 p=0,09
	A	0,46		G/A	48,5		
				A/A	22,3		
Контроль	G	0,62		G/G	41,1	p=0,53	
	A	0,38		G/A	42,2		
				A/A	16,7		
<b>DBH (C-1021T) rs161115</b>							
Соц. сироты	C	0,66	$\chi^2=0,01$ df=1 p=0,99	C/C	43,7	p=0,71	$\chi^2=2,11$ df=2 p=0,35
	T	0,34		C/T	45,8		
				T/T	10,5		
Контроль	C	0,67		C/C	40,0	p=0,16	
	T	0,33		C/T	53,3		
				T/T	6,7		
<b>DRD2 (Taq1A) rs1800497</b>							
Соц. сироты	C	0,56	$\chi^2=7,24$ df=1 p=0,007	C/C	35,6	p=0,03	$\chi^2=6,56$ df=2 p=0,04
	T	0,44		C/T	40,7		
				T/T	23,7		
Контроль	C	0,67		C/C	46,7	p=0,68	
	T	0,33		C/T	41,1		
				T/T	12,2		

Примечание: HWE – индекс равновесия Харди-Вайнберга, n – количество обследованных, df – степени свободы,  $\chi^2$  – хи-квадрат Пирсона, p – уровень значимости между исследуемыми группами.

Note: HWE – the Hardy-Weinberg equilibrium index, n – the number of examined, df – the degrees of freedom,  $\chi^2$  – Pearson's chi-square, p – the significance level between the studied groups.

Для более точного выявления ассоциаций полиморфных вариантов генов *TPH1*, *MAOA*, *HTR2A*, *DRD4*, *COMT*, *DBH*, *DRD2* с психическими расстройствами, основная группа была разделана по ведущей симптоматике на подгруппы: 167 детей-сирот с интеллектуальными (F06, F83) и 128 детей с поведенческими нарушениями (F90, F91, F92), после чего

было проведено сравнение частот аллелей и генотипов этих подгрупп с детьми из полных семей, не имеющих психических расстройств (n=90). Сравнение частот генотипов детей-сирот с интеллектуальными нарушениями и контроля не выявило статистически значимых отличий (Табл. 3).

Таблица 3 (начало)

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с интеллектуальными нарушениями (n=167) и контроля (n=90)**

Beginning of Table 3

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with intellectual disabilities (n=167) and control (n=90)**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
<b><i>TPH1(A218C) rs1800532</i></b>							
Соц. сироты	A	0,37	$\chi^2=0,98$ df=1 p=0,32	A/A	11,4	p=0,24	$\chi^2=3,84$ df=2 p=0,15
	C	0,63		C/A	52,7		
				C/C	35,9		
Контроль	A	0,33		A/A	13,3	p=0,51	
	C	0,67		C/A	40,0		
				C/C	46,7		
<b><i>MAOA (R297R) rs6323</i></b>							
Соц. сироты	A	0,64	$\chi^2=0,23$ df=1 p=0,63	A/A	49,1	p=0,002	$\chi^2=10,79$ df=2 p=0,005
	C	0,36		C/A	30,5		
				C/C	20,4		
Контроль	A	0,62		A/A	36,7	p=0,52	
	C	0,38		C/A	51,1		
				C/C	12,2		
<b><i>HTR2A (T102C) rs6313</i></b>							
Соц. сироты	C	0,64	$\chi^2=0,08$ df=1 p=0,78	C/C	44,3	p=0,11	$\chi^2=4,05$ df=2 p=0,13
	T	0,36		C/T	38,3		
				T/T	17,4		
Контроль	C	0,62		C/C	36,7	p=0,52	
	T	0,38		C/T	51,1		
				T/T	12,2		
<b><i>DRD4 (C-521T) rs1800955</i></b>							
Соц. сироты	C	0,54	$\chi^2=1,17$ df=1 p=0,28	C/C	29,9	p=0,78	$\chi^2=1,45$ df=2 p=0,48
	T	0,46		T/C	47,9		
				T/T	22,2		
Контроль	C	0,48		C/C	26,7	p=0,5	
	T	0,52		T/C	44,4		
				T/T	28,9		
<b><i>COMT (G472A) rs4680</i></b>							
Соц. сироты	G	0,56	$\chi^2=1,87$ df=1 p=0,17	G/G	29,2	p=0,29	$\chi^2=1,68$ df=2 p=0,43
	A	0,44		G/A	48,5		
				A/A	22,3		
Контроль	G	0,62		G/G	41,1	p=0,53	
	A	0,38		G/A	42,2		
				A/A	16,7		
<b><i>DBH (C-1021T) rs161115</i></b>							
Соц. сироты	C	0,66	$\chi^2=0,06$ df=1 p=0,8	C/C	41,3	p=0,46	$\chi^2=1,10$ df=2 p=0,58
	T	0,34		C/T	48,5		
				T/T	10,2		

Таблица 3 (окончание)

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с интеллектуальными нарушениями (n=167) и контроля (n=90)**

End of Table 3

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with intellectual disabilities (n=167) and control (n=90)**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
Контроль	C	0,67		C/C	40,0	p=0,16	
	T	0,33		C/T	53,3		
				T/T	6,7		
<b>DRD2 (Taq1A) rs1800497</b>							
Соц. сироты	C	0,58	$\chi^2=4,12$ df=1 p=0,04	C/C	39,5	p=0,03	$\chi^2=4,68$ df=2 p=0,1
	T	0,42		C/T	37,1		
				T/T	23,4		
Контроль	C	0,67		C/C	46,7	p=0,68	
	T	0,33		C/T	41,1		
				T/T	12,2		

Примечание: HWE – индекс равновесия Харди-Вайнберга, n – количество обследованных, df – степени свободы,  $\chi^2$  – хи-квадрат Пирсона, p – уровень значимости между исследуемыми группами.

Note: HWE – the Hardy-Weinberg equilibrium index, n – the number of examined, df – the degrees of freedom,  $\chi^2$  – Pearson's chi-square, p – the significance level between the studied groups.

Однако при сравнительном анализе частот генотипов по полиморфным вариантам генов между группой детей-сирот с поведенческими нарушениями и контроля был выявлен ряд различий. Так

значимое отличие частот генотипов показали полиморфизмы следующих генов: rs1800532 *TPH1(A218C)*, rs4680 *COMT(G472A)* и rs1800497 *DRD2 (Taq1A)* (Табл. 4).

Таблица 4 (начало)

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с поведенческими нарушениями (n=128) и контроля (n=90)**

Beginning of Table 4

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with behavioral disorders (n=128) and control (n=90)**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
<b>TPH1(A218C) rs1800532</b>							
Соц. сироты	A	0,46	$\chi^2=7,55$ df=1 p=0,006	A/A	18,8	p=0,34	$\chi^2=10,22$ df=2 p=0,006
	C	0,54		C/A	55,5		
				C/C	25,7		
Контроль	A	0,33		A/A	13,3	p=0,51	
	C	0,67		C/A	40,0		
				C/C	46,7		
<b>MAOA (R297R) rs6323</b>							
Соц. сироты	A	0,62	$\chi^2=0,01$ df=1 p=0,98	A/A	41,4	p=0,32	$\chi^2=2,26$ df=2 p=0,32
	C	0,38		C/A	41,4		
				C/C	17,2		
Контроль	A	0,62		A/A	36,7	p=0,52	
	C	0,38		C/A	51,1		
				C/C	12,2		
<b>HTR2A (T102C) rs6313</b>							
Соц. сироты	C	0,63	$\chi^2=0,05$ df=1 p=0,82	C/C	43,8	p=0,2	$\chi^2=3,35$ df=2 p=0,2
	T	0,37		C/T	39,0		
				T/T	17,2		

Таблица 4 (окончание)

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с поведенческими нарушениями (n=128) и контроля (n=90)**

End of Table 4

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with behavioral disorders (n=128) and control (n=90)**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
Контроль	C	0,62		C/C	36,7	p=0,52	
	T	0,38		C/T	51,1		
				T/T	12,2		
<b>DRD4 (C-521T) rs1800955</b>							
Соц. сироты	C	0,47	$\chi^2=0,11$ df=1 p=0,74	C/C	24,2	p=0,57	$\chi^2=0,17$ df=2 p=0,92
	T	0,53		T/C	46,1		
				T/T	29,7		
Контроль	C	0,48		C/C	26,7	p=0,5	
	T	0,52		T/C	44,4		
				T/T	28,9		
<b>COMT (G472A) rs4680</b>							
Соц. сироты	G	0,50	$\chi^2=6,38$ df=1 p=0,01	G/G	22,7	p=0,45	$\chi^2=8,54$ df=2 p=0,01
	A	0,50		G/A	54,6		
				A/A	22,7		
Контроль	G	0,62		G/G	41,1	p=0,53	
	A	0,38		G/A	42,2		
				A/A	16,7		
<b>DBH (C-1021T) rs161115</b>							
Соц. сироты	C	0,68	$\chi^2=0,08$ df=1 p=0,78	C/C	46,9	p=0,77	$\chi^2=3,02$ df=2 p=0,22
	T	0,32		C/T	42,2		
				T/T	10,9		
Контроль	C	0,67		C/C	40,0	p=0,16	
	T	0,33		C/T	53,3		
				T/T	6,7		
<b>DRD2 (Taq1A) rs1800497</b>							
Соц. сироты	C	0,53	$\chi^2=8,68$ df=1 p=0,003	C/C	30,5	p=0,45	$\chi^2=7,89$ df=2 p=0,02
	T	0,47		C/T	45,3		
				T/T	24,2		
Контроль	C	0,67		C/C	46,7	p=0,68	
	T	0,33		C/T	41,1		
				T/T	12,2		

Примечание: HWE – индекс равновесия Харди-Вайнберга, n – количество обследованных, df – степени свободы,  $\chi^2$  – хи-квадрат Пирсона, p – уровень значимости между исследуемыми группами.

Note: HWE – the Hardy-Weinberg equilibrium index, n – the number of examined, df – the degrees of freedom,  $\chi^2$  – Pearson's chi-square, p – the significance level between the studied groups.

При анализе rs1800532 гена *TPH1(A218C)* было выявлено, что в группе сирот с поведенческими нарушениями частота встречаемости генотипа A/A была выше на 5,5%, чем в контрольной. Частота генотипа C/C была выше в группе детей из полных семей практически в два раза ( $p=0,006$ ). Статистически значимые различия в частоте генотипов выявлены у rs4680 гена *COMT (G472A)*: так, в контрольной группе здоровых детей

генотип G/G встречался чаще на 18,4%, а у детей-сирот с поведенческими нарушениями частота встречаемости генотипа A/A была выше на 6,0% ( $p=0,01$ ). В основной клинической группе генотип T/T полиморфного маркера rs1800497 гена *DRD2 (Taq1A)* встречался чаще на 12,0%, а частота генотипа C/C была ниже на 16,2% по сравнению с группой контроля ( $p=0,02$ ).

Аллели и генотипы генов, соответствующие равновесию Харди-

Вайнберга и имеющие значимые отличия, далее были проанализированы с

применением мультипликативной модели наследования (Табл. 5).

Таблица 5

**Встречаемость ОНП в группе детей-сирот с поведенческими нарушениями и группе контроля (df=1)**

Table 5

**Occurrence of SNP in the group of orphans with behavioral disorders and the control group (df=1)**

Аллель	Частота аллели		Хи-квадрат Пирсона	Статистическая значимость	OR 95% CI
	Соц. сироты (n=128)	Контроль (n=90)			
<i>TPH1(A218C) rs1800532</i>					
A	0,46	0,33	$\chi^2=7,55$	$p=0,006$	1,74 [1,17 – 2,58]
C	0,54	0,67			0,58 [0,39 – 0,85]
<i>COMT (G472A) rs4680</i>					
G	0,50	0,62	$\chi^2=6,38$	$p=0,01$	0,61 [0,41 – 0,90]
A	0,50	0,38			1,65 [1,12 – 2,43]
<i>DRD2 (Taq1A) rs1800497</i>					
C	0,53	0,67	$\chi^2=8,68$	$p=0,003$	0,55 [0,37 – 0,82]
T	0,47	0,33			1,81 [1,22 – 2,69]

Примечание:  $n$  – количество обследованных,  $df$  – степени свободы,  $\chi^2$  – хи-квадрат Пирсона,  $OR$  (*oddsratio*) – отношение шансов, 95 %  $CI$  – 95 % доверительный интервал отношения шансов,  $p$  – уровень значимости между исследуемыми группами.

Note:  $n$  – the number of examined,  $df$  – the degrees of freedom,  $\chi^2$  – Pearson's chi-square,  $OR$  (*oddsratio*) – the oddsratio, 95%  $CI$  – the 95% confidence interval of the oddsratio,  $p$  – the significance level between the studied groups.

Частота аллеля А полиморфного маркера rs1800532 гена *TPH1(A218C)* была выше в группе социальных сирот с поведенческими нарушениями, чем в контрольной группе. Аллель С встречался чаще у детей из полных семей ( $p=0,006$ ). Результаты научных исследований показывают, что ген *TPH1* кодирует триптофангидроксилазу 1, которая играет ключевую роль в регуляции синтеза серотонина, в тоже время полиморфный маркер rs1800532 гена *TPH1(A218C)* может менять экспрессию гена *TPH1* [13]. Известно, что у носителей аллеля А имеется повышение синтеза фермента триптофангидроксилазы [25, 26], что может быть связано со склонностью к гиперактивности, повышенной тревожности и суицидальности [25, 27]. В связи с этим, полученные данные подтверждают, что полиморфный маркер

rs1800532 гена *TPH1(A218C)* может быть связан с развитием эмоционально-поведенческих нарушений.

Ген *COMT* отвечает за активность фермента катехол-О-метилтрансферазы, который в свою очередь принимает участие в процессе деградации дофамина. Установлено, что аллель А снижает функциональную активность фермента и, таким образом, у носителей с мутацией А/А уровень дофамина выше, чем у людей с «условно нормальным» генотипом G/G [28]. В связи с чем, исследователи ассоциируют наличие мутантного аллеля А и генотипа А/А гена *COMT* со склонностью к гетероагрессии и криминальному поведению [29, 30], с предрасположенностью к алкоголизации [31] и паническим расстройствам [32]. Согласно проведенному исследованию, частота аллеля А полиморфного варианта

rs4680 гена *COMT* (G472A) была выше у социальных сирот, имеющих поведенческие психические расстройства, тогда как G-аллель чаще встречался в группе здоровых детей ( $p=0,01$ ).

Были также обнаружены отличия в частотах аллелей гена rs1800497 *DRD2* (*Taq1A*). Аллель T гораздо чаще встречался у детей-сирот с поведенческими нарушениями, чем у контрольной группы, где доминировал аллель C ( $p=0,003$ ). Ряд исследований доказывают связь генетического полиморфизма дофаминового рецептора второго типа *DRD2*, а именно наличие T-аллеля с патологическим агрессивным поведением [33], повышенной суицидальности и алкоголизации [34].

Далее был проведен сравнительный анализ частот генотипов по полиморфным вариантам генов между группой социальных сирот с наркологическими расстройствами (употребление алкоголя с вредными последствиями – F10.1) ( $n=81$ ) и

группой детей из полных семей, не имеющих данных расстройств ( $n=100$ ). Статистически значимые различия частот генотипов были обнаружены только для гена *TPH1*(A218C) ( $p=0,03$ ) (Табл. 6). При применении мультипликативной модели наследования выявлено, что частота аллеля А полиморфного маркера rs1800532 гена *TPH1*(A218C) была выше у детей-сирот с алкогольными расстройствами (0,43), чем в контрольной группе (0,32), отношение шансов составило 1,62 [95% CI: 1,05-2,49]. При этом аллель С встречался чаще у детей из полных семей (0,68), чем у социальных сирот (0,57), что может также свидетельствовать о его протективной роли в развитии наркологической патологии (OR=0,62 [95% CI: 0,40-0,95],  $p=0,03$ ). Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что наличие аллеля А гена *TPH1*(A218C) может быть связано не только с эмоционально-поведенческими нарушениями, но и являться также предиктором алкогольных расстройств.

Таблица 6 (начало)

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с наркологическими расстройствами ( $n=81$ ) и контроля ( $n=100$ )**

Beginning of Table 6

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with narcological disorders ( $n=81$ ) and control ( $n=100$ )**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
<b><i>TPH1</i>(A218C) rs1800532</b>							
Соц. сироты	A	0,43	$\chi^2=4,82$ df=1 p=0,03	A/A	14,8	p=0,33	$\chi^2=7,31$ df=2 p=0,03
	C	0,57		C/A	56,8		
Контроль	A	0,32		A/A	12,0		
	C	0,68		C/A	40,0		
	C/C	48,0					
<b><i>MAOA</i> (R297R) rs6323</b>							
Соц. сироты	A	0,62	$\chi^2=0,07$ df=1 p=0,79	A/A	45,7	p=0,02	$\chi^2=10,32$ df=2 p=0,006
	C	0,38		C/A	30,8		
	Контроль	A		0,63	A/A		
C		0,37		C/A	53,0		
C/C		11,0					
<b><i>HTR2A</i> (T102C) rs613</b>							
Соц. сироты	C	0,63	$\chi^2=0,02$ df=1 p=0,9	C/C	42,0	p=0,36	$\chi^2=1,88$ df=2 p=0,39
	T	0,37		C/T	40,7		
	Контроль	C		0,63	T/T		
T		0,37		C/C	38,0		
C/T		50,0					
					T/T	12,0	

Beginning of Таблица 6

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов в группах детей-сирот с наркологическими расстройствами (n=81) и контроля (n=100)**

End of Table 6

**Distribution of frequencies of genotypes and alleles of polymorphic gene variants in groups of orphans with narcological disorders (n=81) and control (n=100)**

Группа	Аллель	Частота аллели, p	$\chi^2$ , df, p	Генотип	Частота генотипа, %	HWE, p	$\chi^2$ , df, p
<b>DRD4 (C-521T) rs1800955</b>							
Соц. сироты	C	0,52	$\chi^2=0,01$ df=1 p=0,95	C/C	27,1	p=1	$\chi^2=0,74$ df=2 p=0,69
	T	0,48		T/C	49,4		
				T/T	23,5		
Контроль	C	0,52		C/C	30,0	p=0,35	
	T	0,48		T/C	43,0		
				T/T	27,0		
<b>COMT (G472A) rs4680</b>							
Соц. сироты	G	0,52	$\chi^2=4,16$ df=1 p=0,04	G/G	25,9	p=0,75	$\chi^2=4,35$ df=2 p=0,11
	A	0,48		G/A	51,9		
				A/A	22,2		
Контроль	G	0,62		G/G	40,0	p=0,76	
	A	0,38		G/A	45,0		
				A/A	15,0		
<b>DBH (C-1021T) rs1611115</b>							
Соц. сироты	C	0,71	$\chi^2=1,03$ df=1 p=0,31	C/C	49,4	p=0,7	$\chi^2=2,18$ df=2 p=0,34
	T	0,29		C/T	43,2		
				T/T	7,4		
Контроль	C	0,66		C/C	39,0	p=0,12	
	T	0,34		C/T	54,0		
				T/T	7,0		
<b>DRD2 (Taq1A) rs1800497</b>							
Соц. сироты	C	0,59	$\chi^2=4,19$ df=1 p=0,04	C/C	39,5	p=0,19	$\chi^2=4,45$ df=2 p=0,11
	T	0,41		C/T	38,3		
				T/T	22,2		
Контроль	C	0,69		C/C	49,0	p=0,69	
	T	0,31		C/T	40,0		
				T/T	11,0		

Примечание: HWE – индекс равновесия Харди-Вайнберга, n – количество обследованных, df – степени свободы,  $\chi^2$  – хи-квадрат Пирсона, p – уровень значимости между исследуемыми группами.

Note: HWE – the Hardy-Weinberg equilibrium index, n – the number of examined, df – the degrees of freedom,  $\chi^2$  – Pearson's chi-square, p – the significance level between the studied groups.

**Заключение.** Таким образом, проведенное исследование полиморфизмов генов нейромедиаторных систем мозга свидетельствует о важной роли полиморфных вариантов генов rs1800532 *TPH1(A218C)*, rs4680 *COMT (G472A)* и rs1800497 *DRD2 (Taq1A)* в развитии психических расстройств у социальных сирот. Наличие указанных полиморфизмов сопровождается повышением риска возникновения поведенческих психических нарушений в 1,65 и более раз.

Значимость полученных результатов исследования продиктована не только установлением генетических полиморфизмов в качестве предикторов развития психических заболеваний, но и оценкой риска развития отдельных нозологических единиц в зависимости от конкретного полиморфного маркера гена, что в дальнейшем будет иметь место в разработке дифференцированной психопрофилактики и лечения эмоционально-поведенческих психических нарушений.

## 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. Егорова ПЛ, Портнова АА. Состояние психического здоровья детей-сирот и детей, оставшихся без попечения родителей. Психическое здоровье. 2015;8(111):59-63.
2. Кремнева ЛФ, Проселкова МО, Козловская ГВ, и др. К вопросу об этиологии синдрома сиротства. Социальная и клиническая психиатрия. 2017;1:20-25.
3. Ахметова ВВ, Тарасова ТП, Говорин НВ. Эмоциональные и волевые нарушения в условиях материнской депривации: монография. Казань: Бук; 2020.
4. Ветошкина СА. Особенности эмоциональной сферы у детей-сирот. Современная зарубежная психология. 2015;4(1):15-25.
5. Бобров АЕ, Решетников ММ, Уласень ТВ. Зависимость девиантных форм поведения у воспитанников социозащитных учреждений от характера перенесенного ими травматического опыта. Вестник психотерапии. 2018;68(73):68-82.
6. Пережогин ЛО. Систематика и коррекция психических расстройств у несовершеннолетних правонарушителей и безнадзорных: монография. М.: ФГНУ «ЦПВиСППДМ»; 2010.
7. Крючкова АС, Ермаков ПН, Абакумова ИВ. Анализ ассоциаций полморфизма гена MAOA с агрессивными и враждебными стратегиями в поведении у подростков и молодых людей. Российский психологический журнал. 2016;13(1):115-124. DOI: <https://doi.org/10.21702/rpj.2016.1.10>
8. Черепкова ЕВ, Гуревич КГ, Горбатенко АЕ. Связь психических расстройств с полморфизмом некоторых генов нейромедиаторной системы у лиц с антисоциальным поведением. В: Гулин АИ, редактор. Современная медицина: актуальные вопросы. Сборник статей по материалам XXXII международной научно-практической конференции. 6(32). Новосибирск: СибАК; 2014:26-34.
9. Nilsson KW, Aslund C, Comasco E, et al. Gene-environment interaction of monoamine oxidase A in relation to antisocial behaviour: current and future directions. Journal of Neural Transmission. 2018;125(11):1601-1626. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1892-2>
10. Алфимова МВ. Личностные черты, управляющие функции и генетические особенности метаболизма моноаминов. Психология. Журнал Высшей школы экономики. 2009;6(4):24-41. DOI: <https://doi.org/10.17323/1813-8918-2009-4-24-41>
11. Барский ВИ, Аксенова МГ, Козлова ОБ, и др. Анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов дофаминергической (DRD2/ANKK1) и серотонинергической (HTR2A) систем мозга с личностными характеристиками подростков. Экологическая генетика. 2010;8(2):9-17.
12. Васильев ВА. Молекулярная психогенетика: исследования девиантного агрессивного поведения человека. Генетика. 2011;47(9):1157-1168.
13. Левчук ЛА, Шмиголь МВ, Иванова СА. Серотонинергическая система в патогенезе и терапии депрессивных расстройств. Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2012;2(71):75-79.
14. Byrd A, Manuck S, Hawes S, et al. The interaction between monoamine oxidase A (MAOA) and childhood maltreatment as a predictor of personality pathology in females: Emotional reactivity as a potential mediating mechanism. Development and Psychopathology. 2019;3(1):361-377. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954579417001900>
15. Auerbach JG, Faroy M, Ebstein R, et al. The association of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) and the serotonin transporter promoter gene (5-HTTLPR) with temperament in 12-month-old infants. Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines. 2001;42(6):777-783. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021963001007612>
16. Brookes K, Xu X, Chen W, et al. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes.

Molecular Psychiatry. 2006;11(12):934-953. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001869>

17.Кибитов АО, Воскобоева ЕЮ, Чупрова НА. Полиморфные варианты 444 G/A и -1021 C/T гена дофамин-β-гидроксилазы (DBH) изменяют траекторию развития зависимости от алкоголя. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015;115(5):68-75. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro20151155168-75>

18.Moffitt TE, Caspi A. Bias in a protocol for a meta-analysis of 5-HTTLPR, stress, and depression. BMC Psychiatry. 2014;14:179. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-244X-14-179>

19.Gokturk C, Schultze S, Nilsson KW, et al. Serotonin transporter (5-HTTLPR) and monoamine oxidase (MAOA) promoter polymorphisms in women with severe alcoholism. Archives of Women's Mental Health. 2008;11:347-355. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00737-008-0033-6>

20.Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, et al. MAOA, maltreatment, and geneenvironment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. Molecular Psychiatry. 2006;11:903-913. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001851>

21.Гареева АЭ, Казанцева АВ, Куличкин СС, и др. Анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов фермента моноаминоксидазы с риском развития хронического алкоголизма в Республике Саха (Якутия). Наркология. 2011;6(114):66-75.

22.Егорова МС, Черткова ЮД. Полиморфизм гена моноаминоксидазы (MAOA) и вариативность психологических черт. Психологические исследования. 2011;6(20):12-14. DOI: <https://doi.org/10.54359/ps.v4i20.807>

23.Li JJ. Assessing the interplay between multigenic and environmental influences on adolescent to adult pathways of antisocial behaviors. Development and Psychopathology. 2017;29(5):1947-1967. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954579417001511>

24.Мудров ВА. Алгоритмы статистического анализа данных биомедицинских исследований с помощью пакета программ SPSS (доступным языком). М.: Логосфера; 2022.

25.Давыдова ЮД, Гумерова ОВ. Использование молекулярных и биоинформатических подходов для изучения влияния серотониновой системы на уровень

тревожности у студентов. Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. 2016;3(39):146-152.

26.Ono H, Shirakawa O, Kitamura N, et al. Tryptophan hydroxylase immunoreactivity is altered by the genetic variation in postmortem brain samples of both suicide victims and controls. Molecular Psychiatry. 2002;7:1127-1132. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001150>

27.Москалева ПВ, Шнайдер НА, Дмитренко ДВ. и др. Ассоциация полиморфизма генов TRH1 и TRH2 с риском развития психоневрологических расстройств. Успехи физиологических наук. 2021;52(2):51-60. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0301179821020077>

28.Cusin C, Serretti A, Lattuada E, et al. Association study of MAO-A, COMT, 5-HT2A, DRD2, and DRD4 polymorphisms with illness time course in mood disorders. American Journal of Medical Genetics, Part A. 2002;114(4):380-390. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.10358>

29.Ковш ЕМ, Ермаков ПН, Воробьева ЕВ. Ассоциация полиморфного маркера VAL158MET гена COMT с уровнем агрессивности и стратегиями поведения в конфликте у девушек 18-24 лет. Северокавказский психологический вестник. 2015;13(3):15-21.

30.Vetulani J. Neurochemistry of impulsiveness and aggression. Psychiatria Polska. 2013;1:103-113.

31.Soyka M. Val158Met COMT polymorphism and risk of aggression in alcohol dependence. Addiction Biology. 2015;20(1):197-204. DOI: <https://doi.org/10.1111/adb.12098>

32.Kim SJ, Kim CH. The genetic studies of obsessive-compulsive disorder and its future directions. Yonsei Medical Journal. 2006;47(4):443-454.

33.Zai CC, Ehtesham S, Choi E, et al. Dopaminergic system genes in childhood aggression: Possible role for DRD2. World Journal of Biological Psychiatry. 2012;13(1):65-74. DOI: <https://doi.org/10.3109/15622975.2010.543431>

34.Сидорова ЕЮ, Ахметова ЭА, Ашуров ЗШ. и др. Генетические ассоциации полиморфных вариантов генов MTNR1A (rs34532313), MTNR1B (rs10830963), CLOCK (rs1801260), DRD2 (rs1800497) с формами суицидального поведения у пациентов с алкогольной зависимостью. Академический журнал Западной Сибири. 2022;18(1):23-29.

DOI: [https://doi.org/10.32878/sibir.22-18-01\(94\)-23-29](https://doi.org/10.32878/sibir.22-18-01(94)-23-29)

### References

1. Egorova PL, Portnova AA. Mental health orphans and children, remaining without the care of parents. *Mental health*. 2015;8(111):59-63. Russian.
2. Kremneva LF, Proselkova MO, Kozlovskaya GV, et al. On etiology of the orphanage syndrome. *Social and clinical psychiatry*. 2017;27(1):20-25. Russian.
3. Akhmetova VV, Tarasova TP, Govorin NV. Emotional and volitional disorders in conditions of maternal deprivation: monograph. Kazan: Buk; 2020. Russian.
4. Vetoshkina SA. Peculiarities of emotional sphere in orphans: analysis through projective drawing tests. *Journal of Modern Foreign Psychology*. 2015;4(1):15-25. Russian.
5. Bobrov AE, Reshetnikov MM, Ulasen TV. Dependence of deviant forms of behavior in pupils of social protection institutions from the character of the injury carefully expected by their traumatic experience. *The Bulletin of Psychotherapy*. 2018;68(73):68-82. Russian.
6. Perezhugin LO. Systematics and correction of mental disorders in juvenile delinquents and street children: monograph. Moscow: FGNU «TsPViSPPDM»; 2010. Russian.
7. Kryuchkova AS, Ermakov PN, Abakumova IV. Analysis of associations of polymorphism of the MAOA gene with aggressive and hostile strategies in behavior in adolescents and young people. *Russian Psychological Journal*. 2016;13(1):115-124. Russian. DOI: <https://doi.org/10.21702/rpj.2016.1.10>
8. Cherepkova EV, Gurevich KG, Gorbatenko AE. The relationship of mental disorders with polymorphism of some genes of the neurotransmitter system in persons with antisocial behavior. In: Gulina AI, editor. *Modern medicine: topical issues. Proceedings of the XXXII international scientific-practical conference*. 6(32). Novosibirsk: SibAC; 2014:26-34. Russian.
9. Nilsson KW, Aslund C, Comasco E, et al. Gene-environment interaction of monoamine oxidase A in relation to antisocial behaviour: current and future directions. *Journal of Neural Transmission*. 2018;125(11):1601-1626. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1892-2>
10. Alfimova MV. Personality traits, control functions and genetic features of monoamine metabolism. *Psychology. Journal of the Higher School of Economics*. 2009;6(4):24-41. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17323/1813-8918-2009-4-24-41>
11. Barskiy VI, Aksenova MG, Kozlova OB, et al. Analysis of associations of polymorphic markers of dopaminergic (DRD2/ANKK1) and serotonergic (HTR2A) brain systems with personality characteristics of adolescents. *Ecological Genetics*. 2010;8(2):9-17. Russian.
12. Vasilyev VA. Molecular Psychogenetics of Deviant Aggressive Behavior in Humans. *Genetics*. 2011;47(9):1157-1168. Russian.
13. Levchuk LA, Shmigol MV, Ivanova SA. The serotonergic system in the pathogenesis and therapy of depressive disorders. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2012;2(71):75-79. Russian.
14. Byrd A, Manuck S, Hawes S, et al. The interaction between monoamine oxidase A (MAOA) and childhood maltreatment as a predictor of personality pathology in females: Emotional reactivity as a potential mediating mechanism. *Development and Psychopathology*. 2019;3(1):361-377. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954579417001900>
15. Auerbach JG, Faroy M, Ebstein R, et al. The association of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) and the serotonin transporter promoter gene (5-HTTLPR) with temperament in 12-month-old infants. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*. 2001;42(6):777-783. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021963001007612>
16. Brookes K, Xu X, Chen W, et al. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Molecular Psychiatry*. 2006;11(12):934-953. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001869>
17. Kibitov AO, Voskoboeva EI, Chuprova NA. The 444G/A and -1021 C/T polymorphisms of the dopamine-beta-hydroxylase gene modulate the trajectory of alcohol dependence development. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2015;115(5):68-75. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro20151155168-75>
18. Moffitt TE, Caspi A. Bias in a protocol for a meta-analysis of 5-HTTLPR, stress, and depression. *BMC Psychiatry*. 2014;14:179. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-244X-14-179>
19. Gokturk C, Schultze S, Nilsson KW, et al. Serotonin transporter (5-HTTLPR) and monoamine oxidase (MAOA) promoter polymorphisms in women with severe alcoholism.

Archives of Women's Mental Health. 2008;11:347-355. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00737-008-0033-6>

20. Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, et al. MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Molecular Psychiatry*. 2006;11:903-913. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001851>

21. Gareeva AE, Kazantseva AV, Kulichkin SS, et al. Analysis of associations of polymorphic markers of monoamine oxidase enzyme genes with the risk of developing chronic alcoholism in the Republic of Sakha (Yakutia). *Narcology*. 2011;6(114):66-75. Russian.

22. Egorova MS, Chertkova YuD. Polymorphism of the monoamine oxidase (MAOA) gene and variability of psychological traits. *Psychological Studies*. 2011;6(20):12-14. Russian. DOI: <https://doi.org/10.54359/ps.v4i20.807>

23. Li JJ. Assessing the interplay between multigenic and environmental influences on adolescent to adult pathways of antisocial behaviors. *Development and Psychopathology*. 2017;29(5):1947-1967. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954579417001511>

24. Mudrov VA. Algorithms for statistical analysis of biomedical research data using the SPSS software package (in an accessible language). Moscow: Logosfera; 2022. Russian.

25. Davydova YuD, Gumerova OV. Using molecular and bioinformatics approaches to study the influence of the serotonin system on the level of anxiety in students. *Bulletin of the Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla*. 2016;3(39):146-152. Russian.

26. Ono H, Shirakawa O, Kitamura N, et al. Tryptophan hydroxylase immunoreactivity is altered by the genetic variation in postmortem brain samples of both suicide victims and controls. *Molecular Psychiatry*. 2002;7:1127-1132. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001150>

27. Moskaleva PV, Shnayder NA, Dmitrenko DV, et al. Association of polymorphism of TPH1 and TPH2 genes with the risk of neuropsychiatric disorders. *Successes of physiological sciences*. 2021;52(2):51-60. Russian. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0301179821020077>

28. Cusin C, Serretti A, Lattuada E, et al. Association study of MAO-A, COMT, 5-HT2A, DRD2, and DRD4 polymorphisms with illness time course in mood disorders. *American Journal*

of Medical Genetics, Part A. 2002;114(4):380-390. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.10358>

29. Kovsh EM, Ermakov PN, Vorobieva EV. Association of the polymorphic marker VAL158MET of the COMT gene with the level of aggressiveness and strategies of behavior in conflict in girls aged 18-24. *Severo-Kavkazskiy psikhologicheskii vestnik*. 2015;13(3):15-21. Russian.

30. Vetulani J. Neurochemistry of impulsiveness and aggression. *Psychiatria Polska*. 2013;1:103-113.

31. Soyka M. Val158Met COMT polymorphism and risk of aggression in alcohol dependence. *Addiction Biology*. 2015;20(1):197-204. DOI: <https://doi.org/10.1111/adb.12098>

32. Kim SJ, Kim CH. The genetic studies of obsessive-compulsive disorder and its future directions. *Yonsei Medical Journal*. 2006;47(4):443-454.

33. Zai CC, Ehtesham S, Choi E, et al. Dopaminergic system genes in childhood aggression: Possible role for DRD2. *World Journal of Biological Psychiatry*. 2012;13(1):65-74. DOI: <https://doi.org/10.3109/15622975.2010.543431>

34. Sidorova EU, Akhmetova EA, Ashurov ZS, et al. Genetic associations of polymorphic variants of MTNR1A (rs34532313), MTNR1B (rs10830963), CLOCK (rs1801260), DRD2 (rs1800497) genes with forms of suicidal behavior in patients with alcohol dependence. *Academic Journal of Western Siberia*. 2022;18(1):23-29. Russian. DOI: [https://doi.org/10.32878/sibir.22-18-01\(94\)-23-29](https://doi.org/10.32878/sibir.22-18-01(94)-23-29)

Статья поступила в редакцию 28 сентября 2023 г.

Поступила после доработки 26 декабря 2023 г.

Принята к печати 14 января 2024 г.

Received 28 September 2023

Revised 26 December 2023

Accepted 14 January 2024

#### Информация об авторах

**Екатерина Александровна Бодагова**, кандидат медицинских наук, начальник центра психологической поддержки ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита, Российская Федерация, E-mail: [bodagova.ea@yandex.ru](mailto:bodagova.ea@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6097-6652>.

**Николай Васильевич Говорин**, доктор медицинских наук, почетный профессор ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита, Российская Федерация, E-mail: [govorin-nik@yandex.ru](mailto:govorin-nik@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2955-6347>.

**Виктор Андреевич Мудров**, доктор медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета и факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита, Российская Федерация, E-mail: [mudrov\\_victor@mail.ru](mailto:mudrov_victor@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5961-5400>.

#### Information about the authors

**Ekaterina A. Bodagova**, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Centre for Psychological Support, Chita State Medical Academy, Chita, Russia, E-mail: [bodagova.ea@yandex.ru](mailto:bodagova.ea@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6097-6652>.

**Nikolai V. Govorin**, Doct. Sci. (Medicine), Honoured Professor, Chita State Medical Academy, Chita, Russia, E-mail: [govorin-nik@yandex.ru](mailto:govorin-nik@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2955-6347>.

**Victor A. Mudrov**, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Paediatrics and Faculty of Further Professional Education, Chita State Medical Academy, Chita, Russia, E-mail: [mudrov\\_victor@mail.ru](mailto:mudrov_victor@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5961-5400>.