

РОЛЬ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

Шабалдин А.В., Синицкая А.В., Шмулевич С.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Врожденные пороки сердца (ВПС) могут быть последствием иммунных нарушений в системе «мать – эмбрион» и/или конституциональных нарушений в регуляторных системах, в том числе связанных с Toll-like рецепторами (TLR), цитокинами и их рецепторами. Исходя из этого, целью исследования было изучение ассоциации между генами цитокинов и TLR с врожденными пороками сердца у детей.

Обследовано 188 детей с врожденными пороками сердца (основная группа). Выделены отдельные группы ВПС: септальные ВПС – 98 детей, пороки клапанов сердца – 17 детей, тетрада Фалло – 15 детей, коарктация аорты – 10 детей, фетальные дренажи – 32 ребенка, единый желудочек сердца – 9 детей и аномальные дренажи легочных вен – 7 детей. Контрольная группа была сформирована из 103 здоровых детей, сопоставимых с основной группой по возрасту и полу. Отобрано пять генов цитокинов и их рецепторов (*IL6* rs1800796, *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs2229238, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800871, *IL10* rs1800896, *IL10* rs1800872, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525, *TNF* rs1799964), четыре гена Toll-like рецепторов (*TLR*: *TLR1* rs5743611, *TLR1* rs5743551, *TLR2* rs5743708, *TLR2* rs3804099, *TLR4* rs4986791, *TLR4* rs4986790, *TLR6* rs3775073, *TLR6* rs5743810). Использованы базы данных dbSNP, SNPinfo, SNPnexus. Основным методом статистического анализа была пошаговая логистическая регрессия.

Исследование показало, что детерминирование врожденных пороков сердца связано с генами иммунной регуляции. В частности, особое значение имеет миссен-мутация *TLR6* rs5743810, которая была предиктором врожденных пороков клапанов сердца. Формирование врожденных пороков клапанов сердца и коарктации аорты детерминировано межгенными взаимодействиями *TLR2* rs5743708 с *TLR6* rs5743810 и *TLR2* rs5743708 с *TLR6* rs3775073 соответственно. Для врожденных пороков клапанов сердца такими полиморфными участками генов были *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2229238 и *IL8* rs4073, а для коарктации аорты – *IL6R* rs2228145, *IL8* rs4073. Формирование септальных врожденных пороков сердца связано с общим вкладом в детерминирование данной патологии полиморфных вариантов генов *TLR* и цитокинов. Сочетанное влияние на этот процесс имеют миссен-мутация в гене *TLR4* rs4986790 и мутация *TNF* rs1799964, приводящая к повышенному синтезу молекулы TNF α . Вклад взаимодействия генов *TLR* и цитокинов в формирование ВПС в целом незначителен.

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, гены *TLR*, *IL*, *TNF*

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Shabalдин Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvrd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Синицкая, С.А. Шмулевич
«Роль генов цитокинов и Toll-подобных рецепторов
в патогенезе врожденных пороков сердца» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 605-616.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2488

© Шабалдин А.В. и соавт., 2022

For citation:

A.V. Shabalдин, A.V. Sinitskaya, S.A. Shmulevich
“Role of cytokine and Toll-like receptor genes in pathogenesis of inborn
heart disease”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 605-616.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2488

DOI: 10.15789/1563-0625-ROC-2488

ROLE OF CYTOKINE AND TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN PATHOGENESIS OF INBORN HEART DISEASE

Shabal'din A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Sporadic congenital heart disease (CHD) may result from immune disorders in the mother – embryo system and/or constitutional disorders in regulatory systems, including those associated with TLR receptors, cytokines and their receptors. The aim of our study was to investigate associations between cytokine and TLR genes and sporadic congenital heart disease in children.

In the main group, 188 children with sporadic (without family history) congenital heart defects were examined. Separate groups of CHD were identified: septal CHD – 98 children; valvular heart disease – 17 children; Fallot tetralogy – 15 children; aorta coarctation – 10 children; fetal drains – 32 children; single ventricle affection – 9 children, and anomalous drainage of *v. pulmonalis* was diagnosed in 7 children. The control group included 103 age- and sex-matched healthy children. We have determined gene polymorphisms of five genes encoding cytokines and their receptors (*IL6* rs1800796, *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs2229238, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800871, *IL10* rs1800896, *IL10* rs1800872, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525, *TNF* rs1799964), four genes Toll-like receptors (*TLR*: *TLR1* rs5743611, *TLR1* rs5743551, *TLR2* rs5743708, *TLR2* rs3804099, *TLR4* rs4986791, *TLR4* rs4986790, *TLR6* rs3775073, *TLR6* rs5743810). The dbSNP, SNPinfo, SNPnexus databases were used to select and design test systems. Stepwise logistic regression was the main method of statistical analysis.

Clinical diagnosis of congenital heart defects is associated with immune regulatory genes. In particular, the missense mutation *TLR6* rs5743810, which was a predictor of congenital valvular heart disease, is of particular importance. Development of congenital heart valve defects and aortic coarctation is associated with intergenic interactions of *TLR2* rs5743708 with *TLR6* rs5743810, and *TLR2* rs5743708 with *TLR6* rs3775073, respectively. For congenital heart valve defects, such polymorphic regions are as follows: *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2229238, and *IL8* rs4073, for aortic coarctation – *IL6R* rs2228145, *IL8* rs4073. Development of septal congenital heart defects is associated with general contribution of polymorphic variants of the *TLR* genes and cytokines to this pathology. A missense mutation of the *TLR4* rs4986790 gene and a *TNF* rs1799964 mutation leading to increased synthesis of the TNF α molecule, may have a combined effect on this process. In general, contribution of TLR and cytokine genes interactions to the CHD development seems to be not significant.

Keywords: congenital heart diseases, *TLR*, *IL*, *TNF*, gene polymorphisms

Введение

Врожденные пороки сердца (ВПС) являются ведущей нозологией в структуре врожденных пороков и аномалий развития плода [8]. В некоторых регионах России и мира их удельный вес превышает 50% [2]. Особое значение имеет то, что ВПС определяют уровень перинатальной и младенческой смертности в мире, и хирургическое лечение данной патологии может не приводить к полному выздоровлению ребенка [22].

Проблемы, связанные с изучением этиологии и патогенеза ВПС, прежде всего, определяют большую группой отдельных нозологических форм в структуре врожденных пороков и аномалий сердечно-сосудистой системы. В эту группу пороков входят как функционирующие после рождения фетальные дренажи, так и критические ВПС. Хирургическую коррекцию последних необходимо проводить в первые сутки после рождения ребенка. ВПС могут иметь семейную

историю, часть из них можно отнести моногенным заболеваниям, в этиологии которых лежит наследуемая миссенс-мутация, передающаяся из поколения в поколение. Эту группу семейных ВПС активно изучают во всем мире, и значимые мутации, определяющие риск формирования ВПС, описаны в литературе [9, 13].

Другая группа ВПС, отдельно учитываемая в мировых регистрах ВПС, связана с хромосомными заболеваниями, такими как болезнь Дауна, синдром Шершевского–Тернера и другими. Кроме того, существует группа ВПС, при которых обнаруживаются хромосомные транслокации с мало проявленными фенотипическими признаками. Этиология и патогенез этой группы ВПС также активно изучается [11].

В то же время более 80% из всех ВПС приходится на спорадические (без семейной истории) ВПС не связанных с хромосомными заболеваниями/синдромами и с хромосомными транслокациями [4]. Полиморфизм отдельных нозологий

ВПС в этой группе достигает максимума (более 140 отдельных форм). Изучение генетических, социальных, семейных, экологических факторов, ассоциированных с формированием этой группы ВПС в целом и отдельных нозологий в частности, показало, что спорадические ВПС без хромосомных нарушений являются преимущественно мультифакторными заболеваниями. В основе этиологии и патогенеза этих заболеваний лежит взаимовлияние факторов, экзогенного и эндогенного происхождения. С позиции эмбрионального развития в целом и сердечно-сосудистой системы в частности это взаимодействие связано с такими экзогенными, социальными и медицинскими факторами, как экологические поллютанты, курение, алкоголь, инфекционные агенты и прочие; с конституционально обусловленной — иммунохимической активностью в системе «мать — плод» и иммунными гиперреактивностями. Согласно концепции И.Е. Ковалева гомеостаз на всех этапах онтогенеза поддерживается функциональной иммунохимической системой, включающей метаболизм эндо и ксенобиотиков с последующим иммунным ответом на их активные метаболиты [10]. Известные гиперреактивности иммунной системы (по атопическому, цитотоксическому, иммунокомплексному, CD4-ассоциированному и рецепторному типам) могут лежать в основе декомпенсации воспаления в системе «мать — плод», индуцированного как аллоантигенами зародыша, так и эндо и ксенобиотиками.

Исследования роли иммунных нарушений в системе «мать — эмбрион» в детерминировании ВПС были представлены ранее [5]. Изучение особенностей детерминирования иммунных гиперреактивностей, как звена патогенеза ВПС, также началось [21]. В то же время детерминирование иммунной гиперреактивности в системе «мать — плод» может быть связано с однонуклеотидными заменами в генах сигнальных паттернов распознающих рецепторов, а также мессенджеров воспалительного процесса (цитокины, хемокины и другие). С этих позиций представляет интерес не столько поиск отдельных ассоциации между полиморфными участками генов цитокинов и сигнальных паттернов распознающих рецепторов с ВПС, сколько выявление связей между межгенными взаимодействиями, с одной стороны, и ВПС — с другой.

Необходимо отметить, что постулируемый воспалительный процесс в сердечно-сосудистой системе, как основы иммунного звена патогенеза ВПС, может сохраняться в раннем постнатальном периоде за счет генетического детерминирования. Именно этот период, а в дальнейшем — и пренатальный, является временем для максимального

количества хирургических коррекций и лечений ВПС, в том числе с применением различных имплантов биологического и технологического происхождения. Конституционально обусловленная гиперреактивность иммунной системы плода и новорожденного ребенка может быть основой операционных, ранних и отдаленных осложнений. Это требует отдельного изучения.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** — изучить ассоциации между генами цитокинов и сигнальных паттернов распознающих рецепторов с одной стороны и ВПС у детей с другой.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной цели обследовано 188 детей (103 девочки и 85 мальчиков) с ВПС (основная группа), сформированная на базе детского кардиологического отделения ГБУЗ Кузбасский клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша. Диагноз «ВПС» у детей подтвержден с помощью ЭхоКГ и других инструментальных методов. Структура ВПС представлена в таблице 1.

Контрольная группа была сформирована из 103 здоровых детей (52 девочки и 51 мальчик). Группа была сформирована на клинических базах ГБОУ ВО Кемеровского государственного медицинского университета. Все участники исследования подписывали информированное согласие на участие. Средний возраст детей основной группы — $3,9 \pm 2,3$, контрольной — $4,7 \pm 1,8$.

Сбор крови проводили из локтевой вены в пробирку, содержащую K_3 ЭДТА. Выделение ДНК проводили стандартной фенол-хлороформной экстракцией согласно протоколу. Качество и количество выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-2000C (ThermoFisher, США).

Генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Viia7 (Applied Biosystems, США) с использованием Taqman зондов. Для исследования выбрано пять генов цитокинов и их рецепторов (*IL6* rs1800796, *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs2229238, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800871, *IL10* rs1800896, *IL10* rs1800872, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525, *TNF* rs1799964), четыре гена Toll-like рецепторов (*TLR*: *TLR1* rs5743611, *TLR1* rs5743551, *TLR2* rs5743708, *TLR2* rs3804099, *TLR4* rs4986791, *TLR4* rs4986790, *TLR6* rs3775073, *TLR6* rs5743810). Для отбора полиморфизмов использовались базы данных dbSNP, SNPinfo, SNPnexus.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Statistica 10.0 и MedCalc 17.5.3. Анализ соблюдения закона Харди–Вайнберга проводили при помощи про-

ТАБЛИЦА 1. НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СПОРАДИЧЕСКИХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ

TABLE 1. NOSOLOGICAL FORMS OF SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS IN CHILDREN OF THE MAIN GROUP

Нозология Nosology	Абс. (%) Abs. (%)	В группе, абс. (%) In group, abs. (%)
Септальные пороки сердца Septal heart defects		
Дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) Ventricular septal defect (VSD)	28 (14,89)	98 (52,13)
Дефект межпредсердной перегородки (ДМПП) Atrial septal defect (ASD)	64 (34,04)	
ДМЖП и ДМПП VSD + ASD	6 (3,19)	
Пороки клапанов сердца Valvular heart disease		
Стеноз аортального клапана Aortic valve stenosis	5 (2,66)	17 (9,04)
Двустворчатый атриовентрикулярный клапан Bicuspid atrioventricular valve	3 (1,60)	
Стеноз клапана легочной артерии Pulmonary valve stenosis	8 (4,26)	
Дисплазия трикуспидального клапана Tricuspid valve dysplasia	1 (0,53)	
Отдельные нозологии Separate nosologies		
Тетрада Фалло Tetralogy of Fallot	15 (7,98)	15 (7,98)
Единый желудочек сердца Single ventricle heart defects	9 (4,79)	9 (4,79)
Коарктация аорты Coarctation of the aorta	10 (5,32)	10 (5,32)
Открытый артериальный проток Patent ductus arteriosus	32 (17,02)	32 (17,02)
Тотальный anomальный дренаж легочных вен Total anomalous pulmonary venous return	3 (1,60)	3 (1,60)
Частичный anomальный дренаж легочных вен Partial anomalous pulmonary venous drainage	4 (2,13)	4 (2,13)

граммы SNPstats. Для поиска сочетанных предикторов ВПС в генах цитокинов и сигнальных паттерн распознающих рецепторов была использована логистическая пошаговая регрессия (статистический метод классификации с использованием линейного дискриминанта Фишера). Зависимой переменной были случаи отсутствия (0 баллов) или наличия (1 балл) ВПС, а независимыми – баллы, присвоенные генотипам исследуемых полиморфных сайтов генов цитокинов,

их рецепторов, а также сигнальных паттернов распознающих рецепторов. Так, гомозиготный минорный генотип имел 3 балла, гетерозиготный генотип – 2 балла и гомозиготный мажорный генотип – 1 балл. Т. е. чем реже встречается генотип, тем выше его балл. Коэффициенты, полученные для выявленных значимых предикторов, указывали на степень ассоциации генотипа с ВПС. Знак (- или +) перед переменной указывает на положительную или отрицательную связь.

Положительная связь показывала, что генотип является предиктором ВПС; а отрицательная – на ее протективность. В то же время полученная при этом анализе логистическая функция с весовыми коэффициентами для каждого предиктора отражает взаимодействие и интегральное влияние сочетанных генотипов в реализации эффекта. Эффективность логистической функции оценивалась по показателю площади под кривой (AUC) из ROC-анализа ставшего, фактически, стандартом для оценки качества бинарной классификации. Поиск логистических функций выполнен как для ВПС в целом, так и для отдельных групп (септальные ВПС, пороки клапанов сердца) и нозологий. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [3].

Результаты

Распределение всех частот генотипов в основной и контрольной группах соответствовало распределению Харди–Вайнберга.

Логистическая регрессия для зависимого фактора наличие или отсутствие ВПС без разделения их на отдельные нозологии показала наличие значимой отрицательной ассоциации между бинарным зависимым фактором и полиморфным вариантом гена *TLR2* rs5743708 (табл. 2). Кроме того, свободный член логистической регрессии, сдвигая оси координат, усиливает логистическую функцию и значимо увеличивает суммарное влияние независимых переменных на бинарный показатель. В данном случае, вполне вероятно, что совместное влияние генотипов *TLR2* rs5743708, *TLR1* rs5743551, *IL6R* rs2229238, *TNF* rs1799964 и *IL6* rs2069827 могут детерминировать ВПС без

разделения их на нозологии. Для проверки этого предположения проведен ROC-анализ, в котором была оценена эффективность логистической функции, результаты представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, полученная площадь под кривой (показатель AUC) значимо не отличалась от равномерного распределения ($p = 0,227$). Таким образом, можно сделать вывод, что влияние исследуемых полиморфных вариантов генов, при совместном их эффекте, существенно не влияет на формирование ВПС без разделения их на нозологии.

По аналогии был проведен математический анализ для септальных ВПС, для пороков клапанов сердца, для отдельных нозологических форм, в том числе для пороков, связанных с фетальными дренажами (ОАП).

Значимых предикторов и эффективности логистической функции не получено для следующих нозологических форм: тетрада Фалло, открытый артериальный проток, единый желудочек сердца, аномальный дренаж легочных вен. Соответственно, данные пороки с малой долей вероятности детерминируются генами цитокинов и сигнальных паттернов распознающих рецепторов. В то же время для врожденных пороков клапанов сердца были выявлены ассоциации с полиморфными вариантами генов цитокинов и Toll-like рецепторов (табл. 3).

Как видно из таблицы 3, положительно ассоциированными с формированием клапанных врожденных пороков сердца были полиморфные варианты генов *TLR6* rs5743810 и *IL6* rs2069827. В данном случае минорные (мутантные) генотипы данных полиморфизмов могут детерминировать

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ СЕРДЦА БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ НА НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ

TABLE 2. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT DIVISION INTO NOSOLOGICAL FORMS

Аналиты Analytes	β	Стандартная ошибка β Standard Error β	B	Стандартная ошибка B Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			0,709	0,180	0,000*
<i>TLR2</i> rs5743708	-0,118	0,059	-0,190	0,094	0,044*
<i>TLR1</i> rs5743551	-0,081	0,058	-0,064	0,046	0,165
<i>IL6R</i> rs2229238	0,070	0,059	0,054	0,045	0,234
<i>TNF</i> rs1799964	0,065	0,058	0,054	0,049	0,270
<i>IL6</i> rs2069827	0,060	0,058	0,072	0,070	0,305

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ КЛАПАНОВ СЕРДЦА БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ НА НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ

TABLE 3. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT DIVISION INTO NOSOLOGICAL FORMS

Аналиты Analytes	β	Стандартная ошибка β Standard Error β	B	Стандартная ошибка B Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			-0,175	0,242	0,471
<i>TLR6 rs5743810</i>	0,229	0,085	0,128	0,047	0,008*
<i>IL6 rs2069827</i>	0,250	0,084	0,235	0,079	0,004*
<i>TLR2 rs5743708</i>	-0,142	0,084	-0,177	0,105	0,094
<i>IL6R rs2229238</i>	0,134	0,085	0,090	0,057	0,119
<i>TNF rs361525</i>	-0,117	0,084	-0,162	0,118	0,170
<i>IL8 rs4073</i>	0,108	0,085	0,059	0,047	0,208

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – КОАРКТАЦИЯ АОРТЫ

TABLE 4. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – COARCTATION OF THE AORTA

Аналиты Analytes	β	Стандартная ошибка β Standard Error β	B	Стандартная ошибка B Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			-0,079	0,163	0,627
<i>IL6R rs2228145</i>	0,251	0,091	0,102	0,037	0,007*
<i>IL10 rs1800896</i>	-0,180	0,090	-0,078	0,039	0,049*
<i>TLR2 rs5743708</i>	0,143	0,089	0,107	0,067	0,112
<i>TLR6 rs3775073</i>	-0,122	0,090	-0,048	0,035	0,177
<i>IL8 rs4073</i>	0,111	0,090	0,046	0,037	0,218

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$.

формирование врожденных пороков клапанов сердца.

Полиморфный вариант *IL6 rs2069827* находится за пределами основной транскрибируемой последовательности, поэтому он не влияет на структуру молекулы, но может оказывать влияние на скорость включения гена. Соответственно, мутантный вариант гена будет влиять на экспрессию молекулы IL-6 и через этот механизм могут формироваться нарушения сигнальных путей, ассоциированных с данным цитокином. Логистическая пошаговая регрессия также по-

казала, что в логистической функции могут участвовать и другие гены, такие как *TLR2 rs5743708*, *IL6R rs2229238*, *TNF rs361525* и *IL8 rs4073*. Для оценки эффективности логистической функции проведен ROC-анализ, результат которого представлен на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, уравнение для логистической функции, составленное с учетом всех полученных предикторов и протекторов, и их весовых коэффициентов, значительно отличает полученную кривую, ограничивающую AUC, от равновероятной прямой и 50% площадью под ней.

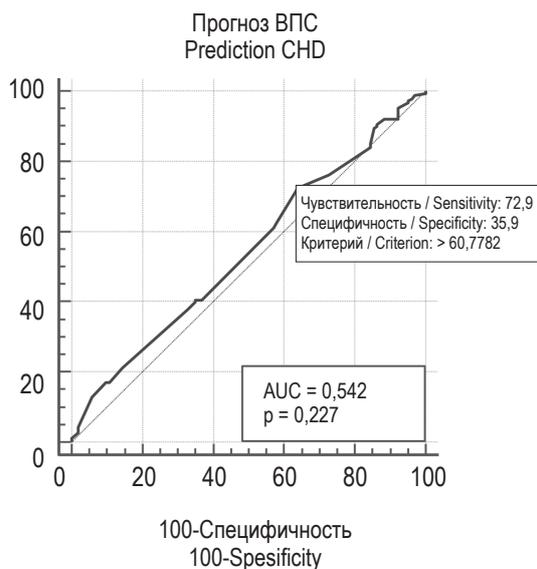


Рисунок 1. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для ВПС без разделения на отдельные нозологии по показателю AUC

Figure 1. ROC-analysis of logistic function efficiency for CHD not differentiated into nosologies by AUC

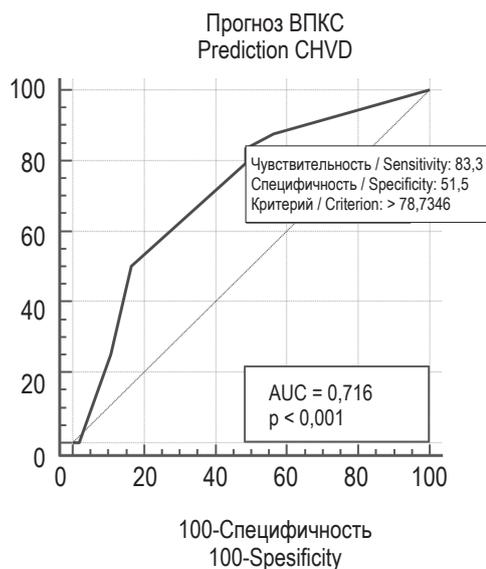


Рисунок 2. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для врожденных пороков клапанов сердца (ВПКС) по показателю AUC

Figure 2. ROC-analysis of logistic function efficiency for congenital heart valve diseases (CHVD) by AUC

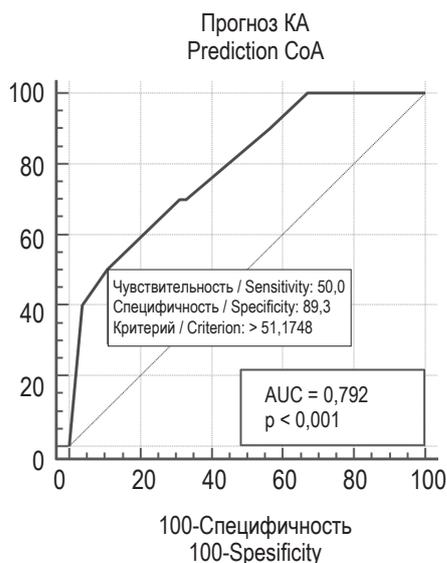


Рисунок 3. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для коарктации аорты (КА) по показателю AUC

Figure 3. ROC-analysis of logistic function efficiency for coarctation of the aorta by AUC

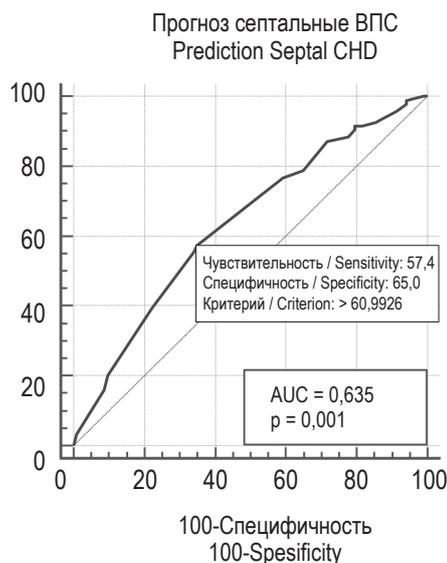


Рисунок 4. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для септальных ВПС без разделения на отдельные нозологии по показателю AUC

Figure 4. ROC-analysis of logistic function efficiency for septal CHD not differentiated into nosologies by AUC

Таким образом, формирование врожденных пороков клапанов сердца имеет свои значимые генетические маркеры как в генах сигнальных паттернов распознающих рецепторов, так и цитокинов (*TLR6* rs5743810 и *IL6* rs2069827). Формирование данной группы пороков сердца также детерминировано сочетанным влиянием пяти

из исследованных генов (*TLR2* rs5743708, *IL6R* rs2229238, *TNF* rs361525 и *IL8* rs4073). Одной из схожих с пороками клапанов сердца по патогенезу является коарктация аорты, где формирование сужения может быть исходом пролиферативного компонента воспаления. Исследования этой группы пороков сердца показало следующие ре-

зультаты, представленные в таблице 4 и на рисунке 3.

Из таблицы 4 видно, что предиктором коарктации аорты является минорный генотип *IL6R* rs2228145, а протектором минорный (мутантный) генотип *IL10* rs1800896. С учетом данных NCBI, *IL6R* rs2228145 кодирует миссенс-мутацию, определяющую замену аспарагина (Asp) в 358 положении на аланин (Ala). Это точечная замена может влиять на структуру молекулы рецептора к IL-6 и через этот механизм ограничивать регуляторное влияние лиганда. Соответственно *IL10* rs1800896 является участком гена, находящегося за пределами основной транскрибируемой последовательности, и поэтому его детерминирующее влияние может быть только через особенности экспрессии молекулы IL-10. В то же время IL-10 является одной из значимых молекул, регулирующих воспаления и ассоциированный с ним пироптоз. В то же время в логистическую функцию входят и другие полиморфные варианты гена со своими весовыми коэффициентами. Оценка эффективности этой функции была проведена с помощью ROC-анализа (рис. 3).

ROC-анализ продемонстрировал значимое отклонение полученной кривой и площади под ней от равновероятной прямой и ограниченной ей площади. Это доказывает, что формирование коарктации аорты детерминируется, по меньшей мере, пятью генами цитокинов и сигнальных паттерн-распознающих рецепторов (*IL6R* rs2228145, *IL10* rs1800896, *TLR2* rs5743708, *TLR6* rs3775073 и *IL8* rs4073).

Исследования ассоциаций септальных ВПС без разделения по отдельным нозологиям с генами цитокинов Toll-like рецепторов показало отсутствие значимых предикторов и наличие протекторных минорных (мутантных) генотипов только в генах сигнальных паттерн-распознающих рецепторов (*TLR2* rs5743708, *TLR4* rs4986790 и *TLR6* rs3775073). Данные представлены в таблице 5. В данной логистической функции свободный член логистической регрессии значимо усиливает суммарные межгенные связи на бинарный показатель. Исходя из этого, можно предположить, что совместное влияние генотипов *TLR2* rs5743708, *IL6R* rs2228145, *TLR4* rs4986790, *TLR4* rs4986791, *TLR6* rs3775073, *TLR1* rs5743551, *TNF* rs1799964, *TLR2* rs3804099 и *TNF* rs361525 могут детерминировать септальные ВПС без разделения их на нозологии.

Для проверки этой гипотезы выполнен ROC-анализ, результаты которого представлены на рисунке 4.

Как видно из рисунка 4, полученная площадь под кривой (показатель AUC) значимо отличалась от равновероятного распределения

($p = 0,001$). Таким образом, можно сделать вывод, что влияние исследуемых полиморфных вариантов генов, при совместном их эффекте, значимо влияет на формирование септальных ВПС без разделения их на нозологии.

Обсуждение

В проведенном исследовании решалась важная задача по оценке роли детерминирования иммуновоспалительного звена патогенеза врожденных пороков сердца. В частности, высказана гипотеза о конституциональной предрасположенности к нарушениям регуляции процессов пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. Важными молекулярными элементами регуляторных сетей являются цитокины и их рецепторы, а также сигнальные паттерн-распознающие рецепторы. Все эти молекулы обладают преиотропностью, в том числе реализуют эффекты регуляции деления клеток, вступление их в дифференцировку и далее в запрограммированную смерть. Особым путем, ассоциированным с провоспалительными цитокинами, является пироптоз – запрограммированная смерть клетки за счет активации рецепторов апоптоза цитокиновыми лигандами [20].

С этих позиций значимые результаты получены для врожденных пороков клапанов сердца и для коарктации аорты. В частности, для группы врожденных пороков клапанов сердца была получена ассоциация с минорными (мутантными) генотипами двух полиморфных участков гена *TLR6* и *IL6*. Причем *TLR6* rs5743810 детерминирует миссенс мутацию, а следовательно, и функцию рецепторной молекулы. Согласно базе данных dbSNP, для данного полиморфизма не выявлено ассоциированных клинических вариантов. В то же время достаточно большое количество исследований показало ассоциации этого полиморфного участка гена с провоспалительными, инфекционными, онкологическими заболеваниями, а также атеросклерозом [6, 12, 19].

Известно, *TLR6* образует гетеродимеры с *TLR1* или с *TLR2*, через которые воспринимаются сигналы от различных лигандов, в том числе от патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, и активируются внутриклеточные каскады, передающие сигналы на нуклеарный фактор транскрипции κB (NF- κB). Если в отношении эмбриобласта нет данных об особенностях экспрессии *TLR*, то новыми исследованиями транскриптома эндометрия у женщин с повторяющимися репродуктивными потерями после экстракорпорального оплодотворения было показано доминирование провоспалительных регуляторных сетей [16]. Авторы делают выводы, что репродуктивные потери связаны с высоким

провоспалительным потенциалом эндометрия и значимой по отношению к контролю (эндометрию здоровых женщин) экспрессией IL-6, интерферона гамма, IL-17A, IL-23A, интерферонов альфа и бета, IL-2, TLR4 и TLR6, а также ряда хемокинов и внутриклеточных мессенджеров (STAT3, RAG1). Ранее проведенные исследования показали схожесть иммунных нарушений в системе «мать – эмбрион/плод» при репродуктивных потерях и при врожденных пороках сердца у плода/новорожденного [4]. Таким образом, можно говорить о том, что неэффективно регулируемый провоспалительный потенциал имеет место не только со стороны материнского микроокружения, но и со стороны собственно эмбриона. Детерминирование этого эффекта значимо проявилось при врожденных пороках клапанов сердца. Вторым предиктором этой группы пороков был *IL6* rs2069827. Как уже говорилось выше, этот полиморфизм влияет на экспрессию молекулы IL-6 и для его минорного генотипа показаны повышенные концентрации IL-6 в сыворотке крови у пациентов с системной красной волчанкой [7]. Соответственно, по предикторной роли двух гомозиготных минорных генотипов *TLR6* rs5743810 и *IL6* rs2069827 в отношении врожденных пороков клапанов сердца можно говорить о конституциональной предрасположенности к формированию данной группы пороков через провоспалительный потенциал. Дополнительными предикторами, сочетано влияющими на формирование врожденных пороков клапанов сердца, были гомозиготные минорные (мутантные генотипы) *IL6R* rs2229238 и *IL8* rs4073. Мутантный гомозиготный генотип *IL6R* rs2229238 вносит дополнительный вклад в провоспалительный потенциал через регуляторную сеть IL-6. Показаны ассоциации этого полиморфного участка гена рецептора IL-6 с кальцификацией биопротезов митрального клапана сердца [17]. Молекула IL-8 является основным провоспалительным хемокином, конституциональный повышенный синтез которого может быть причиной развития и поддержания огромного количества заболеваний с аутовоспалительным патогенезом. Об этом свидетельствует большое количество исследований в этом направлении [14]. Полученные результаты необходимо учитывать и при хирургическом лечении этой группы врожденных пороков сердца, так как провоспалительный потенциал, реализуемый через IL-6 и IL-8, может проявиться в виде осложнений раннего и отдаленного периодов после кардиохирургического лечения.

Значимым предиктором коарктации аорты был мутантный генотип *IL6R* rs2228145. Как уже говорилось выше, этот генотип был ассоциирован с как с аутовоспалительной патологией сердца, так

и с патологической кальцификацией биологического протеза митрального клапана [17]. Вторым полиморфизмом, положительно ассоциированным как врожденными пороками клапанов сердца, так и с коактацией аорты был минорный генотип *IL8* rs4073, для которого получено большое количество ассоциаций с инфекционной, аутовоспалительной и аутоиммунной патологией [14]. Таким образом, по этим генетическим маркерам можно говорить о патогенетической связи между врожденными пороками клапанов сердца и коарктацией аорты. Различия в детерминировании этих двух групп ВПС касались полиморфного варианта гена *TLR2* rs5743708. Для коарктации аорты минорный генотип вносил дополнительный предикторный вклад, а для врожденных пороков клапанов сердца, напротив, протекторный. Как уже говорилось выше, данный полиморфизм детерминирует миссенс-мутацию, которая приводит к изменению структуры рецептора. Согласно базе данных National Library of Medicine (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), этот генотип является фактором риска для формирования хронических инфекционных заболеваний, вызванных *Borrelia burgdorferi* и *Mycobacterium tuberculosis* [15]. Доказано, что мутантный TLR2 не способен эффективно образовывать гетеродимеры с TLR6 и активировать внутриклеточные каскады до NF-κB. Таким образом, этот полиморфизм детерминирует сниженный внутриклеточный сигнал для транскрипции. Как видно из таблицы 5, вклад в детерминирование коарктации аорты вносил как минорный генотип *TLR2* rs5743708, так и мажорный генотип *TLR6* rs3775073, также кодирующий миссенс-мутацию. В отношении врожденных пороков клапанов сердца, ситуация была прямо противоположной. Детерминирование данной патологии было связано с сочетанным действием мутантного генотипа *TLR6* rs5743810 и генотипа дикого типа *TLR2* rs5743708. В целом, вполне вероятно, что формирование как коарктации аорты, так и врожденных пороков клапанов сердца может быть детерминировано через дефицит внутриклеточного сигналинга до NF-κB.

Формирование септальных врожденных пороков сердца было ассоциировано с преимущественно мажорными генотипами *TLR2* rs5743708, *TLR4* rs4986790 и *TLR6* rs3775073. вполне вероятно, что формирование данной группы врожденных пороков сердца является результатом общего вклада всех полиморфизмов, выявленных в регрессии. Сочетанный вклад в детерминирование этой группы ВПС вносил мутантный генотип *TLR4* rs4986791, кодирующий миссенс-мутацию. Данная мутация определяет низкий уровень взаимодействия рецепторов с лигандами, в частности с липополисахаридом [18]. Именно неэффек-

ТАБЛИЦА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – СЕПТАЛЬНЫЕ ВПС БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ НА НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ

TABLE 5. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – SEPTAL CHD WITHOUT DIVISION INTO NOSOLOGICAL FORMS

Аналиты Analytes	Бета Beta	Стандартная ошибка Бета Standard Error Beta	В	Стандартная ошибка В Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			1,605	0,327	0,000*
<i>TLR2 rs5743708</i>	-0,170	0,072	-0,288	0,122	0,020*
<i>IL6R rs2228145</i>	-0,133	0,071	-0,100	0,053	0,062
<i>TLR4 rs4986790</i>	-0,427	0,193	-0,677	0,306	0,028*
<i>TLR4 rs4986791</i>	0,320	0,192	0,481	0,287	0,096
<i>TLR6 rs3775073</i>	-0,135	0,072	-0,095	0,051	0,063*
<i>TLR1_rs5743551</i>	-0,136	0,074	-0,111	0,060	0,067
<i>TNF rs1799964</i>	0,128	0,080	0,115	0,072	0,113
<i>TLR2 rs3804099</i>	-0,090	0,072	-0,067	0,054	0,216
<i>TNF rs361525</i>	-0,083	0,081	-0,131	0,126	0,302

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$.

тивная активация лигандами этого сигнального пути может быть дополнительной причиной в формировании септальных врожденных пороков сердца. Другим положительно ассоциированным с септальными ВПС был мутантный генотип *TNF* rs1799964, который может влиять на экспрессию гена и повышенный синтез самой молекулы $TNF\alpha$ [8]. Вполне вероятно, что через это механизм запускается пироптоз и при неэффективности TLR-ассоциированных сигнальных путей формируется септальные врожденные пороки сердца.

Заключение

Проведенное исследование показало, что детерминирование врожденных пороков сердца связано с генами иммунной регуляции. Особое значение имеет мутация *TLR6* rs5743810, которая была предиктором врожденных пороков клапанов сердца. Формирование врожденных пороков клапанов сердца и коарктации аорты детерминировано межгенными взаимодействиями *TLR2* rs5743708 с *TLR6* rs5743810 и *TLR2* rs5743708 с *TLR6* rs3775073 соответственно. Это указывает на

неэффективность внутриклеточных сигнальных путей до NF- κ B. В то же время эти две группы врожденных пороков сердца детерминированы сочетанным воздействием генов провоспалительных цитокинов, определяющих нарушения в регуляторной сети IL-6 и повышенный синтез IL-8. Для врожденных пороков клапанов сердца такими полиморфными участками генов были *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2229238 и *IL8* rs4073, а для коарктации аорты – *IL6R* rs2228145, *IL8* rs4073. Формирование септальных врожденных пороков сердца связано с общим вкладом в детерминирование этой патологии полиморфных вариантов генов *TLR* и цитокинов. Сочетанное влияние на этот процесс имеют миссенс-мутация в гене *TLR4* rs4986790 и мутация *TNF* rs1799964, приводящая к повышенному синтезу молекулы $TNF\alpha$. Вклад взаимодействия генов *TLR* и цитокинов в формирование ВПС в целом не значителен. Данные о высоком провоспалительном потенциале в группе врожденных пороков клапанов сердца и коарктации аорты необходимо учитывать в постнатальном периоде при проведении кардиохирургического лечения этих нозологий.

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Treatment of systemic inflammatory response syndrome following on-pump pediatric congenital heart surgery. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Кузибаева Н.К. Распространенность врожденных пороков сердца у детей. Лечащий Врач, 2021. № 9. С. 48-52. [Kuzibaeva N.K. Aspects of the prevalence of congenital heart diseases in early age children in the Republic of Tajikistan. *Lechaschi Vrach*, 2021, no. 9, pp. 48-52. (In Russ.)] doi: 10.51793/OS.2021.24.9.009.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics]. Moscow: Higher School, 1990. 352 p.
4. Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.Е. Регуляторная метасистема (иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза). М.: Медицина, 2002. 168 с. [Poletaev A.B., Morozov S.G., Kovalev I.E. Regulatory metasytem (immunoneuroendocrine regulation of homeostasis)]. Moscow: Medicine, 2002. 168 p.
5. Цепокина А.В., Хуторная М.В., Шабалдин А.В., Понасенко А.В. Особенности распределения генотипов полиморфных вариантов rs2234246 и rs4711668 TREM-1 у детей с дуктус-зависимыми врожденными пороками сердца // Трансляционная медицина, 2019. Т. 6, № 4. С. 5-12. [Tsepokina A.V., Khutornaya M.V., Shabalidin A.V., Ponasenko A.V. The role of gene TREM-1 at children who have operation congenital heart diseases. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2019, Vol. 6, no. 4, pp. 5-12. (In Russ.)]
6. Amjadi F, Zandieh Z, Mehdizadeh M., Aghajanpour S., Raoufi E., Aghamajidi A., Aflatoonian R. The uterine immunological changes may be responsible for repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 138, 103080. doi: 10.1016/j.jri.2020.103080.
7. Bhatnager R., Jalthuria J., Sehrawat R., Nanda S., Dang A.S. Evaluating the association of TNF α promoter haplotype with its serum levels and the risk of PCOS: A case control study. *Cytokine*, 2019, Vol. 114, pp. 86-91.
8. Bradshaw E.A., Martin G.R. Screening for critical congenital heart disease: advancing detection in the newborn. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2012, Vol. 24, no. 5, pp. 603-608.
9. Byrne A., MacDonald J., Buckley S. Reading, language and memory skills: a comparative longitudinal study of children with Down syndrome and their mainstream peers. *Br. J. Educ. Psychol.*, 2002, Vol. 72, Pt. 4, pp. 513-529.
10. Chadha S., Behl T., Bungau S., Kumar A., Arora R., Gupta A., Uddin M.S., Zengin G., Aleya L., Setia D., Arora S. Mechanistic insights into the role of pyroptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Res. Transl. Med.*, 2020, Vol. 68, no. 4, pp. 151-158
11. Fahed A.C., Gelb B.D., Seidman J.G., Seidman C.E. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ. Res.*, 2013, Vol. 112, no. 4, pp. 707-720.
12. Kutikhin A.G., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Salakhov R.R., Golovkin A.S., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene*, 2016, Vol. 19, no. 9, pp. 76-89.
13. Li C. Li X., Pang S., Chen W., Qin X., Huang W., Yan B. Novel and Functional DNA Sequence Variants within the GATA6 Gene Promoter in Ventricular Septal Defects. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 7, pp. 12677-12687.
14. Liu W., Wang C., Tang L., Yang H. Associations between gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Immunol Invest.* 2021; 50(8):869-883. doi: 10.1080/08820139.2020.1787438.
15. Oğus A.C., Yoldas B., Ozdemir T., Uguz A., Olcen S., Keser I., Coskun M., Cilli A., Yegin O. T The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J.* 2004, Vol. 23, no. 2, pp. 219-223. doi: 10.1183/09031936.03.00061703.
16. Paradowska-Gorycka A., Roszak M., Stypinska B., Lutkowska A., Walczyk M., Olesinska M., Wajda A., Piotrowski P., Puszczewicz M., Majewski D., Jagodzinski P.P. IL-6 and TGF- β gene polymorphisms, their serum levels, as well as HLA profile, in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2019, Vol. 37, no. 6, pp. 963-975.
17. Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Tsepokina A.V., Kondyukova N.V., Yuzhalin A.E., Barbarash L.S. A genomics-based model for prediction of severe bioprosthetic mitral valve calcification. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 9, 1385. doi: 10.3390/ijms17091385.
18. Richard K., Piepenbrink K.H., Shirey K.A., Gopalakrishnan A., Nallar S., Prantner D.J., Perkins D.J., Lai W., Vlk A., Toshchakov V.Y., Feng C., Fanaroff R., Medvedev A.E., Blanco J.C.G., Vogel S.N. A mouse model of human TLR4 D299G/T399I SNPs reveals mechanisms of altered LPS and pathogen responses. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 2, e20200675. doi: 10.1084/jem.20200675.

19. Semlali A., Almutairi M., Rouabhia M., Parine N.R., Amri A.A., Al-Numair N.S., Hawsawi Y.M., Alanazi M.S. Novel sequence variants in the TLR6 gene associated with advanced breast cancer risk in the Saudi Arabian population. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 11, e0203376. doi: 10.1371/journal.pone.0203376.
20. Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyanycheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.
21. Wang H., Zhou S., Zhang J., Lei S., Zhou J. Correlations between TLR polymorphisms and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 49 case-control studies. *Immunol Res.*, 2019, Vol. 67, no. 1, pp. 142-150.
22. Wang J., Luo X.-J., Xin Y.-F., Liu Y., Liu Z.-M., Wang Q., Yang Y.-Q. Novel GATA6 mutations associated with congenital ventricular septal defect or tetralogy of fallot. *DNA Cell Biol.*, 2012, Vol. 31, no. 11, pp. 1610-1617.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца отдела хирургии сердца и сосудов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Синицкая А.В. — к.б.н., лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмелевич С.А. — к.м.н., врач детский кардиолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Sinitskaya A.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Pediatric Cardiologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 21.03.2022

Отправлена на доработку 28.03.2022

Принята к печати 30.03.2022

Received 21.03.2022

Revision received 28.03.2022

Accepted 30.03.2022