

ISSN 2658-6533

НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

11(4) 2025

16+

Сайт журнала:
rrmedicine.ru

сетевой научный рецензируемый журнал
online scholarly peer-reviewed journal



НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Свидетельство о регистрации средства массовой информации Эл. № ФС 77-74739 от 29 декабря 2018 г.

The Journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor)
Mass media registration certificate El. № FS 77-74739 of December 29, 2018



Том 11, №4. 2025

СЕТЕВОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2014 г.

ISSN 2658-6533



Volume 11, №4. 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.**, член-корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор, 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., академик 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

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**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Biology), Professor, 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, Academician 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

Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, РФ

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

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

B.D. Tsygankov, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

A.D. Ebert, PhD, Dr. med. habil., Professor, Practice for Women's Health, Gynecology & Obstetrics, Berlin, Germany

EDITORIAL BOARD:

EXECUTIVE SECRETARY: **A.Yu. Malyutina**, Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

ENGLISH TEXT EDITOR: **I.V. Lyashenko**, Cand. Sci. (Philology), Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

TECHNICAL SECRETARY: **N.A. Rudykh**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ГЕНЕТИКА

GENETICS

Ivan Y. Iourov, Oksana S. Kurinnaia, Maria E. Iuditskaia, Efim S. Karpachev, Kirill S. Vasin, Victoria Y. Voinova, Ekaterina V. Semina, Yuri B. Yurov, Yulia A. Chaika, Svetlana G. Vorsanova Common CNVs modulate phenotypes in neurodevelopmental disorders (autism and intellectual disability): focus on <i>SHANK3</i> and <i>CHAMP1</i>	596	Ivan Y. Iourov, Oksana S. Kurinnaia, Maria E. Iuditskaia, Efim S. Karpachev, Kirill S. Vasin, Victoria Y. Voinova, Ekaterina V. Semina, Yuri B. Yurov, Yulia A. Chaika, Svetlana G. Vorsanova Common CNVs modulate phenotypes in neurodevelopmental disorders (autism and intellectual disability): focus on <i>SHANK3</i> and <i>CHAMP1</i>	596
Е.Н. Воропаева, О.Б. Серегина, М.С. Войтко, Т.Н. Бабаева, Н.В. Скворцова, В.Н. Максимов, Т.И. Поспелова Частота, спектр и функциональное значение мутаций в гене <i>MIR-142</i> при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме	607	Elena N. Voropaeva, Olga B. Seregina, Maria S. Voytko, Tatiana N. Babaeva, Natalia V. Skvortsova, Vladimir N. Maksimov, Tatiana I. Pospelova Frequency, spectrum, and functional significance of mutations in the <i>MIR-142</i> gene in diffuse large B-cell lymphoma	607
М.С. Пономаренко Связь генетических детерминант SHBG с гормональным профилем больных миомой матки	628	Marina S. Ponomarenko The relationship between the genetic determinants of SHBG and the hormonal profile of patients with uterine fibroids	628

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACOLOGY

Hop V. Nguyen, ShiPin Chen, An N.T. Huynh, Truc H.N. Tran, Ngoc L.H. Vo, Tho T. Le, Hung Q. Nguyen, Thien H. Van, An N. Nguyen, Hanh T.D. Nguyen, Viet T. Pham Chemical composition and antimicrobial activities of <i>Boesenbergia xiphostachya</i>	643	Hop V. Nguyen, ShiPin Chen, An N.T. Huynh, Truc H.N. Tran, Ngoc L.H. Vo, Tho T. Le, Hung Q. Nguyen, Thien H. Van, An N. Nguyen, Hanh T.D. Nguyen, Viet T. Pham Chemical composition and antimicrobial activities of <i>Boesenbergia xiphostachya</i>	643
Tran T.P. Nhung, Le P.T. Quoc An investigation into the acute and sub-chronic toxicity of ethanol extract of <i>Ardisia sylvestris</i> Pitard leaves <i>in vivo</i>	654	Tran T.P. Nhung, Le P.T. Quoc An investigation into the acute and sub-chronic toxicity of ethanol extract of <i>Ardisia sylvestris</i> Pitard leaves <i>in vivo</i>	654
Ali H. Salama Development of Novel Antimicrobial Peptides Targeting Antibiotic-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	675	Ali H. Salama Development of Novel Antimicrobial Peptides Targeting Antibiotic-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	675
Д.И. Поздняков Экспериментальная модель болезни Альцгеймера, вызванная интрагиппокампальным введением натрия азиды. Сопоставимость с амилоидной моделью	684	Dmitry I. Pozdnyakov Experimental model of Alzheimer's disease caused by intrahippocampal injection of sodium azide. Comparability with the amyloid model	684

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

MEDICINE

Natalya L. Levintova, Yulia V. Keniksfest, Konstantin Yu. Retyunskiy, Alexandra V. Staruseva, Victoria V. Ruzhenkova, Inna S. Khamskaya The role of mental disorders in the pathogenesis of atopic dermatitis (review)	699	Natalya L. Levintova, Yulia V. Keniksfest, Konstantin Yu. Retyunskiy, Alexandra V. Staruseva, Victoria V. Ruzhenkova, Inna S. Khamskaya The role of mental disorders in the pathogenesis of atopic dermatitis (review)	699
Ф.К. Ахмедов, М.М. Рахматуллаева, О.А. Якубова Влияние полиморфизмов генов цитокинов на риск развития преэклампсии	709	Farkhod K. Akhmedov, Makhfuza M. Rakhmatullaeva, Oltinoy A. Yakubova Effect of cytokine gene polymorphisms on the risk of preeclampsia	709
М.А. Неудакхин, Н.М. Агарков, А.С.О. Ибиев, Е.Н. Коровин, А.С. Лысенко, М.Л. Курзин, И.Ю. Шарапов Возрастная жизнеспособность в критические периоды жизни пациентов при зрительном дефиците и травмах	727	Mikhail A. Neudakhin, Nikolay M. Agarkov, Aslanbek S.O. Ibiev, Evgeny N. Korovin, Anastasia S. Lysenko, Maxim L. Kurzin, Ilya Y. Sharapov Age-related resilience in critical periods of life of patients with visual deficits and injuries	727

ГЕНЕТИКА
GENETICS



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

УДК 575:616.89:616-053.2

Common CNVs modulate phenotypes in neurodevelopmental disorders (autism and intellectual disability): focus on *SHANK3* and *CHAMP1*

Ivan Y. Iourov^{1,2,3} , Oksana S. Kurinnaia^{1,2} , Maria E. Iuditskaia^{1,2} ,
Efim S. Karpachev^{1,2} , Kirill S. Vasin^{1,2} , Victoria Y. Voinova^{1,2} ,
Ekaterina V. Semina¹ , Yuri B. Yurov^{1,2} , Yulia A. Chaika¹ ,
Svetlana G. Vorsanova^{1,2}

¹ Mental Health Research Center,

34 Kashirskoe Hgw., Moscow, 115522, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University,

2 Taldomskaya St., Moscow, 125412, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Postgraduate Education,

2/1 bld. 1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia

Corresponding author: Ivan Y. Iourov (ivan.iourov@gmail.com)

Abstract

Background: Common copy number variations (CNVs) are rarely considered as causative in genomic research dedicated to uncovering mechanisms of neurodevelopmental diseases. However, analyzing complex systems of interactions between individual genomic variations indicates that at least minimal phenotypic effects of common CNVs should exist. Here, we have tested this idea focusing on CNVs affecting *SHANK3* and *CHAMP1* genes. **The aim of the study:** The analysis of common CNVs affecting *SHANK3* and *CHAMP1* genes in a neurodevelopmental cohort (intellectual disability, autism, epilepsy) to uncover possible effects on the phenotypic outcome. **Materials and methods:** CNVs were evaluated in a neurodevelopmental cohort of 780 children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies by molecular karyotyping using a high-resolution SNP array technique. Original bioinformatic methods were used to address the effect of CNVs affecting *SHANK3* and *CHAMP1*. **Results:** CNVs involving *SHANK3* and *CHAMP1* were observed in 44 (5.6%) and 6 (0.8%) individuals, respectively. *SHANK3* CNVs have been associated with specific language problems in 36 (82%) out of 44 individuals. *CHAMP1* CNVs were all associated with chromosomal instability, which had been proposed as a cause of more severe clinical manifestations. Bioinformatic analysis has confirmed these modulating effects of common CNVs on

phenotypes in neurodevelopmental diseases. **Conclusion:** Our data allowed to propose a pathogenetic model for brain disfunction in ID and ASD, which is based on an idea that common CNVs add/exacerbate phenotypic traits produced by the main genetic defect (chromosomal aberration or gene mutation). Thus, it appears that mechanisms of neurodevelopmental diseases are more complex than previously recognized even in cases associated with a well-described genomic pathology.

Keywords: copy number variations; autism; intellectual disability; neurodevelopmental disorders; phenotype; *SHANK3*; *CHAMP1*

Acknowledgements: We would like to express our gratitude to Dr. Irina A. Demidova, Dr. Alexey D. Kolotii, Dr. Maria A. Zelenova and Nikita S. Iakushev for technical assistance.

For citation: Iourov IY, Kurinnaia OS, Iuditskaia ME, et al. Common CNVs modulate phenotypes in neurodevelopmental disorders (autism and intellectual disability): focus on *SHANK3* and *CHAMP1*. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):596-606. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-1

Introduction. Copy number variations (CNVs) are a major contributor to the pathogenesis of brain diseases. Moreover, it appears that psychiatric (neurodevelopmental) disorders are stronger associated with CNVs than other morbid conditions. This is a special case of autism or autism spectrum disorders (ASD) and intellectual disability (ID) [1, 2]. However, direct associations between ASD/ID and CNVs are generally limited to microdeletion/microduplication syndromes (autism and ID are considered hallmark symptoms) or rare conditions reported as individual cases or occasional findings in cohort studies [1-4]. As a result, the phenotypic effect of CNVs uncovered during genomic analysis of individuals suffering from brain diseases remains a matter of conjecture. Earlier, to solve the causation problem occurring during analyses of CNVs, a variome (CNVariome) concept was applied. Accordingly, it was proposed that both common and rare CNVs are able to produce a cumulative effect on the phenotype [3]. Consequently, it was hypothesized that common CNVs rather possess modulating phenotypic effects than cause the disease per se [3, 4]. To uncover these effects on phenotypes in neurodevelopmental (psychiatric) disorders, specific bioinformatic or systems biology methods are to be applied; fortunately, these are available [4, 5]. On the other hand, there is still a conundrum of

interpreting genomic data in the pathogenetic context in neurodevelopmental diseases (e.g., ASD) [6]. The large number of methods for analyzing functional consequences of CNVs hinders the comparative analysis between individual data and case-control studies. However, there are ways to come to a conclusion about pathogenetic value of a variant regardless of occurrence among healthy or affected individuals [7]. For instance, modulating functional consequence of a variant using approaches of system genomics appears to be an issue in understanding the effect of CNVs on phenotype [3, 5, 7]. In total, it seems that a need for a re-evaluation of common CNVs in neurodevelopmental diseases exists.

As previously noted, there are still debates concerning genetic causation in neurodevelopmental disorders (e.g., autism) [6]. However, CNVs are known to be involved in the development of psychiatric symptoms and cognitive ability, especially, those observed in ASD and other childhood psychiatric disorders [8]. CNVs cause changes of protein structures through loss or copy increase of coding sequences. These changes underlie functional consequences of CNVs [9]. Consequently, in silico (bioinformatic) methods based on systems biology analysis and simulating functional consequences of CNVs may be used for uncovering variants possessing phenotypic outcomes [5, 10].

Currently, the impact of CNVs on brain functioning resulting in specific neurobehavioral phenotypes and psychiatric diseases is recognized [11]. Finally, data on CNVs correlate with findings of neuroimaging studies in children with ASD and ID [12, 13]. One may assume that analysis of common CNVs affecting genes, which are defective (gene mutations/CNVs/chromosome imbalances) in syndromic ASD and/or ID, is likely to result in uncovering a less specific, albeit appreciable effect on neurodevelopmental phenotypes.

Previously, we reported a case of partial *SHANK3* duplication associated with specific phenotype (neurophysiological biomarker), which appears to contribute to the pathogenesis of ASD with/without ID and other neurobehavioral disorders [12]. *SHANK3* encodes one of SHANK postsynaptic scaffolding proteins, which are present at glutamatergic synapses in the brain and are associated with genetic (rare) forms of ASD [14]. Furthermore, heterozygous deletion of *SHANK3* gene due to 22q13.3 microdeletion is an important element of pathogenesis of Phelan-McDermid syndrome, which has long been seen as ‘a rare genetic form of autism’ [15]. The involvement of *SHANK3* gene in a microdeletion syndrome along with other co-localized genes supports the hypothesis concerning phenotype modulating by *SHANK3* copy number change in individuals with other genetic defects and neurodevelopmental diseases. A similar story has emerged in rare neurodevelopmental disorder caused by mutations/CNVs of *CHAMP1* (*CHAMP1*-related disorder) with the only exception of a wide spectrum of neurodevelopmental phenotypes and congenital anomalies (CA) [16]. We hypothesize that common CNVs of these genes, which are generally considered as benign, could possess a modulating effect on neurodevelopmental phenotypes. Here, we have evaluated CNVs detected by molecular karyotyping using the high-resolution SNP

array technique in the neurodevelopmental cohort reported previously [17] with special attention to common copy number changes of *SHANK* and *CHAMP1* and their phenotypic effects.

The aim of the study. The aim of this study is to describe common CNVs affecting *SHANK3* and *CHAMP1* genes in a neurodevelopmental cohort of children with ASD, ID, epilepsy and CA and to uncover probable effects on the phenotypic outcome.

Materials and methods. The neurodevelopmental cohort of 780 children with ASD, ID, epilepsy and/or neurobehavioural disorder and CA was analysed using molecular karyotyping and a SNP array platform (CytoScan HD Arrays by Affymetrix, Santa Clara, CA). This platform has nearly 2.7 billion markers and nearly 750,000 SNPs for analysing CNVs and heterozygosity losses [17]. CNVs affecting *SHANK3* and *CHAMP1* were evaluated by original in silico (bioinformatic) methods based on system biology analysis and simulating functional consequences of a genomic variant at transcriptome, proteome/interactome and metabolome levels as systematically described earlier [3, 10, 17, 18]. Interactome visualization and analysis of *SHANK3* and *CHAMP1* proteins were performed using STRING DB, <https://string-db.org/> [19].

Results and discussion. CNVs affecting the *SHANK3* gene were identified in 44 (5.6%) out of 780 children from the neurodevelopmental cohort. Deletions were observed in 13 individuals (1.7%), whereas duplications were found in 31 individuals (3.9%). The higher occurrence of duplications probably indicates that they have a less adverse effect on SHAK3 protein function than deletions do. Table 1 summarizes data on common CNVs involving *SHANK3* and phenotypes of the affected individuals. Figure 1A demonstrates examples of CNVs affecting the *SHANK3* gene.

Table 1

CNVs involving *SHANK3*

№	Age (years)	Phenotype	SNP array results (<i>SHANK</i> only)	del/dup
1	4	ID, ASD, CA	arr 22q13.33(51107061_51115526)×1	del
2	5	ID, ASD, epilepsy	arr 22q13.33 (51136928_51165600)×3	dup
3	4	Mild ID, CA	arr 22q13.33(51106757_51115526)×3	dup
4	14	ASD, disorders of sex development	arr 22q13.33(51137210_51141179)×3	dup
5	1,8	ID, severe CA	arr 22q13.33(51103902_51121377)×3	dup
6	4	ID, ASD, CA*	arr 22q13.33(51104039_51121293)×3	dup
7	9	ID, ASD, obesity, schizophrenia	arr 22q13.33(51103691_51115526)×3	dup
8	4,5	ID, ASD, CA, epilepsy, macrocephaly	arr 22q13.33(51092391_51121362)×3	dup
9	0,3	ID, epilepsy, CA	arr 22q13.33(51103691_51121147)×3	dup
10	11	Mild ID, CA, cachexia	arr 22q13.33(51103691_51121295)×3	dup
11	3	Severe ID, ASD, CA	arr 22q13.33(51103691_51121147)×3	dup
12	5	ID, ASD	arr 22q13.33(51105555_51115526)×3	dup
13	13	ID, ASD	arr 22q13.33(51103691_51121293)×3	dup
14	2	ID, CA	arr 22q13.33(51104037_51121293)×3	dup
15	11	ID, ADHD, CA	arr 22q13.33(51103949_51120080)×3	dup
16	17	Mild ID, CA	arr 22q13.33(51103949_51120080)×3	dup
17	10	ID, CA	arr 22q13.33(51103691_51121377)×3	dup
18	6	ID, ASD**	arr 22q13.33(51092248_51120080)×3	dup
19	10	Mild ID, CA	arr 22q13.33(51103691_51121362)×3	dup
20	2	Mild ID	arr 22q13.33(51103691_51121293)×3	dup
21	14	ID	arr 22q13.33(51103691_51120080)×3	dup
22	7	ID, ASD, CA	arr 22q13.33(51103691_51121377)×3	dup
23	12	Severe ID, epilepsy, CA	arr 22q13.33(51121360_51127898)×1	del
24	4	ID, CA	arr 22q13.33(51103691_51121364)×3	dup
25	0,4	ID, epilepsy, CA	arr 22q13.33(51103692_51121362)×3	dup
26	6	ID, CA	arr 22q13.33(50653914_50682948)×3	dup
27	1,3	ID, CA	arr 22q13.33(50661004_50682948)×3	dup
28	13	ASD, ADHD	arr 22q13.33(50661004_50682933)×3	dup
29	7	Severe ID, CA	arr22q13.33(50654036_50681651)×3,22q13.33(50727595_50759411)×3	dup/dup
30	5	ID, obesity*	arr 22q13.33 (50661004_50682948)×3	dup
31	7	Epilepsy, ASD	arr 22q13.33(50694435_50695232)×1	del
32	4	Mild ID, epilepsy	arr 22q13.33(50660917_50681649)×3	dup
33	3,4	ADHD, CA	arr 22q12.3(36231385_36235912)×1,22q13.33(50677098_50682933)×1	del/del
34	4,8	ID, ASD	arr 22q13.33(50677098_50682933)×1	del
35	1,2	ID, CA	arr 22q13.33(50694435_50695232)×1	del
36	5	ID, epilepsy, CA	arr 22q13.33(50051262_50068437)×1, 22q13.33(50677098_50682948)×1	del/del
37	6	ID, epilepsy	arr 22q13.33(50677098_50682948)×1	del
38	6	epilepsy, ASD	arr 22q13.33(50694435_50695232)×1	del
39	8	ID, epilepsy, ASD	arr 22q13.33(50694435_50695232)×1	del
40	9	ID, epilepsy, ASD	arr 22q13.33(50677098_50689895)×1	del
41	2	ID, epilepsy, CA*	arr 22q13.33(50665603_50682936)×3	dup
42	10	ID, ASD, epilepsy	arr 22q13.33(50731680_50733099)×1	del
43	4	ID, epilepsy	arr 22q13.33(50661004_50681652)×3	dup
44	6	ASD, epilepsy	arr 22q13.33(50731733_50732469)×1	del

Note: * – brain malformation; ** – parental consanguinity.

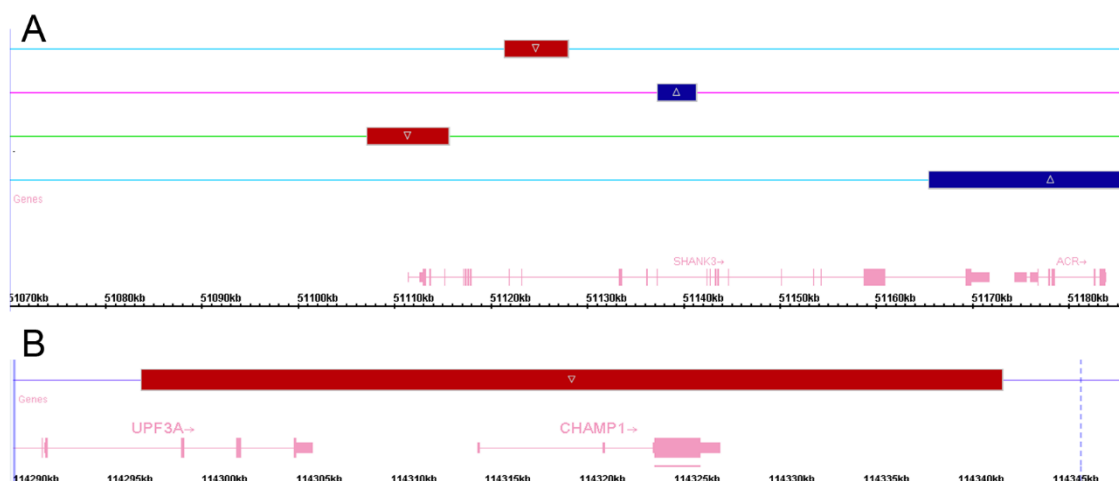


Fig. 1. Examples of CNVs detected by SNP array. A) CNVs affecting the *SHANK3* gene: red bars correspond to deletions; blue bars correspond to duplications. B) deletion encompassing *CHAMP1*

CNVs affecting the *CHAMP1* gene were identified in 6 (0.8%) out of 780 children from the neurodevelopmental cohort. All the CNVs were deletions. Two cases demonstrated co-occurrence of *SHANK3* duplication and *CHAMP1* deletion with severe manifestations

of neurodevelopmental disorders and CA. Table 2 summarizes data on common deletions involving *CHAMP1* and phenotypes of the affected individuals. Figure 1B demonstrates an example of *CHAMP1* deletion.

Table 2

CNVs (deletions) involving *CHAMP1*

№	Age (years)	Phenotype	SNP array results (<i>CHAMP1</i> only)	+ CNVs involving <i>SHANK3</i>
1	6	ID, ASD, CA, epilepsy	arr 13q34(114313536_114342258)x1	+
2	9	ID, ASD, CA, epilepsy, macrocephaly	arr 13q34(114313536_114342258)x1	+
3	0,7	Severe ID, epilepsy	arr 13q34(114309842_114342258)x1	-
4	12	ASD, epilepsy	arr 13q34(114309596_114342258)x1	-
5	1,4	ID, ASD, CA, epilepsy	arr 13q34(114296760_114342258)x1	-
6	1,3	ID, ASD, CA, epilepsy	arr 13q32.3q34(101495219_115107733)x1	-

Children from the neurodevelopmental cohort, generally, shared ASD and ID. CA and epilepsy were common in cohort members with CNVs involving *SHANK3* and *CHAMP1*. Occasionally, children exhibited attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), obesity or brain malformations. Certainly, the underlying cause of phenotypes in these children was the result of previously detected defects in chromosomal structure and genes (unshown data; partially presented in [17]). To focus on the possible modulating effect of common CNVs of *SHANK3* and *CHAMP1*, the

remaining load of CNVs (chromosomal imbalances and intragenic CNVs) was disregarded, and shared phenotypic traits (e.g. specific neurobehavioural changes, as found in a previous case [12]) were addressed. Earlier, *SHANK3* CNVs have been associated with deficient temporal resolution of the auditory system. This led to specific language problems and had been suggested to represent a biomarker of *SHANK3* copy number changes. Here, 36 (82%) out of 44 individuals with *SHANK3* CNVs exhibited this phenotypic trait. The remainder (patients 5, 6, 10, 11, 23, 29,

30, 41 from Table 1) was associated with extremely severe clinical manifestations of ID and CA with brain malformations, which are likely to mask the modulating effect of *SHANK3* CNVs. *CHAMP1* CNVs were all associated with chromosomal instability in affected children (unshown data), which had

been proposed as a cause of more severe manifestation of ASD, ID, epilepsy and CA. To further demonstrate the modulating effect, a bioinformatic analysis was performed. Figures 2 and 3 demonstrate interactomes of SHANK3 and CHAMP1, respectively.

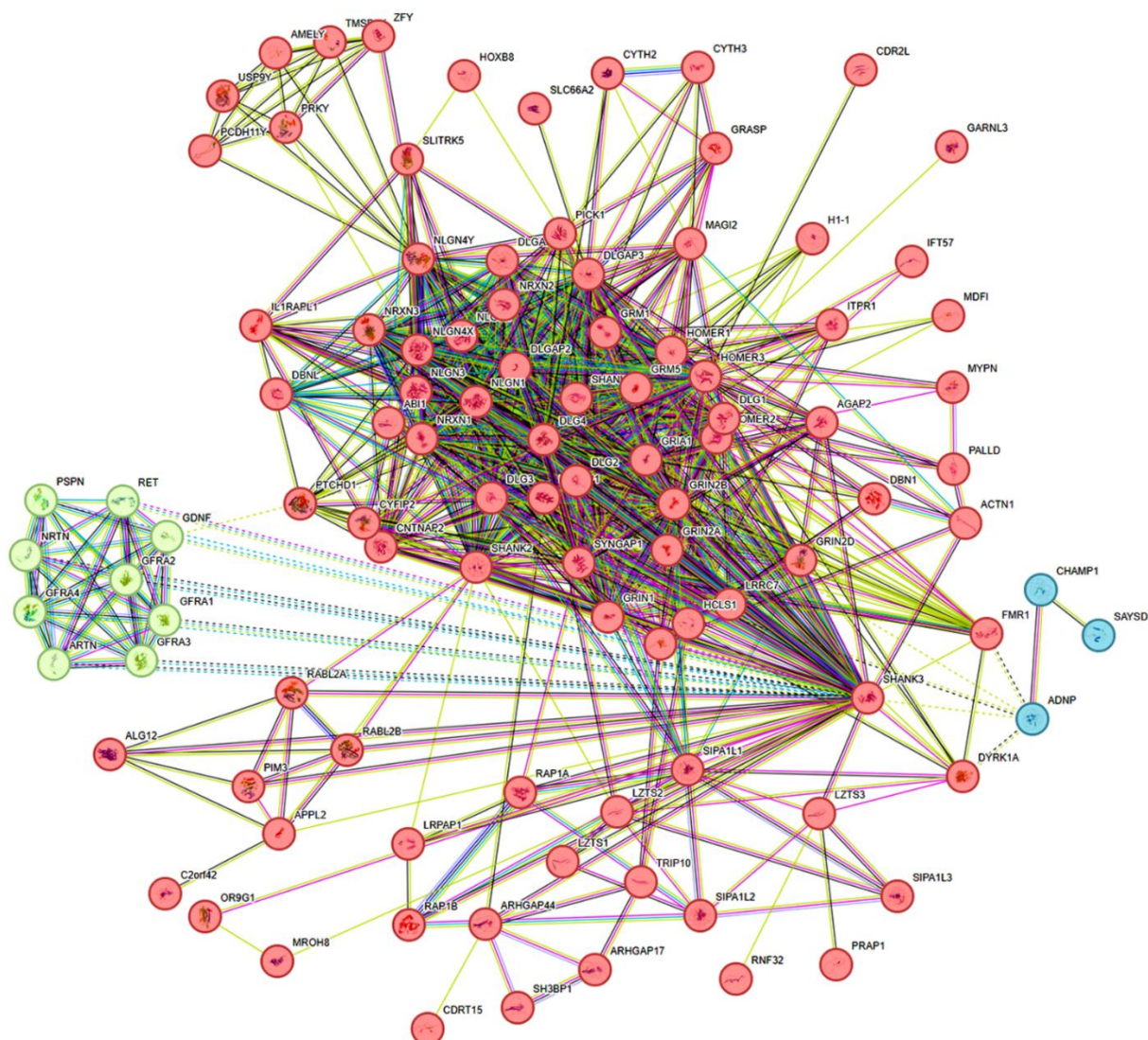


Fig. 2. SHANK3 interactome (with CHAMP1); red: neuexins and neuroligins; green: RET signaling; blue: non-specified (retrieved and analyzed using STRING db [19])

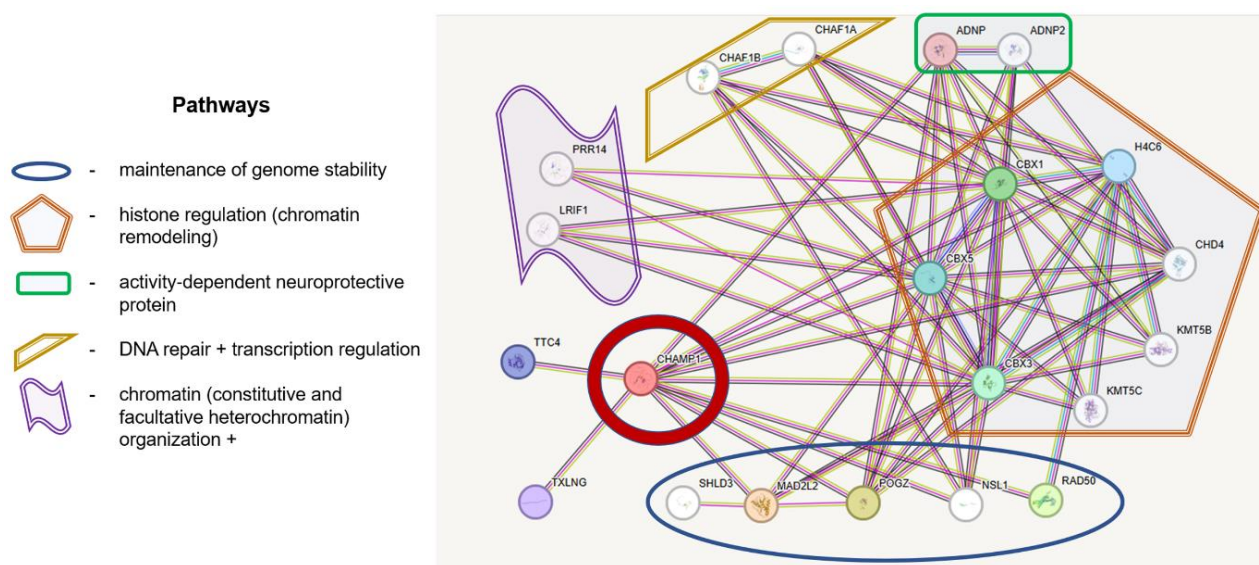


Fig. 3. CHAMP1 interactome (retrieved and analyzed using STRING db [19])

Interactome analysis has not highlighted a valuable network between *SHANK3* and *CHAMP1*. Accordingly, common CNVs of the *SHANK3* and *CHAMP1* have been considered as phenotype modulators through unshared pathways. *SHANK3* is a key element of pathways regulating synaptogenesis (neurexins and neuroligins) and RET signaling. *CHAMP1* is a connecting link between pathways involved in chromatin remodeling (histone regulation and heterochromatin formation), maintenance of genome stability (including DNA repair) + transcriptional regulation, and activity-dependent neuroprotective proteins.

All the CNVs involving *SHANK3* and *CHAMP1* affect exons leading, therefore, to a change of protein structure, which should influence the phenotype [9] (especially, neurobehavioral phenotype [11]). Furthermore, CNVs of disease-associated genes are linked to specific psychiatric symptoms and cognitive ability (these are phenotypic traits, but not disorders!) [8] and neurophysiological endophenotypes [13]. Additionally, genomic studies of synaptic dysfunction in ASD have revealed that specific phenotypic traits result from mutations in 'postsynaptic' genes, including *SHANK3* [20]. In the present study, specific language

problems (for more details, see [12]) have been associated with CNVs involving *SHANK3* in 82% of cases. It should be noted that the remaining cases exhibited extremely severe ID and CA, making it impossible to evaluate speech impairment. Children without CNVs of the *SHANK3* gene have not demonstrated this specific language/speech problems. Similar changes have been reported during genotype-phenotype correlations in individuals with *SHANK3* de novo intragenic mutations [21]. Furthermore, *SHANK3* deficiency is found to result in detectable pathological processes in the central and peripheral nervous system [22]. As shown by genetic model studies [23, 24] and *SHANK* protein expression analysis [25], despite a wide spectrum of *SHANK3* ontologies and abundant distribution (expression), alterations to the sequence and copy number of this gene is almost always associated with specific phenotypic and endophenotypic changes. These observations are relevant to data retrieved from the interactome and further bioinformatic analysis. Therefore, the modulating effect of CNVs affecting the *SHANK3* manifesting as specific language/speech problems is highly probable. No correlations between phenotypic outcomes and type/localization of CNVs have been determined.

Rare microdeletions at 13q33q34 (*CHAMP1* gene localization) and mutations in *CHAMP1* gene have long been associated with a disorder exhibiting a wide spectrum of neurodevelopmental/neurobehavioral abnormalities (autism, ADHD and ID) [26, 27, 28]. Deficiency of this gene causes neurodevelopmental impairment manifesting as more-or-less specific neurobehavioral phenotypes [28]. Functionally, *CHAMP1* represents an important cellular component, alterations to which seem to produce abnormal chromatin remodeling (transcription regulation and homologous recombination included) and neuroprotection [27, 29]. Additionally, functional genomic studies of *CHAMP1* complex have demonstrated that it is strongly required for maintaining genomic stability in euchromatic and, more specifically, heterochromatic regions [30]. The failure of the latter leads to genome and chromosome instability, which have been systematically associated with a wide spectrum of brain diseases, including ASD and epilepsy, as a key element of the pathogenetic cascade [31, 32, 33]. Since both bioinformatic analysis (Fig. 3) and literature data provide evidence of alterations to *CHAMP1*-related pathways resulting in failures to genome/chromosome stability maintenance, we have concluded that chromosomal instability mediated by *CHAMP1* CNVs (deletions) is the driving force for modulating the phenotype or leading to more severe forms of ID, ASD and CA.

Despite the knowledge about the role of CNVs in interindividual diversity and pathophysiology of brain diseases, there is still a gap in our understanding of mechanisms, by which copy number changes of genes produce neurodevelopmental phenotypes. In general, it is suggested that CNVs produce a phenotype in one of two ways: either directly (i.e. by altering the structure or copy number of protein-coding sequences of a disease-causing gene) [9, 11], or via the cumulative effect of CNVs (i.e. the CNVariate, or a complex system of interactions between CNVs and genes/proteins changed by CNVs) [3]. At the neurophysiological level, CNVs are able to

cause endophenotypic traits, which are specific to a given disease-causing gene [12, 34]. Moreover, specific phenotypic traits of neurodevelopmental disorders (psychiatric symptoms, cognitive disability, etc.) are associated with CNVs involving disease-causing genes [8]. Regardless of the focus on rare CNVs as a cause of neurodevelopmental and neurobehavioral diseases [2, 11], almost all these observations are applicable to common CNVs with the sole exception of diminished phenotypic effect of common CNVs, probably due to natural/evolutionary selection. Thus, common CNVs are to be considered as valuable contributors to phenotypes of neurodevelopmental diseases (ASD and ID).

In total, the involvement of common CNVs appears to be described by the following model. The main genetic defect (e.g., gene mutation or chromosomal aberration) produces the essential clinical picture of the disease (a combination of hallmark symptoms), whereas common CNVs add or exacerbate phenotypic traits (especially, neurobehavioral phenotypic traits). It is important to state that common CNVs are not the cause of the disease per se. Undoubtedly, this idea requires additional experiments to be ultimately supported.

Conclusion. This study provides evidence that CNVs are important for neurodevelopmental diseases. The purpose of our communication was not to provide a new genetic cause of brain diseases. Indeed, we have proposed a model for brain disfunction in ID and ASD, which is based on an idea that common CNVs add/exacerbate phenotypic traits resulting from the main genetic defect (chromosomal aberration or gene mutation). Here, a support of this idea appears to be presented. Certainly, additional case-control studies of CNVs involving *SHANK3*, *CHAMP1* and other genes are required to identify the intrinsic role of common CNVs in ID, ASD, ADHD and epilepsy. Finally, we conclude that the mechanisms underlying neurodevelopmental diseases are far more complex than was previously recognised, even in cases associated with a well-described genomic pathology.

Financial support

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific and Technical Programme for Genetic Technologies Development for 2019-2030, Agreement № 075-15-2025-474.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Büki G, Hadzsiev K, Bene J. Copy number variations in neuropsychiatric disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(18):13671. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241813671>
2. Kushima I, Nakatochi M, Ozaki N. Copy number variations and human well-being: integrating psychiatric, physical, and socioeconomic perspectives. *Biological Psychiatry*. 2025;98(2):116-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2024.11.019>
3. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. The variome concept: focus on CNV variome. *Molecular Cytogenetics*. 2019;12:52. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13039-019-0467-8>
4. Jensen M, Girirajan S. An interaction-based model for neuropsychiatric features of copy-number variants. *PLoS Genetics*. 2019;15(1):e1007879. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007879>
5. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Systems cytogenomics: Are we ready yet? *Current Genomics*. 2021;22(2):75-78. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389202922666210219112419>
6. Binder EB. Genotype-phenotype predictions in autism: are we there yet? *American Journal of Psychiatry*. 2021;178(1):11-12. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20111589>
7. Zelenova MA, Iourov IY. Possibilities and limitations of CNV interpretation software and algorithms in *Homo Sapiens*. *Current Bioinformatics*. 2022;17(10):883-887. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574893617666220907121155>
8. Mollon J, Almasy L, Jacquemont S, et al. The contribution of copy number variants to psychiatric symptoms and cognitive ability. *Molecular Psychiatry*. 2023;28(4):1480-1493. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-023-01978-4>
9. Hujoel MLA, Handsaker RE, Sherman MA, et al. Protein-altering variants at copy number-variable regions influence diverse human phenotypes. *Nature Genetics*. 2024;56(4):569-578. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01684-z>
10. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. In silico molecular cytogenetics: a bioinformatic approach to prioritization of candidate genes and copy number variations for basic and clinical genome research. *Molecular Cytogenetics*. 2014;7(1):98. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13039-014-0098-z>
11. Forrest MP, Penzes P. Mechanisms of copy number variants in neuropsychiatric disorders: from genes to therapeutics. *Current Opinion in Neurobiology*. 2023;82:102750. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102750>
12. Neklyudova AK, Portnova GV, Rebreikina AB, et al. 40-Hz auditory steady-state response (ASSR) as a biomarker of genetic defects in the *SHANK3* gene: a case report of 15-year-old girl with a rare partial *SHANK3* duplication. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(4):1898. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22041898>
13. Modenato C, Martin-Brevet S, Moreau CA, et al. Lessons learned from neuroimaging studies of copy number variants: a systematic review. *Biological Psychiatry*. 2021;90(9):596-610. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.05.028>
14. Monteiro P, Feng G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18(3):147-157. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
15. Mitz AR, Boccuto L, Thurm A. Evidence for common mechanisms of pathology between *SHANK3* and other genes of Phelan-McDermid syndrome. *Clinical Genetics*. 2024;105(5):459-469. DOI: <https://doi.org/10.1111/cge.14503>
16. Abi Raad S, Yazbeck Karam V, Chouery E, et al. *CHAMP1*-related disorder: sharing 20 years of thorough clinical follow-up and review of the literature. *Genes*. 2023;14(8):1546. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14081546>
17. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB, et al. The cytogenomic "theory of everything": chromohelkosis may underlie chromosomal instability and mosaicism in disease and aging. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8328. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218328>

- 18.Iourov IY, Vorsanova SG, Kurinnaia OS, et al. Causes and consequences of genome instability in psychiatric and neurodegenerative diseases. *Molecular Biology*. 2021;55(1):42-53. Russian. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0026898421010158>
- 19.Szklarczyk D, Nastou K, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2025: protein networks with directionality of regulation. *Nucleic Acids Research*. 2025;53(D1):D730-D737. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1113>
- 20.Bonsi P, De Jaco A, Fasano L, et al. Postsynaptic autism spectrum disorder genes and synaptic dysfunction. *Neurobiology of Disease*. 2022;162:105564. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105564>
- 21.Li Y, Jia X, Wu H, et al. Genotype and phenotype correlations for *SHANK3* de novo mutations in neurodevelopmental disorders. *American Journal of Medical Genetics*. 2018;176(12):2668-2676. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40666>
- 22.Malara M, Lutz AK, Incearap B, et al. *SHANK3* deficiency leads to myelin defects in the central and peripheral nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(7):371. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04400-4>
- 23.Wang L, Pang K, Han K, et al. An autism-linked missense mutation in *SHANK3* reveals the modularity of Shank3 function. *Molecular Psychiatry*. 2020;25(10):2534-2555. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0324-x>
- 24.Kathuria A, Nowosiad P, Jagasia R, et al. Stem cell-derived neurons from autistic individuals with *SHANK3* mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Molecular Psychiatry*. 2018;23(3):735-746. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2017.185>
- 25.Woelfle S, Pedro MT, Wagner J, et al. Expression profiles of the autism-related *SHANK* proteins in the human brain. *BMC Biology*. 2023;21(1):254. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01712-0>
- 26.Sagi-Dain L, Goldberg Y, Peleg A, et al. The rare 13q33-q34 microdeletions: eight new patients and review of the literature. *Human Genetics*. 2019;138(10):1145-1153. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02048-y>
- 27.Levy T, Lerman B, Halpern D, et al. *CHAMP1* disorder is associated with a complex neurobehavioral phenotype including autism, ADHD, repetitive behaviors and sensory symptoms. *Human Molecular Genetics*. 2022;31(15):2582-2594. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac018>
- 28.Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, et al. Deficiency of *CHAMP1*, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype. *Brain Communications*. 2022;4(5):fcac220. DOI: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac220>
- 29.Yoshizaki Y, Ouchi Y, Kurniawan D, et al. *CHAMP1* premature termination codon mutations found in individuals with intellectual disability cause a homologous recombination defect through haploinsufficiency. *Scientific Reports*. 2024;14(1):31904. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-83435-y>
- 30.Li F, Zhang T, Syed A, et al. *CHAMP1* complex directs heterochromatin assembly and promotes homology-directed DNA repair. *Nature Communications*. 2025;16(1):1714. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56834-6>
- 31.Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB, et al. Ontogenetic and pathogenetic views on somatic chromosomal mosaicism. *Genes*. 2019;10(5):379. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10050379>
- 32.Iourov IY, Yurov YB, Vorsanova SG, et al. Chromosome instability, aging and brain diseases. *Cells*. 2021;10(5):1256. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10051256>
- 33.Iourov IY, Vorsanova SG, Kurinnaia OS, et al. Somatic mosaicism in the diseased brain. *Molecular Cytogenetics*. 2022;15(1):45. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13039-022-00624-y>
- 34.Moreau CA, Ching CR, Kumar K, et al. Structural and functional brain alterations revealed by neuroimaging in CNV carriers. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2021;68:88-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.03.002>

Received 31 July 2025

Revised 8 September 2025

Accepted 19 September 2025

Information about the authors

Ivan Y. Iourov, Doct. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences (Professor of the Russian Academy of Sciences), Head of the Professor Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Brain Cytogenetics, Mental Health Research Center; Head of the Professor Vorsanova Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Diseases, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University; Acting

head of the Department of Medical Genetics, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia, E-mail: ivan.iourov@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4134-8367>.

Oksana S. Kurinnaia, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Professor Vorsanova Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Diseases, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University; Senior Researcher, Professor Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Brain Cytogenetics, Mental Health Research Center, Moscow, Russia, E-mail: kurinnaiaos@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7087-3929>.

Maria M. Iuditskaia, Junior Researcher of Professor Y.B. Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Cytogenomics, the Brain Mental Health Research Center; Junior Researcher, Professor S.G. Vorsanova Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Disease, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: myudickaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4443-7039>.

Efim S. Karpachev, Research Laboratory Assistant, Professor S.G. Vorsanova Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Disease, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University, Russian Ministry of Health; Research Laboratory Assistant, Professor Y.B. Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Cytogenomics, the Brain Mental Health Research Center, Moscow, Russia, E-mail: efimkarpachev04@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-9654-7761>.

Kirill S. Vasin, Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher at the Professor Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Brain Cytogenetics, Mental Health Research Center; Researcher at the Professor Vorsanova Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Diseases, Veltischev Research and Clinical Institute for

Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: vasinks@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2799-3706>.

Victoria Y. Voinova, Doct. Sci. (Medicine), Head of the Department of Clinical Genetics, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University; Leading Researcher at the Professor Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Brain Cytogenetics, Mental Health Research Center, Moscow, Russia, E-mail: vivoivova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8491-0228>.

Ekaterina V. Semina, Doct. Sci. (Biology), Deputy Director for Research and Project Activities, Mental Health Research Center Moscow, Russia, E-mail: e-semina@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3927-9286>.

Yuri B. Yurov, Doct. Sci. (Biology), Professor, Honored Scientist of Russia, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Laboratory of Cytogenetics and Genomics of Mental Diseases (before 2017), Mental Health Research Center; Chief Researcher at the Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Diseases (before 2017), Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: ivan.iourov@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4134-8367>.

Yulia A. Chaika, MD, Doct. Sci. (Medicine), Director of Mental Health Research Center Moscow, Russia, E-mail: director@ncpz.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7182-2472>.

Svetlana G. Vorsanova, Doct. Sci. (Biology), Professor, Honored Scientist of Russia, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Cytogenetics of Neuropsychiatric Diseases, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University; Chief Researcher at the Professor Yurov Laboratory of Molecular Genetics and Brain Cytogenomics (before 2021), Mental Health Research Center, Moscow, Russia, E-mail: svorsanova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4869-5361>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-2

УДК 616-006.44

Частота, спектр и функциональное значение мутаций в гене *MIR-142* при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме

Е.Н. Воропаева^{1,2} , О.Б. Серегина¹ , М.С. Войтко¹ , Т.Н. Бабаева¹ ,
Н.В. Скворцова¹ , В.Н. Максимов^{1,2} , Т.И. Поспелова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет», Красный проспект, д. 52, г. Новосибирск, 630091, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», ул. Б. Богаткова, д. 175/1, г. Новосибирск, 630089, Российская Федерация

Автор для переписки: Е.Н. Воропаева (vena.81@mail.ru)

Резюме

Актуальность: *MIR-142* является единственным геном микроРНК человека, в котором при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) с высокой частотой выявляются мутации. Ранние исследования нарушений в данном гене были основаны на анализе нескольких десятков биообразцов лимфомы и не уделяли внимания оценке функционального эффекта выявленных изменений. **Цель исследования:** Описать частоту и спектр мутаций в гене *MIR-142* на крупной выборке образцов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, а также провести анализ *in silico* их функционального значения. **Материалы и методы:** Проведено прямое секвенирование по Сенгеру гена *MIR-142* в 123 образцах ДНК, выделенной из срезов FFPE-блоков биоптатов опухолевых лимфоузлов пациентов с ДВККЛ. Предсказание *in silico* генов-мишеней для каждой из «ключевых» последовательностей микроРНК выполнено с помощью онлайн-инструмента miRDB. Для определения функции генов-мишеней микроРНК проведен анализ обогащения терминов генных онтологий молекулярных функций и биологических процессов с помощью PANTHER на базе биоинформационного ресурса Gene Ontology. Для предсказания вторичной структуры «шпильки» микроРНК и расчета ее минимальной свободной энергии (dG) использовался UNAFold web server. **Результаты:** Частота мутаций в группе исследования составила 16,7%, в трех случаях имели место множественные однонуклеотидные замены в последовательности *MIR-142*. Всего выявлено 24 типа однонуклеотидных замен, транзиции преобладали над трансверсиями. Анализ распределения мутаций по последовательности гена *MIR-142* показал, что лишь 15% было локализовано в «ключевых» областях, большая же часть — за ее пределами: в последовательности зрелых цепей (30%), предшественника (40%) или первичного транскрипта (10%) микроРНК. Анализ *in silico* влияния замен, расположенных в «ключевой» последовательности, на взаимодействия микроРНК-мРНК показал, что все три выявленные в группе исследования мутации приводят к существенному изменению набора регулируемых

генов. Наиболее выраженные изменения спектра регулируемых генов установлены для п.68G/A. Практически все описанные нами мутации в той или иной степени влияли на структуру и термостабильность микроРНК «шпильки». **Заключение:** Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии мутаций в «ключевой» последовательности на переключение генов-мишеней зрелых цепей изучаемой микроРНК. Необходимы дальнейшие функциональные исследования для подтверждения влияния предсказанных изменений термодинамической стабильности и вторичной структуры на биогенез зрелых цепей микроРНК.

Ключевые слова: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома; регуляция микроРНК; экспрессия генов; miR-142; мутационный профиль; высокопроизводительное секвенирование

Для цитирования: Воропаева ЕН, Серегина ОБ, Войтко МС, и др. Частота, спектр и функциональное значение мутаций в гене *MIR-142* при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(4):607-627. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-2

Frequency, spectrum, and functional significance of mutations in the *MIR-142* gene in diffuse large B-cell lymphoma

Elena N. Voropaeva^{1,2} , Olga B. Seregina¹ , Maria S. Voytko¹ ,
Tatiana N. Babaeva¹ , Natalia V. Skvortsova¹ , Vladimir N. Maksimov^{1,2} ,
Tatiana I. Pospelova¹ 

¹ Novosibirsk State Medical University,
52 Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
175/1 B. Bogatkova St., Novosibirsk, 630089, Russia

Corresponding author: Elena N. Voropaeva (vena.81@mail.ru)

Abstract

Background: *MIR-142* is the only human microRNA gene that is highly mutated in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Early studies of abnormalities in this gene were based on the analysis of several lymphoma biospecimens and did not focus on assessing the functional effect of the detected changes. **The aim of the study:** To describe the frequency and spectrum of mutations in the *MIR-142* gene in a large sample of tumor tissue samples from patients with DLBCL, as well as to analyze their functional significance *in silico*. **Materials and methods:** Direct Sanger sequencing of the *MIR-142* gene was performed in 123 DNA samples isolated from sections of FFPE blocks from biopsies of tumor lymph nodes in patients with DLBCL. *In silico* prediction of target genes for each of the "seed" microRNA sequences was performed using the miRDB online tool. To determine the function of microRNA target genes, an analysis of the enrichment of terms of gene ontologies of molecular functions and biological processes using PANTHER based on the bioinformatics resource Gene Ontology was carried out. To predict the secondary structure of the microRNA hairpin and calculate its minimum free energy (dG), we used UNAFold web server. **Results:** The mutation rate in the study group was 16.7%, and in three cases there were multiple single-nucleotide substitutions in the *MIR-142* sequence. A total of 24 types of single nucleotide substitutions were identified, with transitions

prevailing over transversions. An analysis of the distribution of mutations in the sequence of the *MIR-142* gene showed that only 15% were localized in "key" regions, while the majority were located outside it: in the sequence of mature strands (30%), the precursor (40%) or the primary transcript (10%) of microRNAs. An *in silico* analysis of the effect of substitutions located in the "seed" sequence on microRNA-mRNA interactions showed that all three mutations identified in the study group lead to a significant change in the set of regulated genes. The most pronounced changes in the spectrum of regulated genes were found for n.68G/A. Almost all of the mutations we described affected the structure and thermal stability of the hairpin microRNAs to one degree or another. **Conclusion:** The data obtained indicate a significant effect of mutations in the "seed" sequence on the switching of target genes in the mature strands of the microRNA under study. Further functional studies needed to confirm the effect of the predicted changes in thermodynamic stability and secondary structure on the biogenesis of mature microRNA strands.

Keywords: diffuse large B-cell lymphoma; microRNA regulation; gene expression; miR-142; mutation profile; high-throughput sequencing

For citation: Voropaeva EN, Seregina OB, Voytko MS, et al. Frequency, spectrum, and functional significance of mutations in the *MIR-142* gene in diffuse large B-cell cell lymphoma. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):607-627. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-2

Введение. Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДВККЛ) относится к группе орфанных лимфопролиферативных новообразований и представляет собой агрессивную опухоль. На ее долю приходится до 60% В-клеточных и 40% всех случаев неходжкинских злокачественных лимфом. Последние десятилетия в Российской Федерации и в мире в целом наблюдается неуклонный рост заболеваемости ДВККЛ. Несмотря на внедрение в протоколы ведения пациентов с данным вариантом опухоли инновационных таргетных терапевтических опций, первичная резистентность к лечению или рецидивы заболевания констатируются у 30-40% пациентов, что связано с крайне неблагоприятным прогнозом для жизни. Все это обуславливает необходимость исследований, направленных на более глубокое понимание механизмов лимфомагенеза и молекулярной гетерогенности ДВККЛ [1].

Анализ данных полученных в рамках крупных проектов по изучению опухолевых геномов, позволил идентифицировать тысячи мутаций в генах, кодирующих белки и ассоциированных со злокачественной трансформацией [2]. В том числе, в последние годы

исследователями приложены большие усилия по характеристике генома и транскриптома ДВККЛ, включая анализ на уровне отдельных клеток [3]. Полученные данные позволили описать молекулярно-генетически различные подтипы заболевания и разработать новые прогностические модели, основанные на мутационном ландшафте [4-10], картине экспрессии генов в опухоли [11, 12, 13] или характеристике ее микроокружения [14, 15].

Вместе с тем современные знания об изменениях в нуклеотидной последовательности генома вне локусов расположения белок-кодирующих генов, составляющих около 2% от всего генома человека, в частности, в областях, которые несут информацию о некодирующих РНК, все еще ограничены. При этом некодирующие РНК, в частности, микроРНК регулируют экспрессию белок-кодирующих генов на посттранскрипционном уровне, выступают в качестве онкомиров или онкосупрессоров и считаются важными участниками онкогенеза при ДВККЛ [16, 17].

Анализ Urbanek-Trzeciak M.O. et al. (2020) крупных наборов данных секвенирования, полученных в рамках проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA),

позволил выявить и охарактеризовали более 10 000 мутаций в генах микроРНК при 33 типах новообразований [18], каждая из которых потенциально может влиять на процессинг или функционирование кодируемых ими молекул [19].

Биогенез микроРНК является сложным процессом и включает в себя два основных этапа. На первом из них длинный первичный транскрипт микроРНК (pri-miRNA), транскрибируемый из гена микроРНК, расщепляется ферментным комплексом Drosha/DGCR8 с образованием молекулы-предшественницы – пре-микроРНК (pre-miRNA). Далее пре-микроРНК подвергается вторичному расщеплению ферментом Dicer, что приводит к высвобождению дуплекса микроРНК. В последующем одна зрелая нить этого дуплекса, называемая направляющей, включается в эффекторный РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC) вместе с белком Argonaute. RISC оказывает свое влияние на мРНК генов посредством комплементарного связывания последовательностей микроРНК и мРНК, что приводит к подавлению трансляции или деградации мРНК, и, следовательно, нарушению синтеза белка [17, 20].

Одним из важных результатов работы с данными проекта TCGA стал тот факт, что *MIR-142*, кодирующий зрелые функционально активные цепи miR-142-3p и miR-142-5p, является единственным геном микроРНК человека, который рекуррентно мутирует при гемобластозах: остром миелоидном лейкозе, хроническом лимфолейкозе и различных типах В-клеточных лимфом [18]. Вместе с тем, все проведенные в настоящее время исследования мутаций в данном гене основаны на анализе нескольких десятков биообразцов опухолей. При этом в работах практически не уделено внимания оценке функционального эффекта выявленных изменений.

Цель исследования. Цель настоящего исследования заключалась в описании частоты и спектра мутаций в гене

MIR-142 на крупной выборке образцов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, а также анализе *in silico* их функционального значения.

Материал и методы исследования. Были проанализированы 125 образцов ДНК, выделенной из срезов FFPE-блоков (фиксированных формалином, залитых парафином) биоптатов опухолевых лимфоузлов пациентов с ДВККЛ, диагностированных в Городском гематологическом центре г. Новосибирска в период с 2007 по 2022 гг. Исследование было одобрено Комитетом по биоэтике Новосибирского государственного медицинского университета и проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией. От всех пациентов, включенных в это исследование, было получено добровольное информированное согласие.

Ген *MIR-142* амплифицировали описанным ранее методом [21] с использованием следующих праймеров: 5'-CTCACCTGTCACACGAGGTC-3' и 5'-CTCTTGAGCAGGAGGTCAGG-3'. Получали продукт длиной 231 п.н., включающий всю последовательность первичного транскрипта miR-142 вместе с фланкирующими областями длиной около 25 н.п. Продукты ПЦР очищали с использованием микроколонок с Sephadex™ G-50 medium и секвенировали по Сэнгеру с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и полимера POP-7 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы были проанализированы с применением программного обеспечения Chromas. Все мутации были обозначены в соответствии с нумерацией нуклеотидов в первичном транскрипте микроРНК.

Предсказание *in silico* генов-мишеней для каждой из «ключевых» последовательностей микроРНК было выполнено с помощью специального онлайн-инструмента miRDB [22]. Для построения диаграмм Венна был

использован электронный ресурс <https://www.semestr.online/graph/venn.php#vennhand> [23]. Для определения функции генов-мишеней микроРНК был проведен анализ обогащения терминов генных онтологий (GOenrichmentAnalysis) молекулярных функций и биологических процессов с помощью PANTHER [24] на базе биоинформационного ресурса Gene Ontology (GO; <http://www.geneontology.org>) [25]. Результаты со значением $p < 0,05$ после поправки на множественную проверку гипотез (FDR – False Discovery Rate)

считались статистически значимыми. Для предсказания вторичной структуры «шпильки» микроРНК и расчета ее минимальной свободной энергии (dG) использовался UNAFold web server [26].

Результаты исследования. В исследованной группе образцов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ в 21/125 (16,8%) случаев были выявлены однонуклеотидные замены в *MIR-142* в гетерозиготном состоянии. Всего 26 вариантов нуклеотидной последовательности (ВНП) (Табл. 1).

Таблица 1

Характеристика мутаций в *MIR-142*, выявленных в группе исследования, где dG – минимальная свободная энергия

Table 1

Characteristics of mutations in *MIR-142* identified in the study group, where dG is the minimum free energy

Образец	Мутация pri-miR-142		Локализация	dG, ккал/моль
	ДНК	РНК		
Норма	-	-	-	-44,9
1	n.33T/A	n.33U/A	miR-142-5p, «ключевая» последовательность	-40,3
2	n.13C/T	n.13C/U	pre-miR-142	-35,6
	n.68G/A	n.68G/A	miR-142-3p, «ключевая» последовательность	
3	n.69T/C	n.69U/C	miR-142-3p, «ключевая» последовательность	-47,3
4	n.35G/A	n.35G/A	miR-142-5p	-41,7
	n.39G/A	n.39G/A	miR-142-5p	
	n.52C/T	n.52C/U	pre-miR-142	
5	n.45C/T	n.45C/U	miR-142-5p	-43,8
6	n.40C/G	n.40C/G	miR-142-5p	-40,7
7	n.40C/T	n.40C/U	miR-142-5p	-40,0
8	n.83G/T	n.83G/U	miR-142-3p	-42,1
9	n.80A/C	n.80A/C	miR-142-3p	-40,8
10	n.95G/A	n.95G/A	pre-miR-142	-41,6
11	n.57G/C	n.57G/C	pre-miR-142	-44,9
12	n.53A/G	n.53A/G	pre-miR-142	-44,9
13	n.93C/G	n.93C/G	pre-miR-142	-41,0
14	n.92A/T	n.92A/U	pre-miR-142	-40,7
15	n.93C/T	n.93C/U	pre-miR-142	-42,6
16	n.85T/C	n.85U/C	pre-miR-142, сайт распознавания DROSHA	-42,8
17	n.23A/T	n.23A/U	pre-miR-142, сайт распознавания DROSHA	-41,1
	n.25C/T	n.25C/U	pre-miR-142, сайт распознавания DROSHA	
18	n.5C/T	n.5C/U	pri-miR-142	-44,9
19	n.100C/T	n.100C/U	pri-miR-142	-47,8
20	n.109+4G/A	n.109+4G/A	pri-miR-142+4b.p.	-
21	n.8A/C	n.8A/C	pri-miR-142	-50,2
	n.1-18C/T	n.1-18C/U	pri-miR-142–18b.p.	-

Отметим, что в 3-х случаях имели место одновременно две находки (n.13C/T в сочетании с n.68G/A, а также n.23A/T в сочетании с n.25C/T и n.8A/C в сочетании с n.1-18C/T, в 1-м случае – три мутации в

MIR-142 (n.35G/A, n.39G/A и n.52C/T) в образце (Рис. 1).

Две трети (17/26, 65,4%) ВНП составили транзиции, тогда как одну треть – трансверсии (9/26, 34,6%) (Рис. 2).

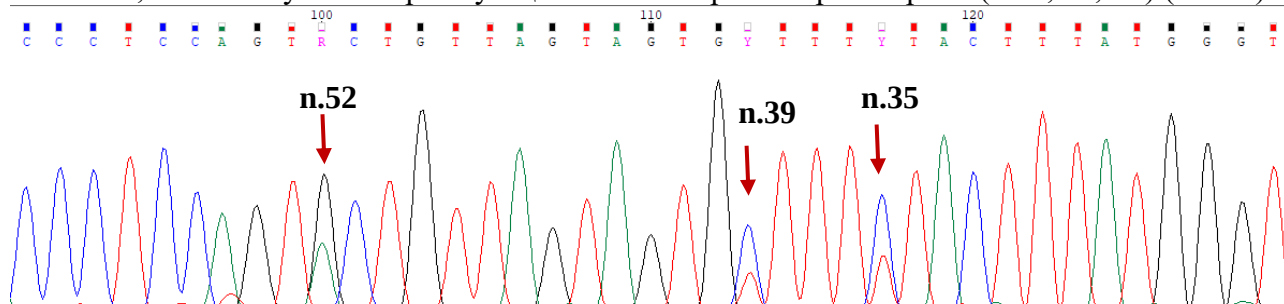


Рис. 1. Фрагмент хроматограммы сиквенса образца ДНК, содержащего три мутации в гене *MIR-142* n.35G/A, n.39G/A и n.52C/T (получен с применением обратного праймера)

Fig. 1. Fragment of the sequence chromatogram of a DNA sample containing three mutations in the *MIR-142* gene n.35G/A, n.39G/A and n.52C/T (obtained using a reverse primer)

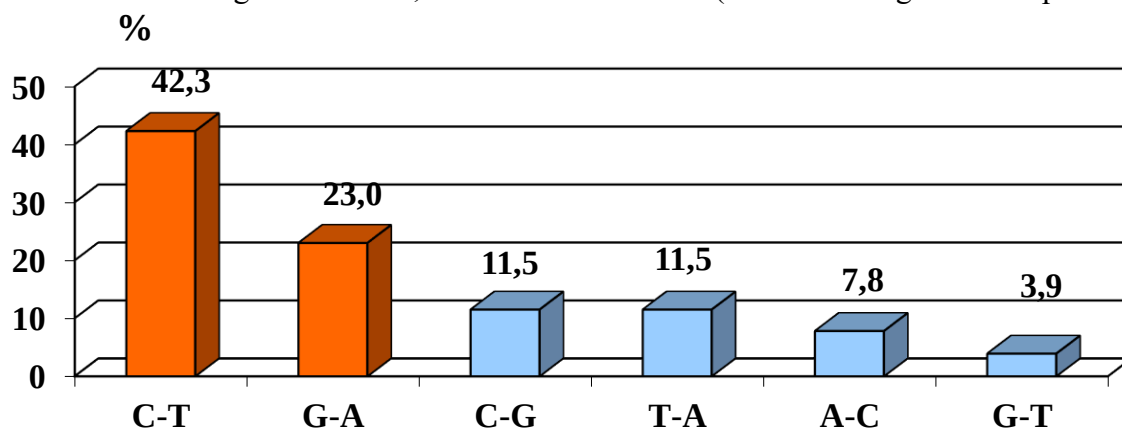


Рис. 2. Информация о частоте (%) типов ВНП в гене *MIR-142*, идентифицированных в группе исследования: оранжевым цветом обозначены транзиции, голубым – трансверсии

Fig. 2. Information on the frequency (%) of SNVs types in the *MIR-142* gene identified in the study group: orange indicates transitions, blue – transversions

Анализ типов замен показал, что наиболее распространенными были транзиции между С и Т (42,3%), а также G и А (23,0%). Среди трансверсий замены между С и G, а также Т и А составили по 11,5%, еще 7,8% составили замены между А и С и 3,9% - между G и Т.

Анализ распределения ВНП по последовательности гена показал, что только 3-и из них (11,5%) были локализованы в «ключевых» последовательностях miR-142-5p и miR-142-3p (1 и 2 случая, соответственно), тогда как 7 (26,9%) – в других участках последовательности зрелых микроРНК вне

сайтов связывания с мРНК-мишенями (4 и 2 случая, соответственно). Одиннадцать (42,3%) ВНП были локализованы в последовательности pre-miR-142 вне участков, кодирующих зрелые цепи, в том числе 3-и – в сайте распознавания DROSHA. Еще три (11,5%) ВНП – в последовательности pri-miR-142 за пределами участков, кодирующих микроРНК-предшественника. В двух случаях (7,8%), выявлены однонуклеотидные замены в непосредственной близости к 5'- и 3'-концам pri-miR-142 (Рис. 3).

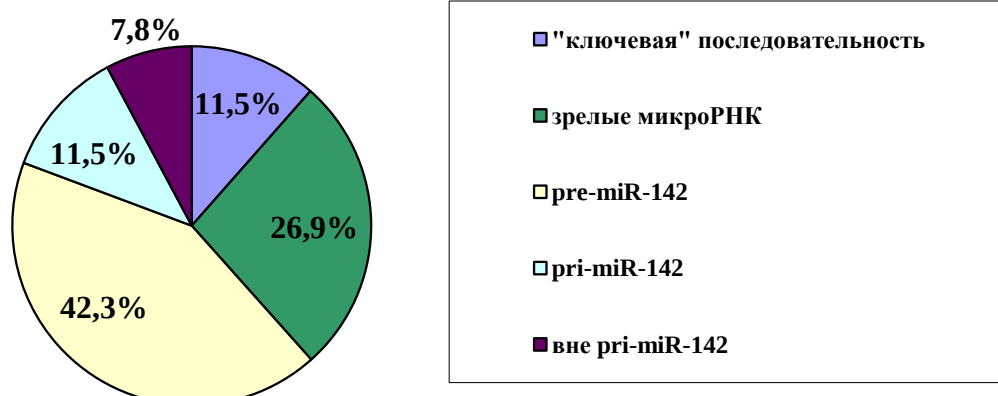


Рис. 3. Данные о количестве ВНП, идентифицированных в различных участках гена *MIR-142*
Fig. 3. Data on the number of SNVs identified in various regions of the *MIR-142* gene

Учитывая, что три из выявленных ВНП затрагивали «ключевые» последовательности зрелых цепей микроРНК, была проведена идентификация наборов генов-мишеней с помощью сервиса miRDB [22]. Прогнозирование проводилось для «ключевых» последовательностей miR-142-5p и miR-142-3p в норме и для каждого из мутантных вариантов.

Анализ выявил значительное изменение профиля предсказанных взаимодействий микроРНК-мишень (Рис. 4). В случае п.33U/A ключевой последовательности miR-142-5p имело место увеличение (с 1133 до 1328), тогда

как в случае п.68G/A и п.69U/C ключевой последовательности miR-142-3p – уменьшение (с 418 до 312 и с 418 до 406, соответственно) числа потенциальных мишеней. При этом наблюдалось значительное изменение спектра взаимодействия, особенно выраженное для п.68G/A miR-142-3p. Согласно биоинформатическому предсказанию, при данной мутации сохраняется контроль лишь над 18/418 (4,3%) канонических мРНК мишеней, что значительно меньше, чем при п.69U/C miR-142-3p (145/418, 34,7%) и п.33U/A miR-142-5p (456/1133, 40,2%).

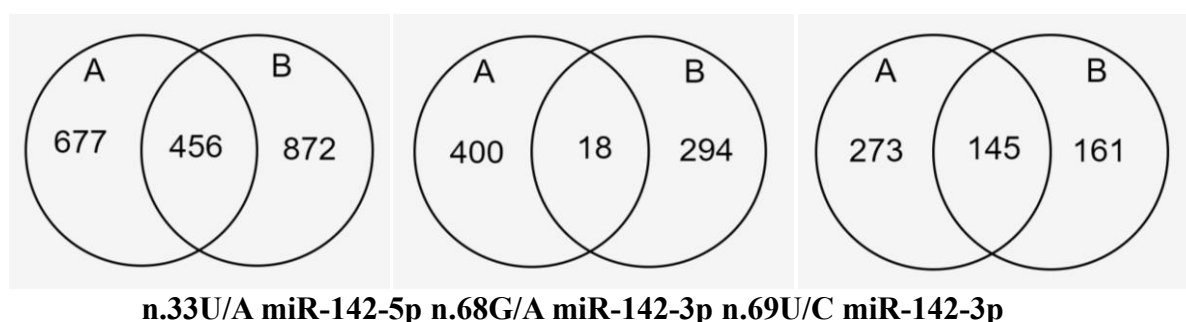
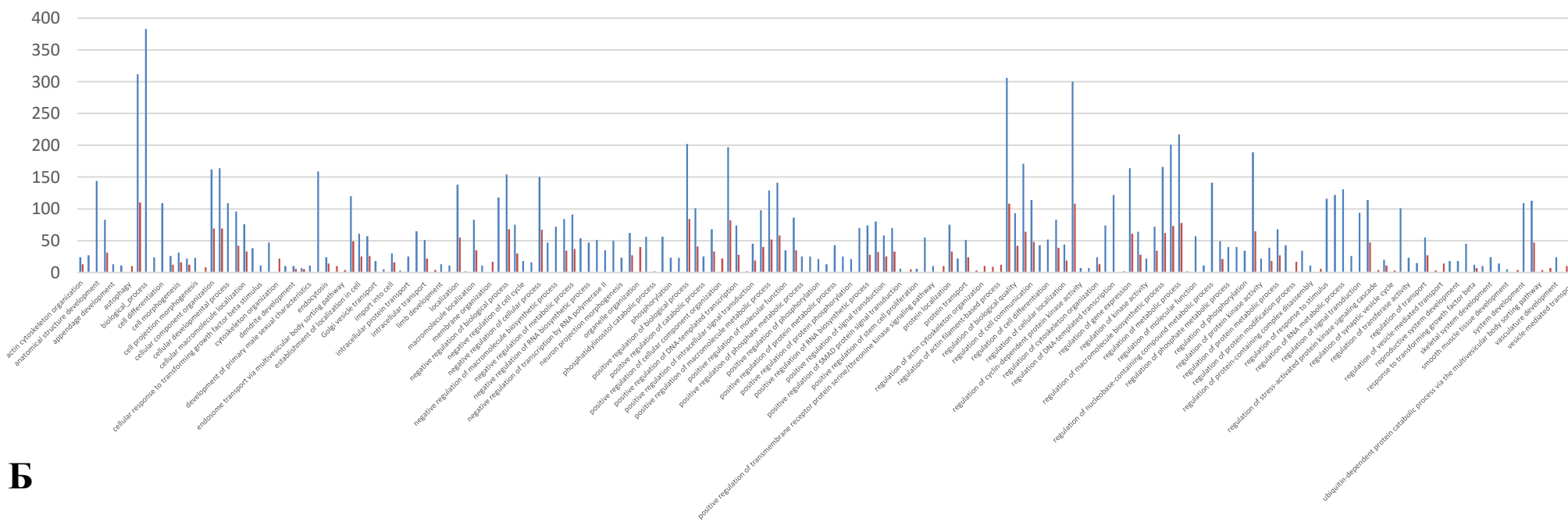
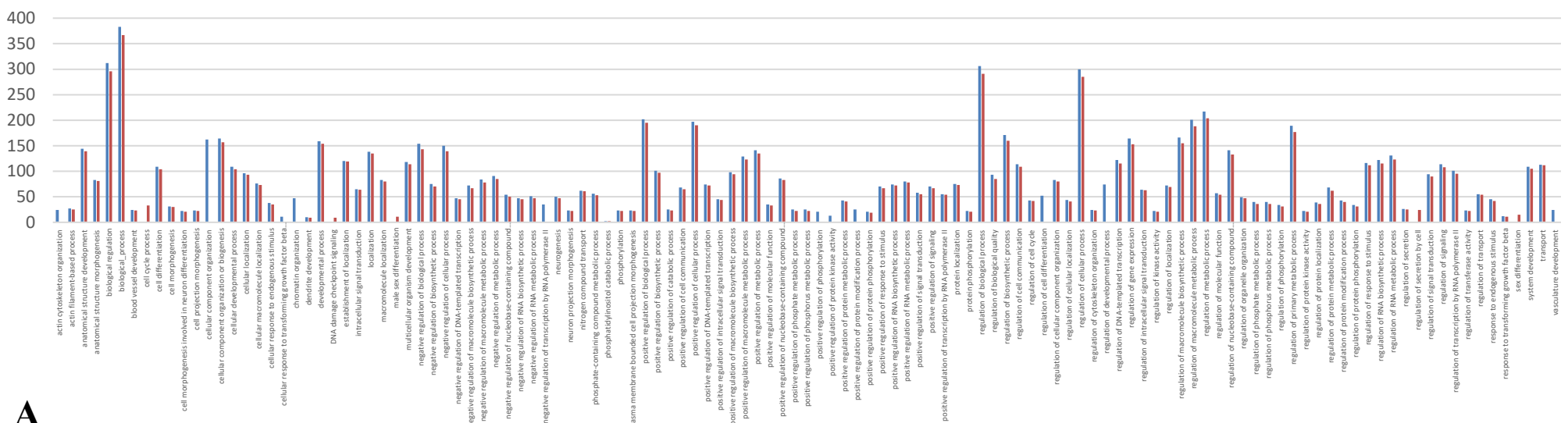


Рис. 4. Диаграммы Венна изменения спектра мишеней, предсказанных для микроРНК в норме (область круга А) и при изменении «ключевых» последовательностей в результате мутаций (область круга В), число общих мишеней указано в области пересечения двух кругов

Fig. 4. Venn diagrams of changes in the target spectrum predicted for microRNAs in normal conditions (area of circle A) and with changes in "key" sequences as a result of mutations (area of circle B), the number of common targets is indicated in the area of intersection of the two circles





miR-142-3p (оранжевые столбцы); (B) miR-142-5p в норме (синие столбцы) и п.33 U/A miR-142-3p (оранжевые столбцы)

Fig. 5. Statistically significant ($p < 0.05$) results of enriching the terms of gene ontologies of biological processes for lists of microRNA target genes (A) miR-142-3p in normal (blue bars) and n.68G/A miR-142-3p (orange bars); (B) miR-142-3p is normal (blue bars) and n.69U/C miR-142-3p (orange bars); (C) miR-142-5p is normal (blue bars) and n.33 U/A miR-142-3p (orange bars)

Число случаев

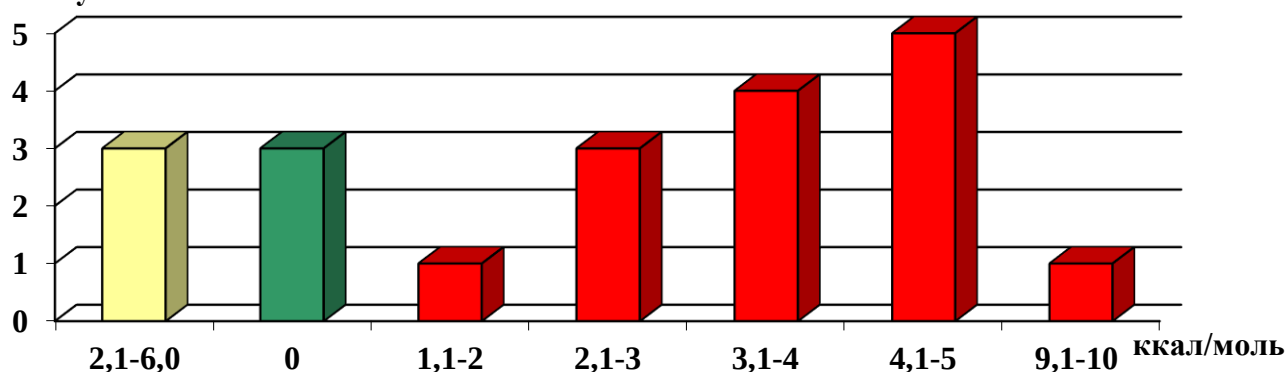


Рис. 6. Распределение изменений минимальной свободной энергии ($|\Delta dG|$, ккал/моль) вторичной структуры pri-miR-142, индуцированных вариантами нуклеотидной последовательности: желтые столбцы обозначают увеличение, зеленые – отсутствие изменений, в то время как красные – уменьшение минимальной свободной энергии

Fig. 6. Distribution of changes in the minimum free energy ($|\Delta dG|$, kcal/mol) of the secondary structure of pri-miR-142 induced by variants of the nucleotide sequence: yellow columns indicate an increase, green – no changes, while red – a decrease in the minimum free energy

На следующем этапе был проведен анализ обогащения терминов генных онтологий для каждого набора генов-мишеней (референсного и измененного в результате каждой из мутаций). Анализ выявил статистически значимое ($p < 0,05$) обогащение различных наборов терминов генных онтологий для miR-142-3p в норме и при п.68G/A или п.69U/C, а также для miR-142-5p в норме и при п.33U/A (Рис. 5).

Чтобы оценить влияние выявленных замен на вторичную структуру «шпильки» и ее термодинамическую стабильность, использовался UNAFold web server [26]. Сначала была проанализирована вторичная

структура pri-miR-142 в норме, далее каждого из 19 мутантных вариантов ее последовательности. Показано, что в 17/19 (89,5%) случаев ВМП приводили к ненулевому изменению минимальной свободной энергии ($|\Delta dG|$) в диапазоне от 1,1 до 9,3 ккал/моль (Рис. 6). Только три из них приводили к приросту минимальной свободной энергии, а, следовательно, повышению термодинамической стабильности «шпильки», тогда как остальные – к их снижению. Более того, практически все ВМП влияли на структуру «шпильки». Примеры представлены на рисунке 7.

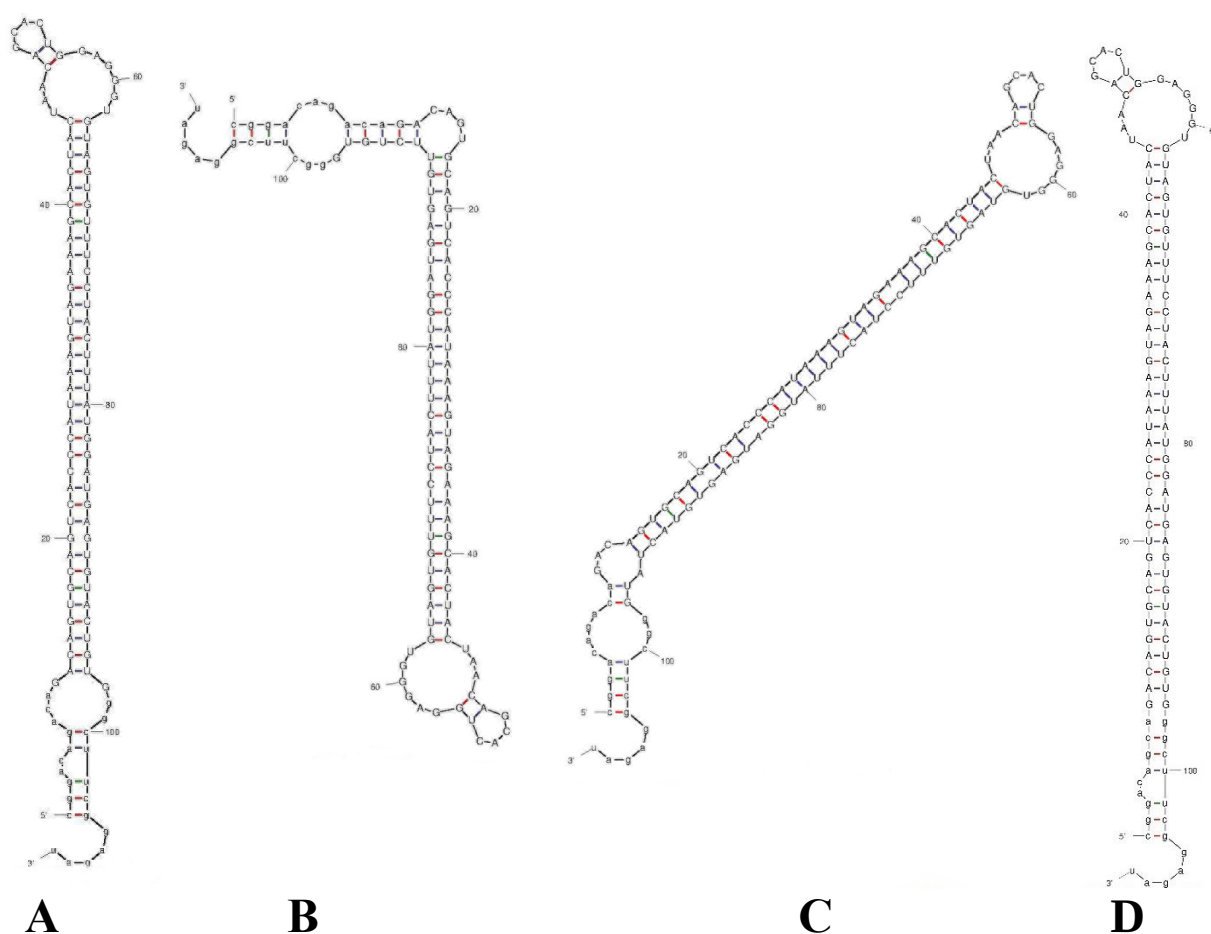


Рис. 7. Графическая визуализация влияния ВНП на вторичную структуру «шпильки» микроРНК: норма (А), в случае n.92A/U pre-miR-142 (В), n.95G/A pre-miR-142 (С) и n.8A/C pri-miR-142 (D)

Fig. 7. Graphical visualization of the effect of SNPs on the secondary structure of the microRNA hairpin: norm (A), in the case of n.92A/U pre-miR-142 (B), n.95G/A pre-miR-142 (C) and n.8A/C pri-miR-142 (D)

Обсуждение. Мутации в гене *MIR-142* описаны в единичных случаях фолликулярной лимфомы [27, 28, 29], хронического лимфоидного лейкоза [30], а также острого миелоидного лейкоза и миелодиспластического синдрома [31, 32], но наиболее часто выявляются при ДВККЛ [33]. В данном исследовании подробно охарактеризована частота и спектр ВНП в гене *MIR-142* в опухолевой лимфоидной ткани крупной выборки пациентов с ДВККЛ (123 человека) и провели анализ *in silico* их функционального эффекта.

Частота мутаций в группе исследования составила 16,8%, что укладывается в описанный в литературе диапазон – от 12 до 20% [27, 34, 35, 36], при

этом в четырех случаях имели место множественные однонуклеотидные замены в последовательности *MIR-142*, что косвенно свидетельствует о возможности феномена катаэггиса при ДВККЛ в области расположения данного гена [37]. Под катаэггисом понимают явление гипермутаций, наблюдающееся при ряде злокачественных новообразований и характеризующееся локализованными кластерами однонуклеотидных замен – шесть или более в пределах тысячи п.н. [38].

Всего было выявлено 26 типов однонуклеотидных замен, широко разбросанных по последовательности гена, что отличает ДВККЛ от других типов

гемобластозов. Так, согласно данным литературы, все известные в настоящее время ВНП в данном гене при остром миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме описаны только в «ключевой» области зрелой цепи miR-142-3p, ответственной за связывание генов-мишеней [31, 32, 39-41], как и единственная описанная в настоящее время мутация в *MIR-142* при лимфоме Беркитта [18]. При фолликулярной лимфоме верифицированные ВНП затрагивают последовательность miR-142-3p [27, 28], а при хроническом лимфолейкозе – в большинстве случаев локализованы в miR-142-5p [21, 29, 30, 39].

Полученные данные позволяют утверждать, что в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ в гене *MIR-142* транзиции преобладают над трансверсиями. Среди ВНП транзиции пиримидиновых оснований С-Т составили 42,3%, далее по частоте следовали транзиции пуриновых оснований А-Г (23,0%). Трансверсии (замена пиримидинового основания на пуриновое, либо наоборот) суммарно составили лишь треть (34,7%) находок, что согласуется с данными по спектру однонуклеотидных замен в других генах при новообразованиях человека [42, 43]. Причинами данного явления считают, как более частое возникновение транзиций при работе ДНК-полимераз в клетках, так и их селекцию в ходе опухолевой прогрессии [44].

Анализ распределения ВНП в гене *MIR-142* показал, что лишь небольшое их количество (11,5%) было локализовано в «ключевых» областях, большая же часть – за ее пределами: в последовательности зрелых цепей (26,9%), предшественника (42,3%) или первичного транскрипта (11,5%) микроРНК, что аналогично данным исследований других генов микроРНК. В двух случаях (7,8%), выявлены однонуклеотидные замены в непосредственной близости к 5'- и 3'-концам pri-miR-142. Наблюдающееся увеличение частоты ВНП в генах, кодирующих микроРНК, в направлении от

«ключевой» области и зрелых последовательностей к последовательности микроРНК-предшественника, как полагают, связано с явлениями отбора в опухоли функционально-значимых замен [20]. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что предшественник микроРНК-шпильки имеет довольно «хрупкую» структуру, и самые различные ВНП способны нарушать реализацию функции кодируемой микроРНК за счет изменения трехмерной организации предшественника.

В этой связи нами выполнялся биоинформатический анализ эффекта идентифицированных однонуклеотидных замен на переключение генов-мишеней, а также стабильность и вторичную структуру «шпильки» микроРНК. По данным базы miRDB канонический вариант miR-142-3p потенциально нацелен на 418, тогда как miR-142-5p – на 1133 мРНК-мишеней [22]. Анализ *in silico* влияния ВНП, расположенных в «ключевой» последовательности, на взаимодействия микроРНК-мРНК показал, что все три выявленные в группе исследования замены приводят к существенному изменению набора регулируемых генов. В случае p.33U/A 456 (40,2%) генов-мишеней оставались общими с канонической зрелой miR-142-5p, в то время как 677 (59,8%) были утрачены, а еще 872 приобретены. Аналогичная тенденция наблюдалась для p.69U/C: 145 (34,7%) общих с miR-142-3p в норме, утрата 273 (65,3%) и приобретение 161 новых генов-мишеней. Наиболее же выраженные изменения спектра регулируемых генов установлены для p.68G/A, при которой, согласно предсказанию сервиса miRDB, сохраняется контроль лишь над 18 (4,3%) каноническими мРНК мишенями miR-142-3p, тогда как 273 (65,7%) и 161 мишень утрачиваются и приобретаются, соответственно.

Чтобы выяснить, могут ли такие изменения в спектре генов-мишеней иметь дальнейшие последствия, влиять на биологические пути и, как следствие, на

функционирование клеток, был проведен анализ обогащения терминов генных онтологий для полученных списков генов. Показано, что изменения в наборах генов-мишеней микроРНК в результате выявленных в группе исследования однонуклеотидных замен в областях «ключевых» последовательностей зрелых цепей miR-142 нашли свое отражение в генных онтологиях биологических процессов. Для всех трех мутаций идентифицированы отличные число и наборы терминов генных онтологий по сравнению с референсными микроРНК. Общая тенденция заключается в следующем. Несмотря на то, что для ВНП «ключевой» области miR-142-3p многие термины генных онтологий были общими с референсной последовательностью, в случае мутации количество задействованных генов-мишеней в одном и том же процессе для п.68G/A было несколько ниже, а для п.69U/C существенно ниже по сравнению с соответствующей нормальной зрелой цепью микроРНК. Важно отметить, что недавнее функциональное исследование п.69U/C и п.68G/A показало, что, несмотря на локализацию в miR-142-3p, обе они приводят к снижению уровня как miR-142-3p, так и miR-142-5p [18].

Среди факторов, на которые влияла п.68G/A, были жизненно важные клеточные процессы, связанные с клеточным ответом на стимул трансформирующего фактора роста β , организацией хроматина, регуляцией транскрипции РНК-полимеразой II, активности протеинкиназ, дифференцировки клеток, клеточного цикла, контрольной точки повреждения ДНК, а также развитие сосудистой сети.

В случае п.69U/C наиболее значимыми были генные онтологии, связанные с дифференцировкой клеток, клеточным ответом на стимул трансформирующего фактора роста-бета, организацией хроматина, внутриклеточной сигнальной трансдукцией, регуляцией метаболизма, клеточного цикла, транскрипции, процесса биосинтеза ДНК,

макромолекул и соединений, аутофагии, трансмембранной передачи сигнала, убиквитин-зависимого катаболизма белков, системным развитием сосудистой сети, распространением клеток, зависящим от адгезии.

Тогда как для п.33U/A «ключевой» области miR-142-5p в сравнении с референсной последовательностью наблюдалось кардинальное изменение картины обогащения терминов генных онтологий биологических процессов регуляции дифференцировки клеток, клеточного ответа на эндогенный стимул, внутриклеточной передачи сигналов, транскрипции, стабильности мРНК, биосинтеза и метаболизма макромолекул и клеточного роста.

Вместе с тем конкретный перечень генов, регулируемых каждым из мутантных вариантов, являются предсказанными и, безусловно, нуждаются в дальнейшей экспериментальной проверке. Так, например, описаны случаи, когда изменения в «ключевой» последовательности микроРНК не приводили к полной утрате контроля над мишенью: даже в случае неточных взаимодействий сохранялась та или иная степень репрессивной активности [45]. С другой стороны, установлена возможность связывания микроРНК с 5'-НТП мРНК или взаимодействия между 3'-НТП мРНК и микроРНК вне «ключевой» последовательности, что не учитывается в ходе анализа *in silico* [46].

Следует отметить также, что мутации во всех трех положениях гена *MIR-142* были описаны ранее при гемобластозах [39]. ВНП в положении п.69 по данным работ других авторов являются наиболее частыми, в основном представлены заменой U/C и зарегистрированы при ДВККЛ, фолликулярной лимфоме и хроническом лимфоидном лейкозе. Замена п.68G/A также уже регистрировалась при ДВККЛ, тогда как при ОМЛ ВНП в данном положении были представлены другой заменой – G/C. В позиции п.33 ранее при фолликулярной лимфоме была описана

отличная от выявленной нами замены U/A замена U/C.

Большинство ВВП, идентифицированных в данном исследовании, расположены за пределами «ключевой» области, следовательно, они не оказывают прямого влияния на выбор гена-мишени микроРНК. В литературе имеются данные о том, что ВВП, расположенные в последовательности предшественника микроРНК, оказывают существенное влияние функционирование микроРНК, начиная с ядерного и цитоплазматического этапов созревания и заканчивая термодинамической стабильностью, формированием вторичной структуры, отбором цепей, включаемых в RISC, что в конечном итоге отражается на уровне их экспрессии [47].

Три из ВВП, выявленных нами, затрагивали сайт распознавания DROSHA. Их прямым функциональным эффектом может быть нарушение созревания pri-miR-142 до pre-miR-142. Однако, все без исключения выявленные замены потенциально могут влиять на вторичную структуру предшественников микроРНК и оказывать существенное влияние на биогенез зрелых цепей [45].

С применением UNAFold web server нами были определены наиболее стабильная (в термодинамическом равновесии) вторичная конформация «шпильки» микроРНК и ее минимальная свободная энергия (dG), которые зависят от таких факторов как длина молекулы, состав нуклеотидов, а также последовательность их расположения в цепочке. Минимальная свободная энергия может быть рассчитана путем сложения свободных энергий компонентов: взаимодействующих комплементарно пар оснований, выпуклостей и петель. При этом в ряду микроРНК одинакового размера наиболее структурированной и стабильной считается та, которая имеет наибольшее отрицательное значение минимальной свободной энергии [48].

Анализ показал, что в 89,5% случаев, выявленные в группе исследования ВВП приводили к изменению минимальной

свободной энергии в диапазоне от 1,1 до 9,3 ккал/моль. Практически все они приводили к снижению минимальной свободной энергии, а, следовательно, уменьшению стабильности «шпильки». Еще три не сопровождались какими-либо сдвигами и, возможно, не влияют на стабильность микроРНК. Тогда как еще три замены (упомянутая ранее п.69T/C, а также п.8A/C и п.100C/T), согласно предсказанию UNAFold web server, могут стабилизировать вторичную структуру молекулы. Стоит отметить, что Gong J. et al. обобщили имеющиеся исследования в этой области и установили, что изменения минимальной свободной энергии более, чем на 2,0 ккал/моль существенно влияют на выработку зрелой микроРНК [49], но даже изменения ниже этого порога могут изменять их биогенез [50]. Также практически все описанные нами ВВП, за исключением трех, в той или иной степени, иногда существенно влияли на структуру микроРНК «шпильки».

Заключение. Частота мутаций в гене *MIR-142* в группе исследования составила 16,8%. При этом в каждом пятом случае имели место множественные однонуклеотидные замены, что косвенно свидетельствует о возможности феномена катаэггиса при ДВККЛ в области расположения данного гена. В целом полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии ВВП в «ключевых» последовательностях на переключение генов-мишеней зрелых цепей изучаемой микроРНК, тогда как самые различные ВВП способны нарушать трехмерную организацию «шпильки» микроРНК предшественника. Необходимы дальнейшие функциональные исследования для подтверждения влияния предсказанных изменений термодинамической стабильности и вторичной структуры на биогенез зрелых цепей микроРНК.

Информация о финансировании

Работа выполнена за счет средств гранта Российского Научного Фонда № 25-25-00068.

Financial support

The work was funded by the Russian Science Foundation Grant No. 25-25-00068.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Поддубная ИВ, Бабичева ЛГ, Барях ЕА. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома: штрихи к эпидемиологическому портрету. Современная Онкология. 2023;25(3):342-345. DOI: <https://doi.org/10.26442/18151434.2024.2.202798>
2. Heath AP, Ferretti V, Agrawal S, et al. The NCI Genomic Data Commons. Nature Genetics. 2021;53(3):257-262. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00791-5>
3. Ye X, Wang L, Nie M, et al. A single-cell atlas of diffuse large B cell lymphoma. Cell Reports. 2022;39(3):110713. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110713>
4. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. Blood. 2020;135(20):1759-1771. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.2019003535>
5. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. Nature Medicine. 2018;24(5):679-690. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>
6. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. Cancer Cell. 2020;37(4):551-568.e14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>
7. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. New England journal of medicine. 2018;378(15):1396-1407. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>
8. Воропаева ЕН, Поспелова ТИ, Воевода МИ. Ассоциация полиморфизма Arg399Gln гена репарации ДНК хрсс1 с риском развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности. Гематология и трансфузиология. 2013;58(1):10-14.
9. Воропаева ЕН, Поспелова ТИ, Воевода МИ. Ген TP53 при Диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Новосибирск: Наука; 2018.
10. Березина ОВ, Вайнер АС, Воропаева ЕН, и др. Влияние однонуклеотидных замен в генах фолатного цикла на риск развития агрессивных неходжкинских лимфом. Сибирское медицинское обозрение. 2011;69(3):22-26.
11. Yan J, Yuan W, Zhang J, et al. Identification and Validation of a Prognostic Prediction Model in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Frontiers in Endocrinology. 2022;13:846357. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.846357>
12. Pan M, Yang P, Wang F, et al. Transcriptome Data Analysis Reveals Prognostic Signature Genes for Overall Survival Prediction in Diffuse Large B Cell Lymphoma. Frontiers in Genetics. 2021;12:648800. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.648800>
13. Orgueira AM, Arias JAD, López MC, et al. Prognostic Stratification of Diffuse Large B-cell Lymphoma Using Clinico-genomic Models: Validation and Improvement of the LymForest-25 Model. HemaSphere. 2022;6(4):e706. DOI: <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000706>
14. Merdan S, Subramanian K, Ayer T, et al. Gene expression profiling-based risk prediction and profiles of immune infiltration in diffuse large B-cell lymphoma. Blood Cancer Journal. 2021;11(1):2. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00404-0>
15. Steen CB, Luca BA, Esfahani MS, et al. The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell. 2021;39(10):1422-1437.e10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.011>
16. Machowska M, Galka-Marciniak P, Kozłowski P. Consequences of genetic variants in miRNA genes. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2022;20:6443-6457. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.036>
17. Voropaeva EN, Pospelova TI, Orlov YL, et al. The Methylation of the p53 Targets the Genes MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A and MIR-34B/C in the Tumor Tissue of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Genes. 2022;13(8):1401. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13081401>
18. Urbanek-Trzeciak MO, Galka-Marciniak P, Nawrocka PM, et al. Pan-cancer analysis of

somatic mutations in miRNA genes. *EBioMedicine*. 2020;61:103051. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103051>

19. Voropaeva EN, Orlov YL, Loginova AB, et al. Deregulation mechanisms and therapeutic opportunities of p53-responsive microRNAs in diffuse large B-cell lymphoma. *PeerJ*. 2025;13:e18661. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.18661>

20. Pawlina-Tyszkowski K, Semik-Gurgul E, Gurgul A, et al. Application of the targeted sequencing approach reveals the single nucleotide polymorphism (SNP) repertoire in microRNA genes in the pig genome. *Scientific Reports*. 2021;11(1):9848. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89363-5>

21. Galka-Marciniak P, Kandała Z, Tire A, et al. Mutations in the miR-142 Gene Are Not Common in Myeloproliferative Neoplasms. *Scientific Reports*. 2022;12:10924. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15162-1>

22. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*. 2020;48(D1):D127-D131. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>

23. Диаграммы Эйлера-Венна [Электронный ресурс] [дата обращения: 20.03.2025]. URL: <https://www.semantr.online/graph/venn.php#venn-hand>

24. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, et al. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*. 2022;31(1):8-22. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.4218>

25. Aleksander SA, Balhoff J, Carbon S, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*. 2023;224(1):iyad031. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>

26. The UNAFold Web Server [Internet] [cited 2025 March 20]. Available from: <https://www.unafold.org/>

27. Hezaveh K, Kloetgen A, Bernhart SH, et al. Alterations of microRNA and microRNA-regulated messenger RNA expression in germinal center B-cell lymphomas determined by integrative sequencing analysis. *Haematologica*. 2016;101(11):1380-1389. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.143891>

28. Bouska A, Zhang W, Gong Q, et al. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia*.

2017;31(1):83-91. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2016.175>

29. Rheinbay E, Nielsen MM, Abascal F, et al. Analyses of non-coding somatic drivers in 2,658 cancer whole genomes. *Nature*. 2020;578(7793):102-111. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1965-x>

30. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526(7574):519-24. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14666>

31. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2059-2074. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>

32. Thol F, Scherr M, Kirchner A, et al. Clinical and functional implications of microRNA mutations in a cohort of 935 patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015;100(4):e122-e124. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.120345>

33. Menegatti J, Nakel J, Stepanov YK, et al. Changes of Protein Expression after CRISPR/Cas9 Knockout of miRNA-142 in Cell Lines Derived from Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancers*. 2022;14(20):5031. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14205031>

34. Morin RD, Assouline S, Alcaide M, et al. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(9):2290-2300. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2123>

35. Kwanhian W, Lenze D, Alles J, et al. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Medicine*. 2012;1(2):141-155. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.29>

36. Hornshøj H, Nielsen MM, Sinnott-Armstrong NA, et al. Pan-cancer screen for mutations in non-coding elements with conservation and cancer specificity reveals correlations with expression and survival. *npj Genomic Medicine*. 2018;3:1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0040-5>

37. Radke J, Ishaque N, Koll R, et al. The genomic and transcriptional landscape of primary central nervous system lymphoma. *Nature Communications*. 2022;13(1):2558. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30050-y>

38. Veerla S, Staaf J. Kataegis in clinical and molecular subgroups of primary breast cancer. *npj*

Breast Cancer. 2024;10(1):32. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41523-024-00640-8>

39.Huang W, Paul D, Calin GA, et al. miR-142: A Master Regulator in Hematological Malignancies and Therapeutic Opportunities. Cells. 2023;13(1):84. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells13010084>

40.Liang J, Oyang L, Rao S, et al. Potential Target for Tumor Therapy. Frontiers in Oncology. 2021;11:674426. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.674426>

41.Marshall A, Kasturiarachchi J, Datta P, et al. Mir142 loss unlocks IDH2R140-dependent leukemogenesis through antagonistic regulation of HOX genes. Scientific Reports. 2020;10(1):19390. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76218-8>

42.Soltis AR, Bateman NW, Liu J, et al. Proteogenomic analysis of lung adenocarcinoma reveals tumor heterogeneity, survival determinants, and therapeutically relevant pathways. Cell Reports Medicine. 2022;3(11):100819. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100819>

43.Sato K, Akamatsu H, Koh Y, et al. Differential properties of KRAS transversion and transition mutations in non-small cell lung cancer: associations with environmental factors and clinical outcomes. BMC Cancer. 2022;22(1):1148. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10246-7>

44.Lyons DM, Lauring AS. Evidence for the Selective Basis of Transition-to-Transversion Substitution Bias in Two RNA Viruses. Molecular Biology and Evolution. 2017;34(12):3205-3215. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx251>

45.Mildner A, Chapnik E, Varol D, et al. MicroRNA-142 controls thymocyte proliferation. European Journal of Immunology. 2017;47(7):1142-1152. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201746987>

46.Quémener AM, Bachelot L, Aubry M, et al. Non-canonical miRNA-RNA base-pairing impedes tumor suppressor activity of miR-16. Life Science Alliance. 2022;5(12):e202201643. DOI: <https://doi.org/10.26508/lsa.202201643>

47.Busseau I, Mockly S, Houbroun É, et al. Evaluation of microRNA variant maturation prior to genome edition. Biochimie. 2024;217:86-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.06.007>

48.Jouravleva K, Vega-Badillo J, Zamore PD. Principles and pitfalls of high-throughput analysis of microRNA-binding thermodynamics and kinetics by RNA Bind-n-Seq. Cell Reports Methods. 2022;2(3):100185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100185>

49.Gong J, Tong Y, Zhang HM, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. Human Mutation. 2012;33(1):254-263. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.21641>

50.Sheng P, Flood KA, Xie M. Short Hairpin RNAs for Strand-Specific Small Interfering RNA Production. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020;8:940. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00940>

References

1. Poddubnaya IV, Babicheva LG, Bariakh EA. Diffuse large B-cell lymphoma: strokes to the epidemiological portrait. A review. Journal of Modern Oncology. 2023;25(3):342-345. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26442/18151434.2024.2.202798>

2. Heath AP, Ferretti V, Agrawal S, et al. The NCI Genomic Data Commons. Nature Genetics. 2021;53(3):257-262. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00791-5>

3. Ye X, Wang L, Nie M, et al. A single-cell atlas of diffuse large B cell lymphoma. Cell Reports. 2022;39(3):110713. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110713>

4. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. Blood. 2020;135(20):1759-1771. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.2019003535>

5. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. Nature Medicine. 2018;24(5):679-690. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>

6. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. Cancer Cell. 2020;37(4):551-568.e14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>

7. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. New England journal of medicine. 2018;378(15):1396-1407. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>

8. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI. Association of DNA repair gene xrccl polymorphism ARG399GLN with high-grade nonhodgkin's lymphoma risk. Russian journal of

hematology and transfusiology. 2013;58(1):10-14. Russian.

9. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI. The TP53 gene in diffuse B-large cell lymphoma. Novosibirsk: Nauka; 2018. Russian.

10. Berezina OV, Weiner AS, Voropaeva EN, et al. Influence of single-nucleotide replacements in genes of folate cycle on risk of aggressive Non-hodgkin's lymphoma development. Siberian Medical Review. 2011;69(3):22-26. Russian.

11. Yan J, Yuan W, Zhang J, et al. Identification and Validation of a Prognostic Prediction Model in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Frontiers in Endocrinology. 2022;13:846357. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.846357>

12. Pan M, Yang P, Wang F, et al. Transcriptome Data Analysis Reveals Prognostic Signature Genes for Overall Survival Prediction in Diffuse Large B Cell Lymphoma. Frontiers in Genetics. 2021;12:648800. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.648800>

13. Orgueira AM, Arias JÁD, López MC, et al. Prognostic Stratification of Diffuse Large B-cell Lymphoma Using Clinico-genomic Models: Validation and Improvement of the LymForest-25 Model. HemaSphere. 2022;6(4):e706. DOI: <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000706>

14. Merdan S, Subramanian K, Ayer T, et al. Gene expression profiling-based risk prediction and profiles of immune infiltration in diffuse large B-cell lymphoma. Blood Cancer Journal. 2021;11(1):2. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00404-0>

15. Steen CB, Luca BA, Esfahani MS, et al. The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell. 2021;39(10):1422-1437.e10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.011>

16. Machowska M, Galka-Marciniak P, Kozłowski P. Consequences of genetic variants in miRNA genes. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2022;20:6443-6457. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.036>

17. Voropaeva EN, Pospelova TI, Orlov YL, et al. The Methylation of the p53 Targets the Genes MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A and MIR-34B/C in the Tumor Tissue of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Genes. 2022;13(8):1401. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13081401>

18. Urbanek-Trzeciak MO, Galka-Marciniak P, Nawrocka PM, et al. Pan-cancer analysis of somatic mutations in miRNA genes.

EBioMedicine. 2020;61:103051. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103051>

19. Voropaeva EN, Orlov YL, Loginova AB, et al. Deregulation mechanisms and therapeutic opportunities of p53-responsive microRNAs in diffuse large B-cell lymphoma. PeerJ. 2025;13:e18661. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.18661>

20. Pawlina-Tyszko K, Semik-Gurgul E, Gurgul A, et al. Application of the targeted sequencing approach reveals the single nucleotide polymorphism (SNP) repertoire in microRNA genes in the pig genome. Scientific Reports. 2021;11(1):9848. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89363-5>

21. Galka-Marciniak P, Kanduła Z, Tire A, et al. Mutations in the miR-142 Gene Are Not Common in Myeloproliferative Neoplasms. Scientific Reports. 2022;12:10924. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15162-1>

22. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. Nucleic Acids Research. 2020;48(D1):D127-D131. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>

23. Euler-Venn diagrams [Internet] [cited 2025 March 20]. Russian. Available from: <https://www.semestr.online/graph/venn.php#venn-hand>

24. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, et al. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. Protein Science. 2022;31(1):8-22. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.4218>

25. Aleksander SA, Balhoff J, Carbon S, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. Genetics. 2023;224(1):iyad031. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>

26. The UNAFold Web Server [Internet] [cited 2025 March 20]. Available from: <https://www.unafold.org/>

27. Hezaveh K, Kloetgen A, Bernhart SH, et al. Alterations of microRNA and microRNA-regulated messenger RNA expression in germinal center B-cell lymphomas determined by integrative sequencing analysis. Haematologica. 2016;101(11):1380-1389. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.143891>

28. Bouska A, Zhang W, Gong Q, et al. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. Leukemia. 2017;31(1):83-91. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2016.175>

29. Rheinbay E, Nielsen MM, Abascal F, et al. Analyses of non-coding somatic drivers in 2,658 cancer whole genomes. *Nature*. 2020;578(7793):102-111. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1965-x>
30. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526(7574):519-24. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14666>
31. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2059-2074. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>
32. Thol F, Scherr M, Kirchner A, et al. Clinical and functional implications of microRNA mutations in a cohort of 935 patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015;100(4):e122-e124. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.120345>
33. Menegatti J, Nakel J, Stepanov YK, et al. Changes of Protein Expression after CRISPR/Cas9 Knockout of miRNA-142 in Cell Lines Derived from Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancers*. 2022;14(20):5031. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14205031>
34. Morin RD, Assouline S, Alcaide M, et al. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(9):2290-2300. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2123>
35. Kwanhian W, Lenze D, Alles J, et al. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Medicine*. 2012;1(2):141-155. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.29>
36. Hornshøj H, Nielsen MM, Sinnott-Armstrong NA, et al. Pan-cancer screen for mutations in non-coding elements with conservation and cancer specificity reveals correlations with expression and survival. *npj Genomic Medicine*. 2018;3:1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0040-5>
37. Radke J, Ishaque N, Koll R, et al. The genomic and transcriptional landscape of primary central nervous system lymphoma. *Nature Communications*. 2022;13(1):2558. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30050-y>
38. Veerla S, Staaf J. Kataegis in clinical and molecular subgroups of primary breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2024;10(1):32. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41523-024-00640-8>
39. Huang W, Paul D, Calin GA, et al. miR-142: A Master Regulator in Hematological Malignancies and Therapeutic Opportunities. *Cells*. 2023;13(1):84. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells13010084>
40. Liang J, Oyang L, Rao S, et al. Potential Target for Tumor Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:674426. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.674426>
41. Marshall A, Kasturiarachchi J, Datta P, et al. Mir142 loss unlocks IDH2R140-dependent leukemogenesis through antagonistic regulation of HOX genes. *Scientific Reports*. 2020;10(1):19390. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76218-8>
42. Soltis AR, Bateman NW, Liu J, et al. Proteogenomic analysis of lung adenocarcinoma reveals tumor heterogeneity, survival determinants, and therapeutically relevant pathways. *Cell Reports Medicine*. 2022;3(11):100819. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100819>
43. Sato K, Akamatsu H, Koh Y, et al. Differential properties of KRAS transversion and transition mutations in non-small cell lung cancer: associations with environmental factors and clinical outcomes. *BMC Cancer*. 2022;22(1):1148. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10246-7>
44. Lyons DM, Lauring AS. Evidence for the Selective Basis of Transition-to-Transversion Substitution Bias in Two RNA Viruses. *Molecular Biology and Evolution*. 2017;34(12):3205-3215. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx251>
45. Mildner A, Chapnik E, Varol D, et al. MicroRNA-142 controls thymocyte proliferation. *European Journal of Immunology*. 2017;47(7):1142-1152. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201746987>
46. Quémener AM, Bachelot L, Aubry M, et al. Non-canonical miRNA-RNA base-pairing impedes tumor suppressor activity of miR-16. *Life Science Alliance*. 2022;5(12):e202201643. DOI: <https://doi.org/10.26508/lsa.202201643>
47. Busseau I, Mockly S, Houbbron É, et al. Evaluation of microRNA variant maturation prior to genome edition. *Biochimie*. 2024;217:86-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.06.007>
48. Jouravleva K, Vega-Badillo J, Zamore PD. Principles and pitfalls of high-throughput analysis of microRNA-binding thermodynamics and kinetics by RNA Bind-n-Seq. *Cell Reports Methods*. 2022;2(3):100185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100185>
49. Gong J, Tong Y, Zhang HM, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target

binding and biogenesis. Human Mutation. 2012;33(1):254-263. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.21641>

50. Sheng P, Flood KA, Xie M. Short Hairpin RNAs for Strand-Specific Small Interfering RNA Production. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020;8:940. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00940>

Статья поступила в редакцию 20 марта 2025 г.
Поступила после доработки 2 мая 2025 г.
Принята к печати 27 мая 2025 г.

Received 20 March 2025

Revised 2 May 2025

Accepted 27 May 2025

Информация об авторах

Елена Николаевна Воропаева, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Российская Федерация, E-mail: vena.81@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7542-7285>.

Ольга Борисовна Серегина, ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Российская Федерация, E-mail: alepu@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6110-4351>.

Мария Сергеевна Войтко, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Российская Федерация, E-mail: voytko.marie@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-4011>.

Татьяна Николаевна Бабаева, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск,

Российская Федерация, E-mail: babaeva_tatyana@inbox.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2708-1133>.

Наталья Валерьевна Скворцова, доктор медицинских наук, доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Российская Федерация, E-mail: nata_sk78@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6938-3802>.

Владимир Николаевич Максимов, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры медицинской генетики и биологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Российская Федерация, E-mail: medik11@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7165-4496>.

Татьяна Ивановна Поспелова, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Российская Федерация, E-mail: postatgem@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1261-5470>.

Information about the authors

Elena N. Voropaeva, Doct. Sci. (Biology), Leading Researcher at the Laboratory of Molecular Genetic Research of Therapeutic Diseases, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Associate Professor at the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: vena.81@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7542-7285>.

Olga B. Seregina, Assistant at the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: alepu@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6110-4351>.

Maria S. Voytko, Cand. Sci. (Medicine), Assistant at the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: voytko.marie@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-4011>.

Tatiana N. Babaeva, Cand. Sci. (Medicine), Assistant at the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: babaeva_tatyana@inbox.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2708-1133>.

Natalia V. Skvortsova, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: nata_sk78@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6938-3802>.

Vladimir N. Maksimov, Doct. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetic Research of Therapeutic Diseases, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Professor at the Department of Medical Genetics and Biology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: medik11@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7165-4496>.

Tatiana I. Pospelova, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia, E-mail: postatgem@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1261-5470>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-3

УДК 575.16

Связь генетических детерминант SHBG с гормональным профилем больных миомой матки

М.С. Пономаренко 

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»,
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Российская Федерация
Автор для переписки: М.С. Пономаренко (ponomarenkomc@yandex.ru)

Резюме

Актуальность: Миома матки представляет собой доброкачественную гормон-зависимую опухоль мышечного слоя матки, поражающую женщин репродуктивного возраста. Генетическим факторам отводится важное значение в возникновении данного новообразования. Гены-кандидаты, ассоциированные с уровнем глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG), могут быть вовлечены в патогенетику миомы матки. **Цель исследования:** Оценить связи полиморфных вариантов генов, ассоциированных с уровнем SHBG, с гормональным статусом пациенток с миомой матки. **Материалы и методы:** У 83 пациенток с миомой матки, входящих в группу исследования, был изучен гормональный профиль – концентрации в сыворотке крови фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, эстрадиола, тестостерона, пролактина, прогестерона и проведено генотипирование 9 SNPs, ассоциированных с уровнем SHBG. Программа gPLINK использовалась для поиска ассоциаций SNPs, связанных с уровнем SHBG, с уровнем половых гормонов у больных миомой матки (метод линейной регрессии). Тестировались 4 генетические модели (аллельная/аддитивная/доминантная/рецессивная); в расчеты включались трансформированные значения концентраций половых гормонов в сыворотке крови. **Результаты:** С уровнем эстрадиола ассоциированы три молекулярно-генетических маркера – rs3779195 *BAIAP2L1* [T/A] (7хр.) ($p_{\text{perm}}=0,020 - 0,048$; $\beta=-0,372 - -0,394$), rs7910927 *JMJD1C* [G/T] (10хр.) ($p_{\text{perm}}=0,027 - 0,048$; $\beta=-0,228 - -0,379$), rs10454142 *PPP1R21* [T/C] (2хр.) ($p_{\text{perm}}=0,050$; $\beta=0,318$), лютеинизирующего гормона – rs4149056 *SLCO1B1* [T/C] (12хр.) ($p_{\text{perm}}=0,043 - 0,048$; $\beta=0,361 - 0,369$), а с концентрацией пролактина ($p_{\text{perm}}=0,021$; $\beta=0,968$), прогестерона ($p_{\text{perm}}=0,050$; $\beta=-1,276$), и тестостерона ($p_{\text{perm}}=0,050$; $\beta=-0,744$) в сыворотке крови больных, имеющих миому матки, связан полиморфный локус rs8023580 *NR2F2* [T/C] (15хр.). **Заключение:** Установлена вовлеченность генов-кандидатов SHBG в гормональный профиль больных миомой матки.

Ключевые слова: миома матки; полиморфизм; глобулин; связывающий половые гормоны

Для цитирования: Пономаренко МС. Связь генетических детерминант SHBG с гормональным профилем больных миомой матки. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(4):628-642. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-3

The relationship between the genetic determinants of SHBG and the hormonal profile of patients with uterine fibroids

Marina S. Ponomarenko 

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

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

Abstract

Background: Uterine fibroids are benign hormone-dependent tumors that affect the muscle layer of the uterus and are common in women of reproductive age. Genetic factors are important in the development of this neoplasm. Candidate genes associated with the level of sex hormone binding globulin (SHBG) may be involved in the pathogenetics of uterine fibroids. **The aim of the study:** To evaluate the relationship between polymorphic gene variants associated with SHBG levels and the hormonal status of patients with uterine fibroids. **Materials and methods:** The hormonal profile of the 83 patients with uterine fibroids included in the study group was examined. This included the measurement of serum concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinising hormone (LH), oestradiol, testosterone, prolactin and progesterone. Genotyping of nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with sex hormone-binding globulin (SHBG) levels was also performed. The gPLINK software was used to search for associations of SNPs associated with the level of SHBG with the level of sex hormones in patients with uterine fibroids (linear regression method). 4 genetic models (allelic/additive/dominant/recessive) were tested; transformed values of the concentrations of sex hormones in the blood serum were included in the calculations. **Results:** Three molecular genetic markers are associated with estradiol levels: rs3779195 *BAIAP2L1* [T/A] (7chr.) ($p_{\text{perm}}=0.020 - 0.048$; $\beta=-0.372 - -0.394$), rs7910927 *JMJD1C* [G/T] (10chr.) ($p_{\text{perm}}=0.027 - 0.048$; $\beta=-0.228 - -0.379$), rs10454142 *PPP1R21* [T/C] (2chr.) ($p_{\text{perm}}=0.050$; $\beta=0.318$), luteinizing hormone – rs4149056 *SLCO1B1* [T/C] (12chr.) ($p_{\text{perm}}=0.043 - 0.048$; $\beta=0.361 - 0.369$), and with a prolactin concentration ($p_{\text{perm}}=0.021$; $\beta=0.968$), progesterone ($p_{\text{perm}}=0.050$; $\beta=-1.276$), and testosterone ($p_{\text{perm}}=0.050$; $\beta=-0.744$) in the blood serum of patients with uterine fibroids, the polymorphic locus rs8023580 *NR2F2* [T/C] (15chr.) is associated. **Conclusion:** The involvement of SHBG candidate genes in the hormonal profile of patients with uterine fibroids was established.

Keywords: uterine fibroids; polymorphism; sex hormone binding globulin

For citation: Ponomarenko MS. The relationship between the genetic determinants of SHBG and the hormonal profile of patients with uterine fibroids. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):628-642. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-3

Введение. Миома матки – это доброкачественное новообразование гладкомышечной ткани (миометрия) матки, чувствительное к половым гормонам [1, 2]. Являясь наиболее распространенной опухолью женской репродуктивной системы, миома матки представляет собой серьезную проблему с точки зрения

качества жизни каждой конкретной пациентки, вызывая такие симптомы, как обильные менструальные кровотечения, боли в области таза, бесплодие и др. [3]. Кроме того, экономическое бремя, связанное с лечением данного заболевания, создаёт значительную финансовую нагрузку как для самих женщин, имеющих

данный диагноз, так и для системы здравоохранения [4]. В 2022 году в США экономические затраты, направленные на лечение женщин с диагнозом миома матки, выросли до 41,4 млрд. долларов (для сравнения 2010 год – 34,4 млрд. долларов) [5].

Генетические факторы влияют на риск развития миомы матки: по оценкам, полученным на основе близнецового метода, наследуемость заболевания составляет 26-63% [6]. На сегодняшний день проведено 13 полно-геномных исследований (GWAS), которые позволили установить несколько десятков генов-кандидатов, имеющих рисковое значение для миомы матки [6, 7]. Среди этих генов-кандидатов важное место занимают гены половых гормонов [8] гормон-зависимых признаков (возраст менархе) [9, 10].

Важное значение в патофизиологии миомы матки отводится половым гормонам, факторам роста, цитокинам, которые оказывают влияние на пролиферацию гладкомышечных клеток матки и способствуют избыточной выработке внеклеточного матрикса [2, 11, 12]. Традиционно считалось, что основными гормонами, вовлеченными в этиопатогенез миомы матки, являются эстрогены, но недавние исследования показали, что важную роль в этом процессе играют как тестостерон [13], так и прогестерон [14]. Следует отметить, что уровень активных форм половых гормонов (эстрогены, тестостерон) в значительной степени определяется SHBG.

Целью исследования. Оценка связи полиморфных вариантов генов, ассоциированных с уровнем SHBG, с гормональным статусом пациенток с миомой матки.

Материалы и методы исследования. У 83 пациенток с миомой матки, входящих в группу исследования, был изучен гормональный профиль – концентрации в сыворотке крови фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, эстрадиола, тестостерона, пролактина, прогестерона. В

сформированную выборку исследования вошли больные с изолированной миомой матки ($n=24; 28,92\%$), сочетанием миомы матки с гиперплазией эндометрия ($n=17; 20,48\%$), эндометриозом ($n=29; 34,94\%$) и женщины, имеющие сочетание миомы матки с гиперплазией эндометрия и эндометриозом ($n=13; 15,66\%$). Таким образом, сочетанные пролиферативные заболевания матки регистрировались у большей половины исследуемых женщин (71,08%).

Девять полиморфных локусов, ассоциированных с уровнем SHBG ($rs17496332$ [A/G] (1хр.) *PRMT6*, $rs780093$ [C/T] (2хр.) *GCKR*, $rs10454142$ [T/C] (2хр.) *PPP1R21*, $rs3779195$ [T/A] (7хр.) *BAIAP2L1*, $rs440837$ [A/G] (8хр.) *ZBTB10*, $rs7910927$ [G/T] (10хр.) *JMJD1C*, 1 $rs4149056$ [T/C] (12хр.) *SLCO1B*, $rs8023580$ [T/C] (15хр.) *NR2F2*, $rs12150660$ [G/T] (17хр.) *SHBG*) были прогенотипированы на амплификаторах CFX-96. Анализ связей полиморфных вариантов генов, ассоциированных с уровнем SHBG, с гормональным статусом пациенток с миомой матки проводился с помощью программы gPLINK (метод линейной регрессии); тестировались четыре генетические модели (аллельная/аддитивная/доминантная/рецессивная) [15]. Для расчетов использовались трансформированные значения концентрации половых гормонов в сыворотке крови (в связи с тем, что их распределение отличалось от нормального). Выполнение расчетов осуществлялось с применением следующих ковариат: возраст, ИМТ, наличие сопутствующих гиперпластических заболеваний матки (эндометриоз и гиперплазия эндометрия). Коррекция на множественные сравнения была выполнена с использованием пермутационного теста [16]: за статистически значимые принимались результаты при $p_{perm} \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Выполнен анализ показателей гормонального профиля 83 женщин, имеющих миому матки. Средний возраст

исследуемой группы был равен $39,26 \pm 7,23$ лет, среднее значение ИМТ составило $25,95 \pm 5,47$. Показатели гормонального

профиля пациенток с миомой матки приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Характеристика гормонального статуса пациенток с миомой матки

Table 1

Characteristics of the hormonal status of patients with uterine fibroids

Показатели	n	$\bar{X} \pm SD$	$M_e (Q1-Q3)$	P
Возраст/лет	83	$39,26 \pm 7,23$	39,00 (34,00-44,00)	0,248
ИМТ/кг/м ²	83	$25,95 \pm 5,47$	25,00 (22,00-29,00)	0,009
Фолликулостимулирующий гормон/мМЕ/мл	74	$9,91 \pm 5,63$	9,30 (7,30-10,60)	<0,00001
Лютеинизирующий гормон/мМЕ/мл	73	$9,98 \pm 13,99$	6,80 (5,80-9,60)	<0,00001
Пролактин/мкМЕ/мл	78	$490,52 \pm 287,00$	440,00 (297,10-577,00)	<0,00001
Эстрадиол/пг/мл	70	$81,51 \pm 65,02$	59,08 (42,50-89,70)	<0,00001
Прогестерон/нмоль/л	63	$6,36 \pm 14,61$	1,20 (0,34-5,60)	<0,00001
Тестостерон/нмоль/л	69	$0,45 \pm 0,21$	0,40 (0,29-0,56)	<0,00001

Примечание: p – уровень значимости согласно критерию Шапиро-Уилка.

Note: p – significance level according to the Shapiro-Wilk criterion.

Оценка распределения исследуемых 9 SNPs, связанных с уровнем SHBG, среди 83 больных с миомой матки (Табл. 2) показала, что для всех молекулярно-генетических маркеров выполняется закон

Харди-Вайнберга (с учетом дополнительно введенной поправки Бонферони на количество анализируемых локусов (9 SNPs), $p_{HWE(Bonf)} \geq 0,006 [0,05/9]$).

Таблица 2

Данные о распределении полиморфных локусов, ассоциированных с уровнем SHBG у пациенток с миомой матки

Table 2

Data on the distribution of polymorphic loci associated with SHBG levels in patients with uterine fibroids

Ген, SNP (хромосома)	Частота минор. аллеля	Число изучен. хромосом	Распред. генотипов*	H_o	H_e	P_{HWE}
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	0,344	154	7/39/31	0,507	0,451	0,447
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	0,420	150	10/43/22	0,573	0,487	0,160
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	0,264	148	8/23/43	0,311	0,388	0,129
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	0,222	144	0/32/40	0,444	0,346	0,016
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	0,240	146	5/25/43	0,343	0,365	0,537
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	0,447	150	16/35/24	0,467	0,494	0,644
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	0,178	152	0/27/49	0,355	0,292	0,108
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	0,253	146	3/31/39	0,425	0,378	0,372
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	0,240	150	4/28/43	0,373	0,365	1,000

Примечание: * – количество гомозигот по редкому аллелю / гетерозигот / гомозигот по частому аллелю, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность.

Note: * – number of homozygotes for a rare allele / heterozygotes / homozygotes for a common allele, H_o – observed heterozygosity, H_e – expected heterozygosity.

Далее мы изучили связи генетических детерминант SHBG с гормональным профилем больных миомой матки. В таблицах 3-8 отображены полученные результаты. Установлены ассоциации трех полиморфных локусов генов, связанных с SHBG, с уровнем эстрадиола (ESTR) у пациенток с миомой матки (Табл. 3). Полиморфизм rs3779195 *BAIAP2L1* [T/A] (7хр.) вовлечен в формирование уровня эстрадиола в рамках трех моделей: аллельной ($\beta=-0,372$, $p=0,038$, $p_{perm}=0,048$), аддитивной ($\beta=-0,394$, $p=0,020$, $p_{perm}=0,021$) и доминантной ($\beta=-0,394$, $p=0,020$, $p_{perm}=0,020$). Молекулярно-генетический маркер rs7910927 *JMJD1C* [G/T] (10хр.) также связан с концентрацией эстрадиола согласно аддитивной ($\beta=-0,228$, $p=0,043$, $p_{perm}=0,048$) и доминантной ($\beta=-0,379$, $p=0,026$, $p_{perm}=0,027$) моделям. С уровнем эстрадиола ассоциирован полиморфизм rs10454142 *PPP1R21* [T/C] (2хр.) согласно доминантной модели ($\beta=0,318$; $p=0,050$; $p_{perm}=0,050$). Следует отметить, что минорные аллели А rs3779195 *BAIAP2L1* и Т rs7910927 *JMJD1C* связаны с более низким содержанием эстрадиола в сыворотке крови пациенток с миомой матки ($\beta<0$), а аллель С rs10454142 *PPP1R21* наоборот ассоциирован с более высокой концентрацией данного гормона ($\beta>0$).

Уровень лютеинизирующего гормона (LH) у больных с миомой матки детерминируется полиморфным локусом rs4149056 *SLCO1B1* [T/C] (12хр.) в рамках аллельной ($\beta=0,361$, $p=0,038$, $p_{perm}=0,048$), аддитивной ($\beta=0,369$, $p=0,044$, $p_{perm}=0,046$) и доминантной ($\beta=0,369$, $p=0,044$, $p_{perm}=0,043$) моделей (Табл. 4). Следует подчеркнуть, что аллель С rs4149056 маркирует более высокую концентрацию лютеинизирующего гормона в сыворотке крови у пациенток с миомой матки ($\beta>0$).

Молекулярно-генетический маркер rs8023580 *NR2F2* [T/C] (15хр.) ассоциирован с уровнем трех гормонов – пролактина (PROL), прогестерона (PG) и тестостерона (TEST) у больных с миомой матки согласно рецессивным моделям

($\beta=0,968$, $p=0,014$, $p_{perm}=0,021$ (Табл. 5); $\beta=-1,276$, $p=0,050$, $p_{perm}=0,050$ (Табл. 6); $\beta=-0,744$, $p=0,050$, $p_{perm}=0,050$ (Табл. 7). При этом аллель С rs8023580 *NR2F2* является маркером более высокой концентрации только пролактина в сыворотке крови больных, имеющих миому матки ($\beta>0$). С концентрацией фолликулостимулирующего гормона (FSH) у пациенток с миомой матки связей полиморфных локусов SHBG не обнаружено (Табл. 8).

Итак, выявлена связь генов-кандидатов SHBG с гормональным профилем больных миомой матки. С уровнем эстрадиола ассоциированы три молекулярно-генетических маркера – rs3779195 *BAIAP2L1* [T/A] (7хр.), rs7910927 *JMJD1C* [G/T] (10хр.), rs10454142 *PPP1R21* [T/C] (2хр.), лютеинизирующего гормона – rs4149056 *SLCO1B1* [T/C] (12хр.), а с концентрацией пролактина, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови больных, имеющих миому матки, связан полиморфный локус rs8023580 *NR2F2* [T/C] (15хр.). Высокое содержание эстрадиола, лютеинизирующего гормона, пролактина в сыворотке крови у пациенток с миомой матки маркируют следующие аллельные варианты – С rs10454142 *PPP1R21*, С rs4149056 *SLCO1B1*, С rs8023580 *NR2F2* соответственно, а с более низкой концентрацией эстрадиола связаны минорные аллели А rs3779195 *BAIAP2L1* и Т rs7910927 *JMJD1C*, прогестерона и тестостерона – минорный аллель С rs8023580 *NR2F2*.

Половые гормоны играют важную роль в развитии миомы матки. В литературе не описано случаев её развития в препубертатном периоде, а в постменопаузе данная опухоль встречается редко [17]. Основным митогенным фактором для клеток миометрия считаются эстрогены [2]. Миоматозные клетки демонстрируют повышенную активность в ответ на воздействие эстрогенов по сравнению с клетками нормального миометрия [17]. Наряду с этим, все больше появляется данных, что прогестерон может быть вовлечен в патофизиологию миомы матки [14, 18-21].

Таблица 3

Полиморфизмы, связанные с уровнем SHBG, и концентрация эстрадиола у пациенток с миомой матки

Table 3

Polymorphisms associated with SHBG levels and estradiol concentration in patients with uterine fibroids

Исследуемый полиморфизм	Числ-ть изуч. выборки	Рассматриваемые генетич. модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	69	0,132	0,129	0,307	0,117	0,122	0,343	0,193	0,169	0,258	0,076	0,262	0,774
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	69	0,000	0,145	1,000	-0,007	0,139	0,962	-0,080	0,177	0,653	0,198	0,298	0,510
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	68	0,177	0,125	0,163	0,213	0,117	0,074	0,318	0,159	0,050	0,211	0,264	0,428
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	66	-0,372	0,176	0,038	-0,394	0,165	0,020	-0,394	0,165	0,020	NA	NA	NA
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	69	-0,110	0,136	0,420	-0,135	0,131	0,306	-0,297	0,163	0,073	0,291	0,317	0,363
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	70	-0,171	0,118	0,150	-0,228	0,111	0,043	-0,379	0,167	0,026	-0,199	0,201	0,325
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	69	0,064	0,180	0,724	0,102	0,173	0,560	0,102	0,173	0,560	NA	NA	NA
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	68	-0,044	0,150	0,772	-0,066	0,142	0,644	-0,161	0,166	0,335	0,418	0,403	0,304
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	70	0,171	0,145	0,241	0,085	0,141	0,547	0,179	0,166	0,284	-0,331	0,393	0,403

Примечание: β – показатель линейной регрессии, SE – ошибка β , p – уровень статистической значимости.Note: β – linear regression coefficient, SE – standard error of β , p – level of statistical significance.

Таблица 4

Полиморфизмы, связанные с уровнем SHBG, и концентрация лютеинизирующего гормона у пациенток с миомой матки

Table 4

Polymorphisms associated with SHBG levels and luteinising hormone concentration in patients with uterine fibroids

Исследуемый полиморфизм	Числ-ть изуч. выборки	Рассматриваемые генетич. модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	72	0,164	0,129	0,205	0,150	0,132	0,258	0,085	0,182	0,642	0,473	0,276	0,092
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	72	-0,076	0,139	0,589	-0,072	0,142	0,614	-0,100	0,186	0,593	-0,061	0,297	0,839
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	71	0,030	0,124	0,812	0,031	0,127	0,806	0,053	0,176	0,764	0,019	0,277	0,947
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	69	0,202	0,173	0,247	0,191	0,178	0,287	0,191	0,178	0,287	NA	NA	NA
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	72	0,036	0,136	0,793	0,038	0,141	0,789	0,061	0,177	0,731	-0,005	0,345	0,989
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	73	0,055	0,118	0,644	0,046	0,121	0,704	0,045	0,181	0,806	0,085	0,218	0,697
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	72	0,361	0,171	0,038	0,369	0,180	0,044	0,369	0,180	0,044	NA	NA	NA
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	71	-0,189	0,144	0,195	-0,180	0,148	0,229	-0,250	0,171	0,149	0,047	0,434	0,914
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	73	0,153	0,138	0,272	0,148	0,141	0,299	0,104	0,175	0,553	0,550	0,370	0,142

Примечание: β – показатель линейной регрессии, SE – ошибка β , p – уровень статистической значимости.Note: β – linear regression coefficient, SE – standard error of β , p – level of statistical significance.

Таблица 5

Полиморфизмы, связанные с уровнем SHBG, и концентрация пролактина у пациенток с миомой матки

Table 5

Polymorphisms associated with SHBG levels and prolactin concentration in patients with uterine fibroids

Исследуемый полиморфизм	Числ-ть изуч. выборки	Рассматриваемые генетич. модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	77	-0,164	0,124	0,190	-0,176	0,121	0,151	-0,280	0,157	0,079	-0,054	0,271	0,844
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	75	0,005	0,126	0,967	0,001	0,124	0,994	-0,103	0,173	0,552	0,188	0,231	0,418
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	74	-0,002	0,117	0,989	0,015	0,113	0,893	0,023	0,157	0,886	0,017	0,250	0,946
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	72	-0,113	0,165	0,497	-0,065	0,162	0,691	-0,065	0,162	0,691	NA	NA	NA
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	73	0,001	0,130	0,991	0,050	0,129	0,700	-0,020	0,163	0,904	0,373	0,313	0,237
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	75	0,079	0,110	0,474	0,045	0,110	0,683	-0,074	0,169	0,664	0,234	0,191	0,223
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	76	-0,135	0,164	0,412	-0,070	0,167	0,677	-0,070	0,167	0,677	NA	NA	NA
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	73	0,164	0,139	0,241	0,127	0,136	0,355	0,018	0,158	0,910	0,968	0,383	0,014
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	75	-0,168	0,133	0,210	-0,214	0,129	0,102	-0,287	0,158	0,075	-0,177	0,351	0,616

Примечание: β – показатель линейной регрессии, SE – ошибка β , p – уровень статистической значимости.Note: β – linear regression coefficient, SE – standard error of β , p – level of statistical significance.

Таблица 6

Полиморфизмы, связанные с уровнем SHBG, и концентрация прогестерона у пациенток с миомой матки

Table 6

Polymorphisms associated with SHBG levels and progesterone concentrations in patients with uterine fibroids

Исследуемый полиморфизм	Числ-ть изуч. выборки	Рассматриваемые генетич. модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	62	-0,078	0,130	0,549	-0,027	0,133	0,841	0,042	0,183	0,821	-0,227	0,285	0,430
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	62	-0,179	0,137	0,198	-0,218	0,138	0,119	-0,291	0,191	0,133	-0,249	0,271	0,361
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	61	0,159	0,131	0,229	0,187	0,130	0,157	0,243	0,172	0,164	0,256	0,306	0,407
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	60	0,172	0,169	0,313	0,192	0,168	0,260	0,192	0,168	0,260	NA	NA	NA
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	62	0,128	0,135	0,347	0,135	0,138	0,333	0,197	0,170	0,251	0,036	0,349	0,919
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	63	-0,030	0,114	0,790	-0,018	0,113	0,871	0,033	0,181	0,855	-0,091	0,193	0,637
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	62	-0,074	0,179	0,681	-0,004	0,187	0,983	-0,004	0,187	0,983	NA	NA	NA
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	61	-0,209	0,155	0,184	-0,245	0,155	0,119	-0,197	0,167	0,243	-1,276	0,642	0,050
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	63	0,046	0,140	0,743	0,054	0,141	0,701	0,091	0,168	0,589	-0,071	0,383	0,854

Примечание: β – показатель линейной регрессии, SE – ошибка β , p – уровень статистической значимости.Note: β – linear regression coefficient, SE – standard error of β , p – level of statistical significance.

Таблица 7

Полиморфизмы, связанные с уровнем SHBG, и концентрация тестостерона у пациенток с миомой матки

Table 7

Polymorphisms associated with SHBG levels and testosterone concentrations in patients with uterine fibroids

Исследуемый полиморфизм	Числ-ть изуч. выборки	Рассматриваемые генетич. модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	68	-0,024	0,136	0,858	0,012	0,138	0,929	0,046	0,181	0,251	-0,069	0,306	0,823
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	68	-0,032	0,139	0,820	-0,064	0,141	0,651	-0,186	0,191	-0,972	0,136	0,275	0,622
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	67	-0,179	0,127	0,162	-0,189	0,127	0,140	-0,326	0,173	-1,885	-0,091	0,290	0,755
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	65	0,071	0,178	0,690	0,045	0,182	0,808	0,045	0,182	0,244	NA	NA	NA
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	68	0,021	0,142	0,881	-0,027	0,145	0,854	0,044	0,179	0,244	-0,363	0,368	0,328
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	69	0,083	0,118	0,485	0,094	0,122	0,443	0,013	0,190	0,069	0,265	0,209	0,210
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	68	-0,087	0,178	0,628	-0,158	0,184	0,393	-0,158	0,184	-0,860	NA	NA	NA
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	67	-0,198	0,147	0,185	-0,199	0,148	0,185	-0,147	0,175	-0,840	-0,744	0,419	0,050
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	69	-0,119	0,141	0,402	-0,091	0,142	0,524	-0,147	0,176	-0,835	0,029	0,371	0,938

Примечание: β – показатель линейной регрессии, SE – ошибка β , p – уровень статистической значимости.Note: β – linear regression coefficient, SE – standard error of β , p – level of statistical significance.

Таблица 8

Полиморфизмы, связанные с уровнем SHBG, и концентрация фолликулостимулирующего гормона у пациенток с миомой матки

Table 8

Polymorphisms associated with SHBG levels and follicle-stimulating hormone concentration in patients with uterine fibroids

Исследуемый полиморфизм	Числ-ть изуч. выборки	Рассматриваемые генетич. модели											
		аллельная			аддитивная			доминантная			рецессивная		
		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
PRMT6 rs17496332 [A/G] (1xp.)	73	-0,022	0,125	0,859	-0,026	0,128	0,841	-0,138	0,175	0,435	0,218	0,274	0,430
GCKR rs780093 [C/T] (2xp.)	73	-0,105	0,136	0,442	-0,100	0,139	0,475	-0,045	0,183	0,807	-0,314	0,285	0,275
PPP1R21 rs10454142 [T/C] (2xp.)	72	0,014	0,122	0,912	0,011	0,123	0,932	0,084	0,170	0,622	-0,161	0,269	0,553
BAIAP2L1 rs3779195 [T/A] (7xp.)	70	-0,092	0,168	0,587	-0,092	0,171	0,592	-0,092	0,171	0,592	NA	NA	NA
ZBTB10 rs440837 [A/G] (8xp.)	73	0,053	0,132	0,687	0,057	0,136	0,679	0,079	0,171	0,647	0,041	0,337	0,903
JMJD1C rs7910927 [G/T] (10xp.)	74	0,027	0,117	0,816	0,042	0,120	0,726	0,011	0,179	0,950	0,121	0,216	0,578
SLCO1B1 rs4149056 [T/C] (12xp.)	73	0,040	0,173	0,818	0,036	0,180	0,843	0,036	0,180	0,843	NA	NA	NA
NR2F2 rs8023580 [T/C] (15xp.)	72	-0,209	0,140	0,141	-0,196	0,143	0,177	-0,266	0,165	0,112	0,024	0,423	0,955
SHBG rs12150660 [G/T] (17xp.)	74	0,113	0,137	0,410	0,133	0,141	0,349	0,149	0,173	0,391	0,235	0,373	0,531

Примечание: β – показатель линейной регрессии, SE – ошибка β , p – уровень статистической значимости.Note: β – linear regression coefficient, SE – standard error of β , p – level of statistical significance.

При этом, следует подчеркнуть, что механизмы, которые лежат в основе патогенеза миомы матки, вызванного действием прогестерона, в значительной степени неизвестны. Выявлено, что экспрессия рецепторов данного гормона (PRs) выше в миоматозных клетках по сравнению с клетками нормального миометрия [14]. Следует отметить, что уровень прогестерона в изученной нами группе больных миомой матки ассоциирован с полиморфным локусом rs8023580 NR2F2 [T/C] (15хр.).

Прогестерон взаимодействует с факторами роста, такими как трансформирующий фактор роста бета-3 (TGF-β3), эпидермальный фактор роста (EGF) и инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), тем самым способствуя пролиферации миоматозных клеток [22]. Следует отметить, что экспрессия TGF-β3 увеличивается во время секреторной фазы менструального цикла (основным гормоном которой является прогестерон) [23]. TGF-β3 задействован в большом количестве процессов в организме, в том числе «регулирует» апоптоз, ангиогенез [24]. TGF-β3 является одним из важнейших факторов роста в патофизиологии опухолей [24]. Также, обращает на себя внимание, «хорошая» эффективность лекарственной терапии пациенток с миомой матки селективными модуляторами прогестероновых рецепторов, что служит дополнительным аргументом в пользу предположения о значимой роли прогестерона в патофизиологии данного заболевания [14, 25]. Также, недавние исследования показали, что при лечении улипристала ацетатом (селективный модулятор прогестероновых рецепторов) уровни транскриптов TGF-β1 и TGF-β3 в миоматозных клетках были заметно снижены, что косвенно указывает на то, что прогестерон опосредует передачу сигналов TGF-β [26, 27, 28].

Кроме того, прогестерон, взаимодействуя как со своими специфическими PRs, так и с негеномными мембранными рецепторами

(mPRs/PGRMCs), активирует ряд сигнальных путей (WNT/β-катенин, PI3K/АКТ), которые стимулируют рост/пролиферацию миоматозных клеток, способствуют их «выживанию» (за счёт снижения апоптоза), приводят к определённым сосудистым изменениям, улучшающим кровоснабжение опухоли и вызывающим значимую для миомы матки модификацию внеклеточного матрикса (ключевого компонента структуры опухоли) [14, 18-21]. Таким образом, прогестерон регулирует факторы роста, ангиогенные факторы, компоненты внеклеточного матрикса и апоптотические агенты в миоматозных клетках [20].

Очень важно отметить следующий момент: прогестерон является одним из ключевых метаболитических предшественников андрогенов и эстрогенов в организме [29]. В работе Ruth et al. были показаны значимые положительные корреляции между уровнем прогестерона и содержанием дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭАС) ($r=0,60$), тестостерона ($r=0,44$), индексом свободных андрогенов (FAI, рассчитывается как $\text{тестостерон}/\text{SHBG} \times 100$) ($r=0,39$) и, в меньшей степени, концентрацией эстрадиола ($r=0,17$) [30]. Интересно, что результаты GWAS, полученные Ruth et al., указывают на наличие общих генетических детерминант уровней ДГЭАС (rs148982377) и прогестерона (rs34670419) (полиморфизмы rs148982377 и rs34670419 сильно сцеплены ($r^2=1,00$, $D'=1,00$), расположены на расстоянии 56 kb друг от друга в области генов CYP3A4/CYP3A7, участвующих в процессе биосинтеза стероидов) [30]. Следует отметить, что описанные в литературе значимые для миомы матки эффекты генетических полиморфизмов, связанные с уровнем SHBG, реализуемые через тестостерон и эстрогены, в определенной степени могут быть опосредованы эффектами их предшественника – прогестерона [31, 32].

Следует отметить, что эстрогены и прогестерон действуют совместно

в процессе формирования миомы матки: в клетках опухоли эстрогены стимулируют повышенную экспрессию PRs, что приводит к повышению «чувствительности» миоматозных узлов к сигналам этих гормонов [18]. В экспериментах (использовались животные модели) показано, что уровень экспрессии PRs в опухолевых клетках выше по сравнению с эстрогеновыми рецепторами [33]. Также есть данные, что у женщин с миомой матки, не получавших терапию агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона, содержание PRs было значительно выше, чем содержание эстрогеновых рецепторов [34]. Примечательно, что в секреторную фазу менструального цикла митотическая активность миоматозных клеток выше (преобладает прогестерон), чем в пролиферативную фазу (преобладают эстрогены) [35].

Важное значение в патофизиологии миомы матки принадлежит гормонам гипофиза – лютеинизирующий гормон (передняя доля) и пролактин (задняя доля) [36]. Литературные данные свидетельствуют о том, что риск развития миомы матки возрастает у женщин с более высокими показателями концентрации лютеинизирующего гормона в сыворотке крови [37]. Также, согласно результатам иммуногистохимического анализа обнаружено повышенное содержание пролактина в миоматозных клетках по сравнению с клетками нормального миометрия у женщин с миомой матки и клетками миометрия здоровых женщин. Кроме того, пролактин может оказывать влияние на развитие и рост опухоли посредством активации сигнальных путей STAT5/MAPK в клеточных линиях миометрия крысы и человека [38]. Следует отметить, что уровень лютеинизирующего гормона в рассматриваемой нами выборке больных миомой матки ассоциирован с rs4149056 *SLCO1B1* [T/C] (12хр.), а с концентрацией пролактина в сыворотке крови больных,

имеющих миому матки, связан полиморфный локус rs8023580 *NR2F2* [T/C] (15хр.).

Интересно отметить, что данная генетическая панель (девять локусов, ассоциированных с уровнем SHBG) использовалась ранее в исследованиях нашего научного коллектива при изучении рака молочной железы [39], эндометриоза [40]. Согласно результатам, полученным в работе Пономаревой Т.А., с уровнем эстрадиола у больных эндометриозом связаны молекулярно-генетические маркеры rs3779195 *BAIAP2L1* ($p_{\text{perm}} \leq 0,050$, $\beta = -0,282 - -0,318$) и rs440837 *ZBTB10* ($p_{\text{perm}} = 0,048$, $\beta = -0,264$), прогестерона – rs780093 *GCKR* ($p_{\text{perm}} \leq 0,050$, $\beta = -0,380 - -0,269$), rs10454142 *PPP1R21* ($p_{\text{perm}} = 0,049$, $\beta = 0,568$), rs8023580 *NR2F2* ($p_{\text{perm}} = 0,050$, $\beta = -0,289$) и rs12150660 *SHBG* ($p_{\text{perm}} = 0,028$, $\beta = -1,071$), а с концентрациями тестостерона и дегидроэпиандростерона ассоциирован полиморфный локус rs440837 *ZBTB10* ($p_{\text{perm}} \leq 0,050$, $\beta = -0,215$ и $p_{\text{perm}} \leq 0,050$, $\beta = -0,266 - -0,334$ соответственно) [40]. Основываясь на этих данных, мы можем заключить, что SNPs rs3779195 *BAIAP2L1* и rs8023580 *NR2F2* связаны с уровнями эстрадиола и прогестерона соответственно, как у больных с эндометриозом [40], так и с миомой матки (материалы нашего исследования). Значимые ассоциации с уровнями тестостерона, прогестерона, эстрадиола с рядом генов-кандидатов половых гормонов (*SLC22A10*-rs112295236, *ZNF789*-rs148982377, *ZKSCAN5*-rs34670419 и др.) установлено и при гиперплазии эндометрия [41].

Заключение. С уровнем половых гормонов у женщин с миомой матки связаны следующие SHBG-значимые молекулярно-генетические маркеры – rs3779195 [T/A] *BAIAP2L1*, rs7910927 [G/T] *JMJD1C*, rs10454142 [T/C] *PPP1R21* (эстрадиол), rs4149056 [T/C] *SLCO1B1* (лютеинизирующий гормон) и rs8023580 [T/C] *NR2F2* (пролактин, прогестерон и тестостерон).

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. Bulun SE, Yin P, Wei J, et al. Uterine fibroids. *Physiological Reviews*. 2025;105(4):1947-1988. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2024>
2. Yang Q, Ciebiera M, Bariani MV, et al. Comprehensive Review of Uterine Fibroids: Developmental Origin, Pathogenesis, and Treatment. *Endocrine Reviews*. 2022;43(4):678-719. DOI: <https://dx.doi.org/10.1210/endrev/bnab039>
3. Zhang Z, Huang H, Jiang K, et al. Global, regional and national uterine fibroid burdens from 1990 to 2021 and projections until 2050: results from the GBD study. *BMC Women's Health*. 2025;25(1):423. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12905-025-03974-y>
4. Harrington A, Bonine NG, Banks E, et al. Direct Costs Incurred Among Women Undergoing Surgical Procedures to Treat Uterine Fibroids. *Journal of Managed Care and Specialty Pharmacy*. 2020;26(1-a):S2-S10. DOI: <https://doi.org/10.18553/jmcp.2020.26.1-a.s2>
5. Li B, Wang F, Chen L, et al. Global epidemiological characteristics of uterine fibroids. *Archives of Medical Science*. 2023;19(6):1802-1810. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/171786>
6. Kim J, Williams A, Noh H, et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel risk loci for uterine fibroids within and across multiple ancestry groups. *Nature Communications*. 2025;16(1):2273. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57483-5>
7. Пономаренко МС, Решетников ЕА, Пономаренко ИВ, и др. Молекулярно-генетические факторы формирования миомы матки. *Медицинский Совет*. 2025;4:21-25. DOI: <https://doi.org/10.21518/ms2025-051>
8. Alsudairi HN, Alrasheed AT, Dvornyk V. Estrogens and uterine fibroids: an integrated view. *Research Results in Biomedicine*. 2021;7(2):156-163. DOI: <https://dx.doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-6>
9. Пономаренко ИВ, Полоников АВ, Чурносоев МИ. Полиморфные локусы гена LHCGR, ассоциированные с развитием миомы матки. *Акушерство и гинекология*. 2018;10:86-91. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.10.86-91>
10. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate Genes for Age at Menarche Are Associated With Uterine Leiomyoma. *Frontiers in Genetics*. 2021;11:512940. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>
11. Пономаренко ИВ, Чурносоев МИ. Современные представления об этиопатогенезе и факторах риска лейомиомы матки. *Акушерство и гинекология*. 2018;8:27-32. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.8.27-32>
12. Пономаренко МС, Решетников ЕА, Пономаренко ИВ, и др. Этиопатогенетические механизмы развития миомы матки. *Акушерство и гинекология*. 2024;1:34-41. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2023.241>
13. Lv M, Yu J, Huang Y, et al. Androgen Signaling in Uterine Diseases: New Insights and New Targets. *Biomolecules*. 2022;12(11):1624. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12111624>
14. Ploumaki I, Macri VI, Segars JH, et al. Progesterone signaling in uterine fibroids: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Life Sciences*. 2025;362:123345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.123345>
15. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for wholegenome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*. 2007;81(3):559-575. DOI: <https://dx.doi.org/10.1086/519795>
16. Che R, Jack JR, Motsinger-Reif AA, et al. An adaptive permutation approach for genome-wide association study: evaluation and recommendations for use. *BioData Mining*. 2014;7:9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>
17. Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, et al. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Molecular Medicine*. 2015;21(1):242-256. DOI: <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00053>
18. Machado-Lopez A, Simón C, Mas A. Molecular and Cellular Insights into the

Development of Uterine Fibroids. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(16):8483. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22168483>

19.Ali M, Ciebiera M, Vafaei S, et al. Progesterone Signaling and Uterine Fibroid Pathogenesis; Molecular Mechanisms and Potential Therapeutics. Cells. 2023;12(8):1117. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12081117>

20.Szucio W, Bernaczyk P, Ponikwicka-Tyszk D, et al. Progesterone signaling in uterine leiomyoma biology: Implications for potential targeted therapy. Advances in Medical Sciences. 2024;69(1):21-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2024.01.001>

21.Omar M, Laknaur A, Al-Hendy A, et al. Myometrial progesterone hyper-responsiveness associated with increased risk of human uterine fibroids. BMC Women's Health. 2019;19(1):92. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0795-1>

22.Górski K, Zgliczyński S, Stelmachowska-Banaś M, et al. Uterine fibroids in women diagnosed with acromegaly: a systematic review. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2024;25(4):773-781. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11154-024-09883-z>

23.Islam MS. Advances in uterine fibroid research: linking progesterone and the transforming growth factor- β signaling pathway. Fertility and Sterility. 2024;122(2):272-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.05.004>

24.Bariani MV, Cui YH, Ali M, et al. TGF β signaling links early life endocrine-disrupting chemicals exposure to suppression of nucleotide excision repair in rat myometrial stem cells. Cellular and Molecular Life Sciences. 2023;80(10):288. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04928-z>

25.Simon JA, Catherino W, Segars JH, et al. Ulipristal acetate for treatment of symptomatic uterine leiomyomas: a randomized controlled trial. Obstetrics and Gynecology. 2018;131(3):431-439. DOI: <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002462>

26.Milewska G, Ponikwicka-Tyszk D, Bernaczyk P, et al. Functional evidence for two distinct mechanisms of action of progesterone and selective progesterone receptor modulator on uterine leiomyomas. Fertility and Sterility. 2024;122(2):341-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.02.046>

27.Lewis TD, Malik M, Britten J, et al. Ulipristal acetate decreases active TGF- β 3 and its canonical signaling in uterine leiomyoma via two novel mechanisms. Fertility and Sterility.

2019;111(4):683-684. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.12.026>

28.Ciebiera M, Włodarczyk M, Wrzosek M, et al. Ulipristal acetate decreases transforming growth factor β 3 serum and tumor tissue concentrations in patients with uterine fibroids. Fertility and Sterility. 2018;109(3):501-507. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.023>

29.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>

30.Ruth KS, Campbell PJ, Chew S, et al. Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-related phenotypes. European Journal of Human Genetics. 2016;24:284-290. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.102>

31.Ponomarenko M, Reshetnikov E, Churnosova M, et al. Obesity/Overweight as a Meaningful Modifier of Associations Between Gene Polymorphisms Affecting the Sex Hormone-Binding Globulin Content and Uterine Myoma. Life. 2025;15(9):1459. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15091459>

32.Ponomarenko M, Reshetnikov E, Churnosova M, et al. Genetic Variants Linked with the Concentration of Sex Hormone-Binding Globulin Correlate with Uterine Fibroid Risk. Life. 2025;15(7):1150. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15071150>

33.Mozzachio K, Moore AB, Kissling GE, et al. Immunoexpression of Steroid Hormone Receptors and Proliferation Markers in Uterine Leiomyoma and Normal Myometrial Tissues from the Miniature Pig, *Sus scrofa*. Toxicologic Pathology. 2016;44(3):450-457. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623315621414>

34.Khan KN, Fujishita A, Koshiba A, et al. Expression profiles of E/P receptors and fibrosis in GnRHa-treated and -untreated women with different uterine leiomyomas. PLoS ONE. 2020;15(11):e0242246. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242246>

35.Ali M, Al-Hendy A. Selective progesterone receptor modulators for fertility preservation in women with symptomatic uterine fibroids. Biology of Reproduction. 2017;97(3):337-352. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox094>

36.Stewart EA, Nowak RA. Uterine Fibroids: Hiding in Plain Sight. Physiology.

2022;37(1):16-27. DOI:
<https://doi.org/10.1152/physiol.00013.2021>

37. Baird DD, Kesner JS, Dunson DB. Luteinizing hormone in premenopausal women may stimulate uterine leiomyomata development. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2006;13(2):130-135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsig.2005.12.001>

38. DiMauro A, Sege C, Minor B, et al. Prolactin is Expressed in Uterine Leiomyomas and Promotes Signaling and Fibrosis in Myometrial Cells. *Reproductive Sciences*. 2022;29(9):2525-2535. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00741-w>

39. 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>

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

41. Чурносков ВИ. Ассоциации полиморфных локусов генов-кандидатов с уровнем половых гормонов у больных гиперплазией эндометрия. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2025;11(2):243-262. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2025-11-2-0-3>

References

1. Bulun SE, Yin P, Wei J, et al. Uterine fibroids. *Physiological Reviews*. 2025;105(4):1947-1988. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2024>

2. Yang Q, Ciebiera M, Bariani MV, et al. Comprehensive Review of Uterine Fibroids: Developmental Origin, Pathogenesis, and Treatment. *Endocrine Reviews*. 2022;43(4):678-719. DOI: <https://dx.doi.org/10.1210/endrev/bnab039>

3. Zhang Z, Huang H, Jiang K, et al. Global, regional and national uterine fibroid burdens from 1990 to 2021 and projections until 2050: results from the GBD study. *BMC Women's Health*.

2025;25(1):423. DOI:
<https://doi.org/10.1186/s12905-025-03974-y>

4. Harrington A, Bonine NG, Banks E, et al. Direct Costs Incurred Among Women Undergoing Surgical Procedures to Treat Uterine Fibroids. *Journal of Managed Care and Specialty Pharmacy*. 2020;26(1-a):S2-S10. DOI: <https://doi.org/10.18553/jmcp.2020.26.1-a.s2>

5. Li B, Wang F, Chen L, et al. Global epidemiological characteristics of uterine fibroids. *Archives of Medical Science*. 2023;19(6):1802-1810. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/171786>

6. Kim J, Williams A, Noh H, et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel risk loci for uterine fibroids within and across multiple ancestry groups. *Nature Communications*. 2025;16(1):2273. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57483-5>

7. Ponomarenko MS, Reshetnikov EA, Ponomarenko IV, et al. Molecular genetic factors of uterine fibroids formation. *Medical Council*. 2025;4:21-25. Russian. DOI: <https://doi.org/10.21518/ms2025-051>

8. Alsudairi HN, Alrasheed AT, Dvornyk V. Estrogens and uterine fibroids: an integrated view. *Research Results in Biomedicine*. 2021;7(2):156-163. DOI: <https://dx.doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-6>

9. Ponomarenko IV, Polonikov AV, Churnosov MI. Polymorphic loci of the LHCGR gene associated with the development of uterine fibroids. *Obstetrics and Gynecology*. 2018;10:86-91. Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.10.86-91>

10. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate Genes for Age at Menarche Are Associated With Uterine Leiomyoma. *Frontiers in Genetics*. 2021;11:512940. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>

11. Ponomarenko IV, Churnosov MI. Contemporary ideas about etiopathogenesis and risk factors of uterine leiomyoma. *Obstetrics and Gynecology*. 2018;8:27-32. Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.8.27-32>

12. Ponomarenko MS, Reshetnikov EA, Ponomarenko IV, et al. Etiopathogenetic mechanisms of uterine fibroids development. *Obstetrics and Gynecology*. 2024;1:34-41. Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2023.241>

13. Lv M, Yu J, Huang Y, et al. Androgen Signaling in Uterine Diseases: New Insights and

New Targets. *Biomolecules*. 2022;12(11):1624. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12111624>

14.Ploumaki I, Macri VI, Segars JH, et al. Progesterone signaling in uterine fibroids: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Life Sciences*. 2025;362:123345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.123345>

15.Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for wholegenome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*. 2007;81(3):559-575. DOI: <https://dx.doi.org/10.1086/519795>

16.Che R, Jack JR, Motsinger-Reif AA, et al. An adaptive permutation approach for genome-wide association study: evaluation and recommendations for use. *BioData Mining*. 2014;7:9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>

17.Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, et al. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Molecular Medicine*. 2015;21(1):242-256. DOI: <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00053>

18.Machado-Lopez A, Simón C, Mas A. Molecular and Cellular Insights into the Development of Uterine Fibroids. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):8483. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22168483>

19.Ali M, Ciebiera M, Vafaei S, et al. Progesterone Signaling and Uterine Fibroid Pathogenesis; Molecular Mechanisms and Potential Therapeutics. *Cells*. 2023;12(8):1117. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12081117>

20.Szucio W, Bernaczyk P, Ponikwicka-Tyszko D, et al. Progesterone signaling in uterine leiomyoma biology: Implications for potential targeted therapy. *Advances in Medical Sciences*. 2024;69(1):21-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2024.01.001>

21.Omar M, Laknaur A, Al-Hendy A, et al. Myometrial progesterone hyper-responsiveness associated with increased risk of human uterine fibroids. *BMC Women's Health*. 2019;19(1):92. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0795-1>

22.Górski K, Zgliczyński S, Stelmachowska-Banaś M, et al. Uterine fibroids in women diagnosed with acromegaly: a systematic review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2024;25(4):773-781. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11154-024-09883-z>

23.Islam MS. Advances in uterine fibroid research: linking progesterone and the transforming growth factor- β signaling pathway.

Fertility and Sterility. 2024;122(2):272-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.05.004>

24.Bariani MV, Cui YH, Ali M, et al. TGF β signaling links early life endocrine-disrupting chemicals exposure to suppression of nucleotide excision repair in rat myometrial stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2023;80(10):288. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04928-z>

25.Simon JA, Catherino W, Segars JH, et al. Ulipristal acetate for treatment of symptomatic uterine leiomyomas: a randomized controlled trial. *Obstetrics and Gynecology*. 2018;131(3):431-439. DOI: <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002462>

26.Milewska G, Ponikwicka-Tyszko D, Bernaczyk P, et al. Functional evidence for two distinct mechanisms of action of progesterone and selective progesterone receptor modulator on uterine leiomyomas. *Fertility and Sterility*. 2024;122(2):341-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.02.046>

27.Lewis TD, Malik M, Britten J, et al. Ulipristal acetate decreases active TGF- β 3 and its canonical signaling in uterine leiomyoma via two novel mechanisms. *Fertility and Sterility*. 2019;111(4):683-684. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.12.026>

28.Ciebiera M, Włodarczyk M, Wrzosek M, et al. Ulipristal acetate decreases transforming growth factor β 3 serum and tumor tissue concentrations in patients with uterine fibroids. *Fertility and Sterility*. 2018;109(3):501-507. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.023>

29.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>

30.Ruth KS, Campbell PJ, Chew S, et al. Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-related phenotypes. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24:284-290. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.102>

31.Ponomarenko M, Reshetnikov E, Churnosova M, et al. Obesity/Overweight as a Meaningful Modifier of Associations Between Gene Polymorphisms Affecting the Sex Hormone-Binding Globulin Content and Uterine Myoma. *Life*. 2025;15(9):1459. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15091459>

32.Ponomarenko M, Reshetnikov E, Churnosova M, et al. Genetic Variants Linked with

the Concentration of Sex Hormone-Binding Globulin Correlate with Uterine Fibroid Risk. *Life*. 2025;15(7):1150. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15071150>

33.Mozzachio K, Moore AB, Kissling GE, et al. Immunoexpression of Steroid Hormone Receptors and Proliferation Markers in Uterine Leiomyoma and Normal Myometrial Tissues from the Miniature Pig, *Sus scrofa*. *Toxicologic Pathology*. 2016;44(3):450-457. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623315621414>

34.Khan KN, Fujishita A, Koshiba A, et al. Expression profiles of E/P receptors and fibrosis in GnRHa-treated and -untreated women with different uterine leiomyomas. *PLoS ONE*. 2020;15(11):e0242246. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242246>

35.Ali M, Al-Hendy A. Selective progesterone receptor modulators for fertility preservation in women with symptomatic uterine fibroids. *Biology of Reproduction*. 2017;97(3):337-352. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox094>

36.Stewart EA, Nowak RA. Uterine Fibroids: Hiding in Plain Sight. *Physiology*. 2022;37(1):16-27. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00013.2021>

37.Baird DD, Kesner JS, Dunson DB. Luteinizing hormone in premenopausal women may stimulate uterine leiomyomata development. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2006;13(2):130-135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsig.2005.12.001>

38.DiMauro A, Sege C, Minor B, et al. Prolactin is Expressed in Uterine Leiomyomas and Promotes Signaling and Fibrosis in Myometrial Cells. *Reproductive Sciences*. 2022;29(9):2525-2535. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00741-w>

39.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>

40.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: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2025-11-1-0-4>

41.Churnosov VI. Associations of polymorphic loci of candidate genes with the level of sex hormones in patients with endometrial hyperplasia. *Research Results in Biomedicine*. 2025;11(2):243-262. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2025-11-2-0-3>

Статья поступила в редакцию 2 марта 2025 г.
Поступила после доработки 5 мая 2025 г.
Принята к печати 23 мая 2025 г.

Received 2 March 2025

Revised 5 May 2025

Accepted 23 May 2025

Информация об авторе

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

Information about the author

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

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ PHARMACOLOGY



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

УДК 615

Chemical composition and antimicrobial activities of *Boesenbergia xiphostachya*

Hop V. Nguyen^{1,2} , ShiPin Chen¹ , An N.T. Huynh³ , Truc H.N. Tran³ ,
Ngoc L.H. Vo³ , Tho T. Le⁴ , Hung Q. Nguyen⁴ , Thien H. Van³ ,
An N. Nguyen³ , Hanh T.D. Nguyen³ , Viet T. Pham³

¹ Fujian Agriculture and Forestry University,
15 Shangxiadian Rd., Fuzhou, 350002, China

² Vietnam National University of Forestry at Dongnai,
Trang Bom, 810000, Vietnam

³ Industrial University of Ho Chi Minh City,
12 Nguyen Van Bao St., Ho Chi Minh, 700000, Vietnam

⁴ Center of Analytical Services and Experimentation HCMC,
2 Nguyen Van Thu St., Ho Chi Minh, 700000, Vietnam

Corresponding author: Viet T. Pham (phamtanviet@iuh.edu.vn)

Abstract

Background: *Boesenbergia xiphostachya* is a rare species, recently discovered in Vietnam. Information about the chemical compositions and biological properties of distinct parts of this plant is still limited to date. **The aim of the study:** This study is the first to investigate the chemical composition and antimicrobial properties of acetone extracts and essential oil obtained from samples of *B. xiphostachya* collected in Vietnam. **Materials and methods:** Gas chromatography-mass spectrometry was used to identify the phytochemical components, while the antimicrobial properties of the essential oil and acetone extracts from the rhizome and aerial parts were determined using a disk diffusion assay. **Results:** A total of thirty compounds have been identified in the essential oil, in which α -fenchene (41.70%), cyclofenchene (14.75%), camphene (13.47%), and caryophyllene (6.78%) are the major compounds. In addition, the acetone extracts obtained from the aerial part and rhizome comprise twenty-two and twenty-seven compounds, respectively. The major constituents are mainly composed of n-hexadecanoic acid (21.32%), 2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl (19.19%), and phytol (7.78%), while the rhizome extract contains a majority of n-hexadecanoic acid (28.34%), benzoic acid, 2-amino-3-methoxy-, methyl ester (12.25%), and cinnamic acid (11.42%). Moreover, the essential oil and the acetone extracts from *B. xiphostachya* also possessed antimicrobial properties against a wide spectrum of microorganisms. **Conclusion:** The results obtained show that *B. xiphostachya* has great potential for use in biomedicine and related fields

Keywords: acetone extract; antimicrobial activity; *Boesenbergia xiphostachya*; chemical composition; essential oil

For citation: Nguyen HV, Chen Sh, Huynh ANT, et al. Chemical composition and antimicrobial activities of *Boesenbergia xiphostachya*. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):643-653. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-4

Introduction. *Boesenbergia* Kuntze is a genus belonging to Zingiberaceae family with about 82 species distributed in south-western India, China, and Southeast Asia. Notably, six species have been recorded in the flora of Vietnam [1, 2]. The Zingiberaceae family is known for its medicinal properties and is used in traditional medicine to improve health [3, 4, 5].

Similarly, the extracts obtained from some species of *Boesenbergia* are broadly used as functional foods and traditional medicine in some Asian countries [1, 6, 7]. Furthermore, previous studies have reported on the biological activities and phytochemical profiles of *Boesenbergia* members. For instance, the methanol extract from *B. rotunda* had an inhibitory effect on 24 *Leptospiral* strains, reduce ulcer inflammation, decrease nasopharyngeal carcinoma HK1 cells viability, PANC-1 human pancreatic cancer cells [8-11], while the essential oil was found to be effective against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus*, *S. aureus*. It also suppresses biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[12, 13]. The ethanolic extract of *B. rotunda* showed promise against SARS-CoV-2 infection in hamsters, along with antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, wound healing activities [14, 15, 16], and inhibits *Candida albicans* biofilm formation [17]. Moreover, the bioactive compounds of *Boesenbergia* species have been investigated for their various bioactivities. For example, panduratin A and hydroxypanduratin A inhibit the production of TNF- α , nitric oxide and PGE2, and have anti-SARS-CoV-2 and periodontal treatment properties [18-21]. Similarly, panduratin A has been reported as a preventive agent against the growth of certain cancer cell lines [22, 23]. Additionally, longiferone B and C isolated

from *B. longiflora* rhizome exhibit anti-inflammatory activity [24].

Boesenbergia xiphostachya (Gagnep.) Loes, a species belonging to Zingiberaceae, is mostly found in Thailand and Indochina [25]. The chemical compositions and biological effects of this species have been investigated by only two prior studies so far [26, 27]. For example, the ethanolic and dichloromethane extracts from the rhizome were found to have free radical scavenging activity [26], whereas the hexane extract exhibited only minor cytotoxicity activity on many cancer cell lines as well as slightly inhibited some Gram positive and negative bacterial strains [27]. This study, thus, provides the phytochemical and antimicrobial properties of the essential oil and the acetone extracts obtained from *B. xiphostachya* for the first time.

The aim of the study. This study is the first to investigate the chemical composition and antimicrobial properties of acetone extracts and essential oil obtained from *B. xiphostachya*.

Materials and methods

Plant materials

Plant samples of *B. xiphostachya* were collected from Gia Canh commune, Dinh Quan district, Dong Nai province, Vietnam. The vouchered specimens (DQ04082022) were deposited in the Herbarium of the Faculty of Natural Resources and Environment, Vietnam National University of Forestry-Dongnai Campus.

Microbial strains

Eleven bacterial strains and three yeast strains were used in this study, including *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Staphylococcus saprophyticus* BAA750, *Vibrio*

parahaemolyticus ATCC 17802, *Candida albicans* ATCC 26790, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis*.

Distillation of the essential oil

Five hundred grams of fresh rhizomes were washed, sliced into small pieces and submerged in 2.0 liters of distilled water. Steam distillation was carried out for 3 hours at normal pressure in a Clevenger apparatus. About 0.3 mL of essential oil was collected and stored in a dark bottle at 4°C until analyzed.

Acetone extract preparation

Samples of rhizome and aerial part were dried at 50°C then grinded into powder of which 100 g were soaked in 500 mL of 99% acetone solution (Thermo Fisher Scientific, USA) for 48 hours. The extract was collected by filtration and the filtered residue was re-extracted two more times. The pooled filtered extract was subjected to solvent removal under vacuum condition at 45°C.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analysis

The Thermo Scientific™ ISQ™ 7000 GC-MS system (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to determine the composition of the sample as previously described by Nguyen et al. [28]. A gas chromatograph GC TRACE 1310 coupled with a single quadrupole mass spectrometer ISQ 7000 (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to determine the chemical composition of the sample. Agilent GC column DB-5MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) was used as the stationary phase. The Helium carrier gas flow rate was set to 1.2 mL/min. The sample (1.0 µL) was injected into the GC system with the injector temperature maintained at 250 °C. The system was operated in split mode with a split flow of 36 mL/min and a split ratio of 30:1. The splitless time was set to 1 min. The oven programme was set to 80°C for five minutes; 20°C/min to 280°C; hold for 10 minutes; 20°C/min to 300°C; hold for 3 minutes. The transfer line temperature was 280°C, the ion source temperature was 250°C, and the ionization energy was 70 eV. The scan range

was 29-650 m/z, dwell time was 0.2 seconds. The acquired mass spectral data were then compared with the NIST 2017 library to determine the exact chemical composition.

Determination of antimicrobial activity

Disk diffusion method was employed for the antimicrobial activity test following CLSI standards and guidelines [29]. Extract solution was prepared with various concentrations by dissolving into 20% DMSO solution. Gentamicin and ketoconazole disks (10 µg) were used as the positive controls for antibacterial tests and antifungal tests, respectively while 20% DMSO solution was used as the negative control. The experiment was performed three times and the data were analysed using Statgraphics Centurion XV software (ANOVA, $\alpha = 0.05$).

Results and Discussion

Chemical composition of essential oil from *B. xiphostachya* rhizome

The essential oil derived from the rhizome of *B. xiphostachya* exhibits a phytochemical profile comprising 30 distinct compounds. α -fenchene (41.70%) was the most abundant component in the studied oil, followed by other notable compounds, including cyclofenchene (14.75%), camphene (13.47%), caryophyllene (6.78%), eucalyptol (4.83%), *endo*-borneol (2.30%), and bornyl acetate (3.30). Each of the remaining compounds represents less than 2% of the total composition (see Table 1).

The identified compounds show a high similarity to those found in the essential oil of *B. longiflora*, including camphene, α -terpinene, p-cymene, β -ocimene, p-cymenene, and borneol [30]. Notably, the main component, α -fenchene, is also present in *B. rotunda* rhizome, albeit in substantially smaller quantities (2.01%). Despite these similarities, significant differences exist in the phytochemical profiles of the essential oils derived from these *Boesenbergia* species, both in terms of the compounds present and their respective compositions [12, 31].

Table 1

Chemical profile of *Boesenbergia xiphostachya* rhizome essential oil

No.	RT (min)	Compounds	%
1	3.77	Cyclofenchene	14.75
2	4.11	Camphene	13.47
3	4.53	β -Thujene	1.15
4	4.8	α -Fenchene	41.70
5	5.36	Acetic acid, hexyl ester	0.45
6	5.59	α -Terpinene	0.11
7	5.76	p-Cymene	0.29
8	5.86	D-Limonene	1.68
9	5.96	Eucalyptol	4.83
10	6.14	β -Ocimene	1.06
11	6.39	γ -Terpinene	0.24
12	6.85	α -Terpinolen	0.23
13	7.04	Linalool	0.35
14	7.38	Fenchol	0.05
15	7.68	trans-Pinocarveol	0.03
16	8.09	endo-Borneol	2.30
17	8.17	Terpinen-4-ol	0.83
18	8.85	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	0.08
19	9.24	Bornyl acetate	3.30
20	9.47	Terpineol, acetate	0.02
21	9.61	trans-Carveyl acetate	0.01
22	9.75	α -Terpinyl acetate	0.49
23	10.07	β -Sesquiphellandrene	0.04
24	10.13	β -Elemene	0.53
25	10.42	Caryophyllene	6.78
26	10.51	Acetic acid, cinnamyl ester	0.92
27	10.78	α -Curcumene	1.14
28	10.95	γ -Gurjunene	0.36
29	11.29	Nerolidol	1.40
30	11.55	Caryophyllene oxide	0.70
Total			99.29

The chemical composition of the acetone extracts from the aerial parts and rhizome of *B. xiphostachya*

Table 2 presents the chemical composition of the acetone extracts derived from the aerial parts and rhizome of *B. xiphostachya* with a total of 21 and 27 compounds, respectively. The extract from the aerial parts primarily consists of n-hexadecanoic acid (21.32%), 2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl (19.19%), phytol (7.78%), 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (7.63%), and benzoic acid, 2-amino-3-methoxy-, methyl ester (6.07%). Meanwhile, the rhizome extract

contains n-hexadecanoic acid (28,34%); benzoic acid, 2-amino-3-methoxy-, methyl ester (12,25%); cinnamic acid (11,42%); 2-propenoic acid, 3-phenyl-, 1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester, endo (9,06%); and cinoxate (7,27%) as the major compounds. The presence of identified compounds in the rhizome acetone extract differs significantly from that in the rhizome hexane extract. The main compound recorded in the latter was 3,6-dimethoxy-2-ethylbenzaldehyde (38.43%) [27]. Nevertheless, the high concentration of n-hexadecanoic acid in *B. xiphostachya* extracts

suggests the presence of beneficial biological activities, such as antibacterial, antioxidant

and anti-inflammatory properties, as reported in previous studies [32, 33].

Table 2

Chemical profile of *B. xiphostachya* acetone extracts

No.	RT (min)	Compounds	BXA (%)	BXR (%)
1	2.12	3-penten-2-one, 4-methyl	1.73	-
2	2.47	2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl	19.19	5.50
3	3.34	isopropyl acetate	0.31	-
4	3.72	α -pinene	0.53	-
5	4.67	β -Pinene	3.10	1.08
6	5.93	Eucalyptol	-	0.56
7	6.14	Camphene	0.09	-
8	7.01	benzoic acid, methyl ester	-	0.12
9	7.05	Butanoic acid	-	0.09
10	7.06	Linalool	0.57	-
11	8.11	endo-borneol	-	3.23
12	8.57	benzofuran, 2,3-dihydro	1.02	-
13	8.70	1H-pyrrole-2,5-dione, 3-ethyl-4-methyl	-	0.27
14	8.97	benzaldehyde, 4-methoxy	0.26	-
15	9.07	1,3,2-dioxaborolane, 4,5-dimethyl-2-phenyl	-	0.14
16	9.70	benzoic acid, 3-methoxy-, methyl ester	-	0.32
17	9.25	bornyl acetate	-	0.26
18	9.77	α -terpinyl acetate	-	0.40
19	10.10	benzoic acid, 4-methoxy-, methyl ester	-	0.94
20	10.43	Caryophyllene	0.95	1.28
21	10.53	2-propenoic acid, 3-phenyl	-	0.40
22	11.31	benzoic acid, 2-amino-3-methoxy-, methyl ester	6.07	12.25
23	12.06	methyl p-methoxycinnamate, cis	-	0.58
24	12.27	2-propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-	-	1.52
25	12.46	phenol, 2-methyl-5-(1,2,2-trimethylcyclopentyl)-, (S)-	-	0.14
26	12.48	tetradecanoic acid	-	0.15
27	12.92	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	10.57	-
28	12.95	2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	3.42	-
29	13.37	hexadecanoic acid, methyl ester	-	0.49
30	13.59	n-hexadecanoic acid	21.32	28.34
31	13.91	Cinnamic acid	-	11.42
32	14.31	Phytol	7.78	-
33	14.42	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)-	3.50	-
34	14.45	cis-vaccenic acid	4.39	-
35	14.54	octadecanoic acid	3.82	-
36	14.76	2-propenoic acid, 3-phenyl-, 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester, endo	4.40	9.06
37	15.07	limonen-6-ol, pivalate	-	1.96
38	15.29	Cinoxate	-	7.27
39	15.46	ethyl 9,9-diformylnona-2,4,6,8-tetraenoate	3.52	-
40	15.81	androst-4-en-9-thiocyanomethyl-11-ol-3,17-dione	-	1.19
41	16.23	5-bromo-4-hydroxy-1-(4-methoxy-phenyl)-4-methyl-pent-1-en-3-one	-	4.51
Total			98.18	93.47

Note: BXA and BXR indicate the *B. xiphostachya* acetone extract of aerial parts and rhizome, respectively.

Antimicrobial activity of essential oil and acetone extracts from *B. xiphostachya* aerial part and rhizome

As this is the first study of *B. xiphostachya* essential oil, its results show promising antimicrobial results against seven strains of bacteria, including both Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as two strains of *Candida*. Specifically, the rhizome essential oil showed antimicrobial activity against *B. cereus*, *S. aureus* ATCC 29213, *S. typhimurium*, *K. pneumonia* ATCC 700603, *S. flexneri*, *S. saprophyticus*, *V. parahaemolyticus*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with inhibition zone diameters ranged from 11.3 ± 0.6 mm to 14.5 ± 0.5 mm (Table 3). The inhibition zones achieved in the antibacterial activity were more than 50% of the gentamicin inhibition zone. Especially, the inhibition zone against *K. pneumoniae* ATCC 700603 was comparable to the gentamicin control. In the case of *Candida* spp., the antifungal activity resulted in an inhibition zone exceeding 35% of that produced by ketoconazole. Notably, these inhibition zones are comparable to the results achieved with the essential oil of *B. rotunda*, which exhibited antibacterial activity against *B. cereus* and *S. aureus* with inhibition zones ranging from 13.0 ± 4.58 mm to 16.0 ± 3.0 mm [12]. The presence of the prominent compounds cyclofenchene, camphene, caryophyllene and eucalyptol in *B. xiphostachya* essential oil plays a pivotal role in its antimicrobial activity, as extensive research on plant essential oils has consistently reported the presence of these compounds and their antibacterial and antifungal effects [34-38]. In addition, while the biological activity of most terpenes and their derivatives against microbes is well-established, the speculative contribution of α -fenchene, a major component in the *B. xiphostachya* essential oil to the observed antimicrobial activity against the tested microbial strains remains to be elucidated [39].

Interestingly, the acetone extract from the *B. xiphostachya* aerial part exhibited antibacterial activity exclusively against four tested Gram-positive strains. This selective efficacy exhibited a minor variation with the concentration of the extract, which ranged

from 100 mg/mL to 200 mg/mL (Table 3). Conversely, the rhizome extract exhibited stronger activity against all ten of the tested strains, with the exception of *V. parahaemolyticus*. Furthermore, it was observed that a high concentration of the extract, specifically at 200 mg/mL, resulted in a reduction of antibacterial activity against Gram-positive strains and a complete loss of activity against Gram-negative strains. Similar activity to the positive control was observed for the rhizome extract against the tested bacterial strains, such as *S. aureus* ATCC 25923 and *S. saprophyticus*. In the case of *B. cereus*, stronger activity was recorded at a concentration of 150 mg/mL. With the exception of antibacterial activity against *K. pneumoniae* ATCC 700603, which showed about 25% of the activity of gentamicin, antibacterial activity against other tested Gram-negative bacteria exhibited over 45% of the activity of gentamicin (Table 3). Compared to the hexane extract from *B. xiphostachya*, which exhibited weak inhibitory activity against *B. cereus*, *E. faecium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *C. albicans*, the acetone extract in this study displayed superior antibacterial activity [27]. Acetone is an excellent choice for studying plant extracts for several reasons. Its intermediate polarity enables it to efficiently extract a wide range of organic compounds, making it ideal for isolating solutes or analytes with a similar polarity, and for collecting suitable chemical compounds. This could potentially be attributed to the presence of key compounds such as n-hexadecanoic acid and methyl 2-amino-3-methoxybenzoate (also known as benzoic acid, 2-amino-3-methoxy-, methyl ester) in the acetone extracts, and notably, the presence of cinnamic acid in the rhizome extract (Table 2). In addition, n-hexadecanoic acid has been identified to possess antibacterial properties against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, and *K. pneumoniae* [32]. Concurrently, benzoate derivatives and cinnamic acid have been verified to exhibit antimicrobial properties against a range of organisms, including but not limited to *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Aspergillus* spp., and *Candida* spp. [40-43].

Table 3

Inhibition zone (mm) of *B. xiphostachya* essential oil and acetone extracts

No.	Microbial strains	EO	BXA (mg/mL)			BXR (mg/mL)			Control (+)
			100	150	200	100	150	200	
1	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	12.7±1.2 ^a	9.5±0.8 ^b	12.5±2.1 ^a	10.3±3.1 ^{ab}	18.7±2.1 ^c	27.0±0.7 ^d	15.7±1.0 ^c	24.0±1.4 ^e
2	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	12.7±0.3 ^a	12.0±2.6 ^{ab}	11.0±1.0 ^b	10.7±0.58 ^b	20.0±1.7 ^c	21.0±1.0 ^c	16.8±1.0 ^d	18.3±0.6 ^{cd}
3	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	NE	9.3±1.15 ^a	13.3±1.5 ^b	9.8±1.7 ^a	17.3±1.5 ^c	28.8±6.5 ^d	14.0±2.0 ^b	19.0±2.7 ^c
4	<i>S. saprophyticus</i> BAA750	12.2±1.2 ^a	8.0±0.7 ^b	14.7±0.5 ^c	9.0±1.0 ^b	23.0±1.7 ^{de}	20.5±0.9 ^d	14.0±1.0 ^c	25.3 ± 0.6 ^e
5	<i>E. coli</i> ATCC 25922	NE	-	-	-	8.3±0.6 ^a	6.7±1.1 ^a	-	15.3±0.6 ^b
6	<i>E. hormaechei</i> ATCC 700323	NE	-	-	-	8.7±0.6 ^a	8.7±1.1 ^a	-	15.0±0.1 ^b
7	<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	11.3±0.6 ^a	-	-	-	8.0±1.0 ^b	7.3±0.5 ^b	-	17.0±0.0 ^c
8	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	14.5±0.5 ^a	-	-	-	3.7±1.1 ^b	8.1±1.2 ^c	-	15.0±0.1 ^a
9	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	NE	-	-	-	8.0±1.7 ^a	10.7±1.5 ^a	-	15.2±1.3 ^b
10	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	11.7±0.6 ^a	-	-	-	8.3±0.6 ^b	-	-	14.2±0.8 ^c
11	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	12.2±0.3 ^a	NE	NE	NE	NE	NE	NE	23.9±3.9 ^b
12	<i>C. albicans</i> ATCC 26790	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	38.2±1.6
13	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	13.8±0.3 ^a	NE	NE	NE	NE	NE	NE	35.8±1.6 ^b
14	<i>C. tropicalis</i>	10.2±0.8 ^a	NE	NE	NE	NE	NE	NE	29.0±2.6 ^b

Note: (NE) Not evaluated; (-) No inhibition; ^{a,b,c,d} Different superscript lower-case letters in the same row denote significant differences (p<0.05); (EO) essential oil; (BXA) and (BXR) indicate the *B. xiphostachya* acetone extract of aerial parts and rhizome, respectively. Control (+): gentamicin and ketoconazole for antibacterial tests and antifungal tests, respectively.

Conclusion. This research presents the first exploration into the chemical profiles and antimicrobial properties of the essential oil and acetone extracts from *B. xiphostachya*, a newly discovered species in Vietnam. Identifying α -fenchene as the primary component in the essential oil and n-hexadecanoic acid as the main constituent in the acetone extracts of this species distinguishes it from other species in the *Boesenbergia* genus, which have a different compound composition. Given the abundance and diversity of the chemical composition in the rhizome essential oil and acetone extract, their antimicrobial activities against a wide range of Gram-positive and Gram-negative strains, as well as *Candida* yeast, have been elucidated. These findings will improve our understanding of the intricate relationship between the chemical composition of this newly discovered species and its biological effects. They will also facilitate the investigation of its potential applications, particularly in the fields of medical and food sciences.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Delin W, Larsen K. Zingiberaceae [Internet]. Flora of China. 2000 [cited 2024 April 22];24(1):322-377. Available from: <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume24/ZINGIBERACEAE.published.pdf>
2. Techaprasan J, Ngamriabsakul C, Klinbunga S, et al. Genetic variation and species identification of Thai *Boesenbergia* (Zingiberaceae) analyzed by chloroplast DNA polymorphism. BMB Reports. 2006;39(4):361-370. DOI: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2006.39.4.361>
3. Zhang X, Deng J, Tang Y, et al. Zingiberaceae plants/curcumin consumption and multiple health outcomes: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of randomized controlled trials in humans. Phytotherapy Research. 2022;36(8):3080-3101. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.7500>
4. Zhang X, Chen X, Tang Y, et al. Effects of medical plants from Zingiberaceae family on cardiovascular risk factors of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Food Biochemistry. 2022;46(7):e14130. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.14130>
5. Ballester P, Cerdá B, Arcusa R, et al. Antioxidant activity in extracts from Zingiberaceae family: Cardamom, turmeric, and ginger. Molecules. 2023;28(10):4024. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28104024>
6. Kanathum N. Medicinal and lucky plant of Thailand. Bangkok: Baanlaesuan; 2008.
7. Chuakul W, Boonpleng A. Ethnomedical uses of Thai Zingiberaceous plant (1). Thai Journal of Phytopharmacy. 2003;10(1):33-39.
8. Chander MP, Vinod Kumar K, Lall C, et al. GC/MS profiling, in vitro anti-leptospiral and haemolytic activities of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. used as a medicinal plant by Nicobarese of Andaman and Nicobar Islands. Natural Product Research. 2016;30(10):1190-1192. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1046068>
9. Abdelwahab SI, Mohan S, Abdulla MA, et al. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. Journal of Ethnopharmacology. 2011;137(2):963-970. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.010>
10. Break MKB, Chiang M, Wiart C, et al. Cytotoxic activity of *Boesenbergia rotunda* extracts against nasopharyngeal carcinoma cells (HK1). cardamonin, a *Boesenbergia rotunda* constituent, inhibits growth and migration of HK1 cells by inducing caspase-dependent apoptosis and G2/M-phase arrest. Nutrition and Cancer. 2021;73(3):473-483. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1751217>
11. Nguyen MTT, Nguyen HX, Dang PH, et al. Panduratin Q-Y, dimeric metabolites from *Boesenbergia rotunda* and their antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. Phytochemistry. 2021;183:112646. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112646>
12. Baharudin MKA, Hamid SA, Susanti D. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from three aromatic plants of the

Zingiberaceae family in Malaysia. Journal of Physical Science. 2015;26(1):71-81.

13. Apinundecha C, Teethaisong Y, Suknasang S, et al. Synergistic Interaction between *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Essential Oil and Cloxacillin on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Inhibition. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2023;2023:3453273. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/3453273>

14. Kongratanasert T, Kongsomros S, Arya N, et al. Pharmacological activities of fingerroot extract and its phytoconstituents against SARS-CoV-2 infection in Golden Syrian hamsters. Journal of Experimental Pharmacology. 2023;15:13-26. DOI: <https://doi.org/10.2147/JEP.S382895>

15. Ruttanapattanakul J, Wikan N, Okonogi S, et al. *Boesenbergia rotunda* extract accelerates human keratinocyte proliferation through activating ERK1/2 and PI3K/Akt kinases. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2021;133:111002. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111002>

16. Zhang L, Jiang Q, Wang X, et al. *Boesenbergia rotunda* displayed anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic efficacy in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. Scientific Reports. 2023;13(1):11398. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38560-5>

17. Kanchanapiboon J, Kongsu U, Pattamadilok D, et al. *Boesenbergia rotunda* extract inhibits *Candida albicans* biofilm formation by pinostrobin and pinocembrin. Journal of Ethnopharmacology. 2020;261:113193. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113193>

18. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Karalai C, et al. Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. Food Chemistry. 2009;115(2):534-538. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.057>

19. Jamornwan S, Chokpanuwat T, Uppakara K, et al. Anti-inflammatory activity of panduratin A against LPS-induced microglial activation. Biomedicine. 2022;10(10):2587. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicine10102587>

20. Kanjanasirirat P, Suksatu A, Manopwisedjaroen S, et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents. Scientific Reports. 2020;10(1):19963. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77003-3>

21. Bailly C. Toward the use of *Boesenbergia rotunda* extracts and the chalcone panduratin A to treat periodontitis. Journal of Oral Biosciences. 2022;64(2):183-192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.job.2022.03.002>

22. Kirana C, Jones GP, Record IR, et al. Anticancer properties of panduratin A isolated from *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae). Journal of Natural Medicines. 2007;61:131-137. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11418-006-0100-0>

23. Yun JM, Kweon MH, Kwon HJ, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145. Carcinogenesis. 2006;27(7):1454-1464. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi348>

24. Sudsai T, Prabpai S, Kongsaree P, et al. Anti-inflammatory activity of compounds from *Boesenbergia longiflora* rhizomes. Journal of Ethnopharmacology. 2014;154(2):453-461. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.034>

25. Sirirugsa P. A revision of the genus *Boesenbergia* Kuntze (Zingiberaceae) in Thailand. Natural History Bulletin of the Siam Society. 1992;40(1):67-90.

26. Suphrom N, Insumrong K, Sriboon P, et al. Chromatographic fingerprint and free radical scavenging activity of *Boesenbergia xiphostachya* (Gagnep.) Loes rhizome extract. International Journal of Science. 2018;15(1):1-8.

27. Suphrom N, Insumrong K, Ingkaninan K, et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and biological activities of hexane extract from *Boesenbergia xiphostachya* (Gagnep.) Loes rhizome. Agriculture and Natural Resources. 2019;53(5):472-478. DOI: <https://doi.org/10.34044/j.anres.2019.53.5.05>

28. Nguyen ND, Trinh NN, Nguyen QH, et al. Chemical profiles and biological activities of acetone extracts of nine Annonaceae plants. Journal of Applied Botany and Food Quality. 2023;96:148-156. DOI: <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2023.096.019>

29. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2016.

30. Theanphong O, Mingvanish W, Jenjittikul T. Chemical composition and antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities of essential oil from *Boesenbergia longiflora* (Wall.) Kuntze. Agriculture and Natural

Resources. 2022;56(2):363-372. DOI: <https://doi.org/10.34044/j.anres.2022.56.2.14>

31. Ongwisetpaiboon O, Jiraunkoorskul W. Fingerroot, *Boesenbergia rotunda* and its aphrodisiac activity. *Pharmacognosy Reviews*. 2017;11(21):27-30. DOI: https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_50_16

32. Ganesan T, Subban M, Christopher Leslee DB, et al. Structural characterization of n-hexadecanoic acid from the leaves of *Ipomoea eriocarpa* and its antioxidant and antibacterial activities. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022;14:14547-14558. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03576-w>

33. Aparna V, Dileep KV, Mandal PK, et al. Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chemical Biology and Drug Design*. 2012;80(3):434-439. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01418.x>

34. Haznedaroglu MZ, Karabay NU, Zeybek U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*. 2001;72(7):829-831. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(01\)00335-5](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(01)00335-5)

35. de Freitas BC, Queiroz PA, Baldin VP, et al. (-)-Camphene-based derivatives as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. *Future Microbiology*. 2020;15(16):1527-1534. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0131>

36. Khan Z, Saeed MA. Antibacterial potentials of some constituents of *Lavandula stoechas* L. *Pakistan Journal of Botany*. 2002;34(4):359-366.

37. Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. 2015;20(7):11808-11829. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>

38. Hendry ER, Worthington T, Conway BR, et al. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1, 8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(6):1219-1225. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkp362>

39. Mahizan NA, Yang SK, Moo CL, et al. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules*. 2019;24(14):2631. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>

40. Park ES, Moon WS, Song MJ, et al. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2001;47(4):209-214. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00058-0)

41. Ravikumar S, Raja M, Gnanadesigan M. Antibacterial potential of benzoate and phenylethanoid derivatives isolated from *Acanthus ilicifolius* L. leaf extracts. *Natural Product Research*. 2012;26(23):2270-2273. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.652962>

42. Sova M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2012;12(8):749-767. DOI: <https://doi.org/10.2174/138955712801264792>

43. Tonari K, Mitsui K, Yonemoto K. Structure and antibacterial activity of cinnamic acid related compounds. *Journal of Oleo Science*. 2002;51(4):271-273. DOI: <https://doi.org/10.5650/jos.51.271>

Received 22 April 2024

Revised 27 May 2024

Accepted 10 June 2024

Information about the authors

Hop V. Nguyen, Lecturer, Faculty of Natural Resources and Environment, Vietnam National University of Forestry at Dongnai, Trang Bom, Vietnam; PhD student, College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, China, E-mail: hopvfu@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0192-8703>.

ShiPin Chen, Lecturer, College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, China, E-mail: chenshipin@fafu.edu.cn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8090-6616>.

An N.T. Huynh, Lecturer, Faculty of Commerce and Tourism, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: huynhnguyentuongan@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0015-7158>.

Truc H.N. Tran, Student, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: nhatrucc.tran@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6062-4304>.

Ngoc L.H. Vo, Student, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: volehongngoc75@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6275-2248>.

Tho T. Le, MSc, Manager, Center of Analytical Services and Experimentation HCMC, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: tholt@case.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6303-3235>.

Hung Q. Nguyen, PhD, Manager, Center of Analytical Services and Experimentation HCMC, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: hungnq@case.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-6293>.

Thien H. Van, PhD, Associate Professor at the Department of Biotechnology, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: vanhongthien@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0151-5068>.

An N. Nguyen, Lecturer, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial

University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail:

nguyenngocan.cnsh@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7574-2952>.

Hanh T.D. Nguyen, Lecturer, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: nguyenthidieuhanh@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3735-9127>.

Viet T. Pham, PhD, Lecturer at the Department of Biotechnology, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: phamtanviet@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1061-1257>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-5

УДК 615

An investigation into the acute and sub-chronic toxicity of ethanol extract of *Ardisia sylvestris* Pitard leaves *in vivo*

Tran T.P. Nhung , Le P.T. Quoc

Industrial University of Ho Chi Minh City,
12 Nguyen Van Bao St., Ho Chi Minh City, 700000, Vietnam
Corresponding author: Le P.T. Quoc (lephamtanquoc@iuh.edu.vn)

Abstract

Background: The global rise in the usage of herbal medicine has prompted a critical examination of its safety. Despite widespread assumptions of safety, there remains a need for thorough toxicity evaluations to identify potential risks associated with herbal extracts. In traditional Vietnamese medicine, *Ardisia sylvestris* is commonly used for various ailments, yet toxicity assessments specifically focusing on its leaves are lacking. **The aim of the study:** To assess the acute and sub-chronic toxicity of ethanol extract from *A. sylvestris* leaves (EEAS) in mice via oral administration at varying doses. **Materials and methods:** This study employed two experimental models to assess toxicity: acute toxicity testing and sub-chronic toxicity testing. Each model comprised six groups, with six mice per group. The control group and the satellite control group received the vehicle, while the test groups and satellite test groups were administered EEAS at doses ranging from 1000 to 5000 mg/kg b.w (in acute toxicity testing) and from 100 to 500 mg/kg b.w (in sub-chronic toxicity testing). All treatments were conducted over 14 and 90 days, following which satellite groups were further monitored for 28 days after cessation of extract administration. **Results:** The acute toxicity evaluation revealed dose-dependent adverse effects such as elevated respiration rates, increased locomotor activity, sedative effects, and seizures in the initial hours post-administration. However, no mortality was recorded, with observed signs gradually diminishing ($p < 0.05$) over the study period. In acute and sub-chronic tests, significant reductions in food and water intake were noted at higher doses ($p < 0.05$), along with alterations in hematological and biochemical parameters ($p < 0.05$) indicative of physiological stress. Organ weight assessments and macroscopic observations also indicated significant alterations in vital organ morphology at higher doses ($p < 0.05$). Histopathological examinations revealed tissue damage and inflammatory infiltrations in the heart, liver, and kidneys. Urinary parameters displayed significant alterations ($p < 0.05$), particularly in specific gravity, pH, and ketone levels. Nonetheless, these effects were temporary and reversible upon discontinuation of EEAS ($p > 0.05$). **Conclusion:** Overall, while EEAS exhibited dose-dependent acute and sub-chronic toxicity effects, most adverse outcomes were reversible. This holds significant implications for assessing the safety of EEAS, indicating that the effects are manageable and do not result in prolonged or irreversible consequences.

Keywords: acute toxicity; rodent model; sub-chronic toxicity; safety assessment; toxicological profile

For citation: Nhung TTP, Quoc LPT. An investigation into the acute and sub-chronic toxicity of ethanol extract of *Ardisia sylvestris* Pitard leaves *in vivo*. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):654-674. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-5

Introduction. Since ancient times, plants have been utilized for medicinal purposes in various indigenous healthcare systems. Presently, herbal medicine is gaining popularity worldwide, especially in developing countries where medicinal plants are abundant and cost-effective [1]. While many people perceive natural remedies to have fewer side effects compared to synthetic drugs, the widespread belief that herbal medicine is entirely safe and devoid of adverse effects is not entirely accurate. In reality, several studies have uncovered potential harmful side effects associated with medicinal plants. It appears that using herbal remedies without assessing their toxicity could pose health risks. Therefore, it is crucial to investigate the potential adverse effects of herbal treatment methods [2]. Acute and sub-chronic toxicity tests are employed to assess chemicals' potential hazards and safety. These experiments involve evaluating the effects of a single dose or repeated doses of a chemical on animals and are often utilized to identify potential risks and manage hazards associated with chemical production, handling, and utilization [3]. Acute toxicity testing involves administering a single dose of a chemical to assess the severity of its harmful effects on animals. In contrast, sub-chronic toxicity testing entails administering repeated doses of the chemical to evaluate its potential for long-term effects on target tissues or organs. These experiments yield crucial information for identifying hazards and managing risks [4].

The genus *Ardisia*, comprising approximately 500 species, stands as the largest within the Myrsinaceae family. *Ardisia* species are widely distributed across tropical and subtropical regions worldwide and have been employed in the treatment of various ailments including cancer, hypertension, menstrual disorders, diarrhea, and among others. With their rich chemical composition, the isolation and identification of 111 different compounds from *Ardisia* species, including

saponin triterpenoids, quinones, coumarins, depsipeptides, flavonoid quinones, polyphenols, saponin triterpenoids, isocoumarins, and alkylphenols, exhibiting anti-inflammatory, antibacterial, antioxidative properties, etc., have been reported [5]. *Ardisia crispa* (Thunb.) A. DC. (Primulaceae family) is a commonly used species in traditional folk medicine practices. In Thailand, its roots are utilized in the treatment of fever, inflammation, pain, joint disorders, and improvement of blood circulation, and combined with other plants to alleviate menstrual pain in women, while its leaves when crushed and applied to wounds, serve as a detoxifying remedy for snake or scorpion bites. In the Indochina region, extracts from the roots are employed to address chest-related issues, whereas in Taiwan, it is utilized as a diuretic and antidote. These traditional applications have garnered significant attention for their potential in modern medicine [6]. In traditional Chinese medicine, *Ardisia japonica* has been noted for its various benefits, including its potential to clear lung congestion, alleviate cough, stimulate blood circulation, and treat circulatory disorders [7]. Additionally, in traditional Vietnamese medicine, *Ardisia sylvestris* (*A. sylvestris*) has been reported to possess photoprotective properties by modulating the activation of protein kinases through scavenging free radicals, enhancing the expression of hyaluronic acid synthase-1, and increasing the production of occludin and transglutaminase [8]. However, to the best of our knowledge, despite the widespread use of *A. sylvestris* in traditional folk medicine, there has been no study evaluating the toxicity of its leaves. Therefore, this study aims to determine the acute and sub-chronic toxicity via oral administration of ethanol extract from *A. sylvestris* leaves in mice, with the hope that these findings will provide crucial information regarding the safety of this extract.

The aim of the study. Assess the acute and sub-chronic toxicity of orally administered ethanol extract from *A. silvestris* leaves in mice, aiming to provide essential safety data for this extract.

Materials and Methods

Plant material collection and ethanol extract preparation

Fresh leaves of *A. silvestris* were collected in An Toan commune, An Lao district, Binh Dinh province, Vietnam, from August to October 2023. A voucher specimen (AS051023VST) was deposited in the herbarium of the Department of Biotechnology, Institute of Biotechnology and Food Technology, Ho Chi Minh City University of Industry, Ho Chi Minh City, Vietnam. Leaves free from pests and diseases were carefully selected and cleaned before use. The leaves were air-dried in a cool place for two days, followed by further drying in a Memmert UN 110 drying oven (Memmert, Germany) at 60°C until the moisture content reached <12%. Subsequently, the dried plant

material was cut into small pieces, ground into fine powder, and stored in moisture-proof bags at room temperature for use in subsequent experiments.

Extraction was carried out at room temperature using 70% ethanol, with 200 g of leaf powder per liter of ethanol. The filtrate was concentrated in a rotary evaporator RV 10 Digital V-C (IKA, Germany) at 40°C. The resulting ethanol extract of *A. silvestris* leaves (designated as EEAS) weighing 42 g was stored at 4°C until further use.

Phytochemical screening of ethanol extract *A. silvestris* leaves

In the investigation of ethanol extraction from *A. silvestris* leaves, botanical analysis was conducted to ascertain the presence of primary and secondary metabolites. The analytical approach adhered to standards outlined by Nhung et al., with minor adjustments made to ensure accuracy and relevance [9]. A detailed procedural outline is depicted in Table 1.

Table 1

Preliminary phytochemical tests for extract of ethanol extract *A. silvestris* leaves

Phytoconstituents	Test	Observation
Tannins	2 ml extract + 2 ml H ₂ O + 2-3 drops FeCl ₃ (5%)	Green precipitate
Flavonoids	1 ml extract + 1 ml Pb(OAc) ₄ (10%)	Yellow coloration
Terpenoids	2 ml extract + 2 ml (CH ₃ CO) ₂ O + 2-3 drops conc. H ₂ SO ₄	Deep red coloration
Saponins	5 ml extract + 5ml H ₂ O + heat	Froth appears
Steroids	2 ml extract + 2 ml CHCl ₃ + 2 ml H ₂ SO ₄ (conc.)	The reddish-brown ring at the junction
Cardiac glycosides	2 ml extract + 2 ml CHCl ₃ + 2 ml CH ₃ COOH	Violet to Blue to Green coloration
Alkaloids	2 ml extract + a few drops of Hager's reagent	Yellow precipitate
Phenolic compound	2 ml extract + 2 ml FeCl ₃	Bluish-green appearance

Phytochemical characterization of ethanol extract *A. silvestris* leaves

Determining the total phenolic content: The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu colorimetric method as described by Nhung and Quoc with some modifications [10]. Specifically, 0.3 ml of the extract was combined with 2.25 ml of Folin-Ciocalteu phenol reagent. After incubating for 5 minutes, 2.25 ml of 6% sodium carbonate solution was added to the mixture and left at room temperature for 90 minutes. Subsequently, the absorbance of the solution

was measured at 725 nm. A standard curve of gallic acid was also established in the range of 0-200 µg/ml using a similar procedure. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract.

Determining the total flavonoid content: The total flavonoid content was determined using the aluminum chloride colorimetric method as described by Nhung and Quoc with specific adjustments [10]. Quercetin was used as the reference standard, and a standard curve for quercetin was generated in the concentration range of 0-200 µg/ml. For this

analysis, 0.5 ml of the extract and 0.5 ml of the standard solution were placed into separate test tubes. To each tube, 10% aluminum chloride (0.1 ml), 1 M potassium acetate (0.1 ml), 80% methanol (1.5 ml), and distilled water (2.8 ml) were added and thoroughly mixed. A blank sample was prepared similarly, replacing 0.5 ml of the extract or standard solution with distilled water and substituting aluminum chloride with distilled water. All tubes were incubated at room temperature for 30 minutes, then the absorbance was measured at a wavelength of 415 nm. The concentration of flavonoids was expressed as milligrams of quercetin equivalent (QE) per gram of extract.

Experimental animals

Healthy Swiss albino mice, with an average weight of 29 ± 2 grams and aged 6 to 7 weeks, were procured from the Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam. All mice were housed in glass cages measuring $60 \times 30 \times 30$ cm (6 mice/cage) and maintained under standard laboratory conditions. This environment included a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity levels between 55-60%, and a 12-hour light/dark cycle. The cages were lined with wood shavings treated with Effective Microorganisms (EM) to eliminate bacteria and odors and were regularly changed every 2-3 days. The mice were cared for at the breeding facility of the Eastern Agriculture and Food Company, District 12, Ho Chi Minh City. The acclimatization process lasted for 7 days. We provided standard rodent food and free access to water for the mice. Throughout our research, we rigorously adhered to ethical principles concerning animal welfare, as stipulated by the unified ethical standards and the Helsinki Declaration on animal research [11].

Acute toxicity testing

This study adhered to the direct experimental procedure outlined by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guidance document number 425 [12]. A total of 24 mice were divided into four test groups, each consisting of six mice. The dosage of extract used to assess acute toxicity was determined based on the method of calculation known as "dose per

unit body weight" [13]. The experimental groups, including EEAS1000, EEAS3000, and EEAS5000, were administered a single dose of the corresponding extract at 1000, 3000, and 5000 mg/kg body weight, respectively. Additionally, the EEAS5000 satellite group also received a single dose of 5000 mg/kg body weight extract. Both the normal control group and the satellite control group received distilled water throughout the treatment period. The experimental and control groups were continuously monitored for 14 days. However, following this period, the satellite control group and the EEAS5000 satellite group were monitored for an additional 28 days. Before treatment, the body weight of each mouse was measured to determine the appropriate dosage. Mice were fasted and deprived of water overnight before administration of the extract. Each mouse received a single dose of the extract via gastric intubation within 24 hours. Clinical manifestations of toxicity were monitored and recorded immediately within the first hour post-administration of the EEAS dosage, followed by assessments every 2 hours over 24 hours, and continued daily for the subsequent 14 days. Clinical toxicity indices such as mortality rate, general behavior, body weight, food, and water intake, as well as urine analysis of the treated mice, were recorded weekly. During the final observation period, parameters including hematological indices, serum biochemical profiles, relative organ weights, and histopathological analyses of the organs were also analyzed and evaluated.

Sub-chronic toxicity study

The sub-chronic toxicity study of EEAS was conducted following OECD 408 guidelines [14]. EEAS at doses of 100, 300, and 500 mg/kg body weight were selected and administered orally daily for 90 days to three different groups of mice, designated as EEAS100, EEAS300, and EEAS500 groups, respectively. Throughout the treatment period, all experimental animals were observed weekly for any abnormal clinical signs, body weight changes, food, and water consumption, as well as urine analysis done in 90 days. The satellite control group and the EEAS500 satellite group were further monitored for an

additional 28 days after the end of the experimental period. After the study, the mice were euthanized and dissected to analyze and evaluate hematological parameters, serum biochemical profiles, relative organ weights, and organ histopathology.

Clinical observations

In each toxicity testing model, 24 mice were randomly assigned to 4 groups, with all mice housed in separate cages. Individual identification was established by permanent tail marking using a marker pen [15]. To achieve observational objectivity, all observations and data recordings were conducted blindly. Research personnel recorded data without knowledge of animal group assignments. Following EEAS administration, each mouse was continuously monitored for the first hour, then every 2 hours for 24 hours, and subsequently once daily to days 14 and 42. All animals were clinically observed daily for signs of toxicity and mortality rates. Visual observations on skin and fur characteristics, eyes, respiratory patterns, the autonomous nervous system feature such as salivation, diarrhea, and urination, central nervous system characteristics such as tremors, relaxation, gait, and posture, and any other abnormal behaviors were conducted once daily [16].

Body weight assessment

The body weight of each mouse was measured using a Sartorius Entris 224i-1S electronic balance (Sartorius, Germany) during the experiment. Mouse body weight was carefully monitored once before drug administration, once weekly throughout the study, and once on the sacrifice day. Weight gain (WG) was calculated using the formula:

$$\text{Weight gain (\%)} = \frac{\text{Final body weight (g)} - \text{Initial body weight (g)}}{\text{Initial body weight (g)}} \times 100 \quad [17]$$

Food and water consumption

Data about food and water intake was recorded before administration to the mice. All remaining food and water were collected and

weighed at the end of each day. Daily food and water intake were calculated using the following formula:

Food consumption (g) = Initial food consumption (g) - Remaining food consumption (g)

Water intake (ml) = Initial water intake (ml) - Remaining water intake (ml) [17]

Hematological and biochemical parameters

Following the experimental period, all surviving animals were subjected to overnight fasting, and blood samples were collected via the retro-orbital sinus method. Blood was divided into two groups of tubes, with half of the tubes containing an anticoagulant, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), for hematological analysis, while the remaining half without anticoagulant was used for biochemical analysis. Estimates of hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), total white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), and platelet count (PLT) were analyzed using an automated hematology analyzer (Sysmex-RX, 21, Japan). Blood samples in tubes without anticoagulant were allowed to clot, and serum was obtained by centrifugation using an electric centrifuge machine (Humax-K, Germany) [18]. Creatinine (CRE) and urea (URE), uric acid (URA), total protein (TP), glucose (mg/ml), triglyceride (mg/ml), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) were analyzed using an automated clinical chemistry analyzer (Auto-Lab 18, Italy).

Assessment of relative organ weight

On the final examination day, mice were euthanized by CO₂ inhalation and dissected for macroscopic examination. Organs such as the heart, liver, and kidneys were carefully excised from the body and weighed. The specimens were then fixed in a 10% formalin solution to achieve histopathological sections. The relative organ weight (ROW) of each animal was calculated as follows:

$$\text{ROW (\%)} = \frac{\text{Absolute visceral weight (g)}}{\text{Body weight on the day of surgery (g)}} \times 100 \quad [19]$$

Histological assessment

The heart, liver, and kidneys were harvested and fixed in neutral buffered formalin (NBF) 10%. Following fixation, tissue sections were rinsed with water and dehydrated through graded alcohols (70%, 90%, and absolute alcohol) and cleared twice in xylene. Subsequently, tissues were embedded in paraffin blocks to form paraffin blocks. Tissue blocks were sectioned into 4 μ m-thick ribbons using a microtome. Tissue sections were mounted on glass slides and stained routinely with hematoxylin (H) and eosin (E). Then, the slides were dehydrated in 50%, 70%, 95% alcohol, and absolute alcohol. Dehydrated sections were cleared in xylene. DPX and coverslips were applied and fixed on microscope slides. Observations were made under a light microscope to detect any histological changes. Following examination, photomicrographs of selected tissue sections were captured at a magnification of $\times 200$ using an integrated digital camera (Evos XL, USA) [17].

Urinalysis

Before urine collection, each mouse was individually placed in a sterilized glass cage for 12 hours to obtain urine samples. Each cage was equipped with water but no food. Fresh urine from each mouse in the glass cage was collected. Urine samples were analyzed and evaluated for specific gravity, pH, ketone,

protein, glucose, and occult blood (red blood cells and white blood cells) using dipsticks, a semi-automated urine analyzer (Meditape UC-1000, Kobe, Japan), and a microscope [17].

Statistical analysis

The results are presented as mean values $\pm$ standard deviation. Differences between the treatments were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's LSD test, utilizing Stagraphics Centurion XVI software (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA), with the statistical significance threshold set at $p < 0.05$.

Results and discussion

Qualitative phytochemical analysis

In the extract of *A. sylvestris* leaves (EEAS), qualitative phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, tannins, saponins, polyphenols, steroids, terpenoids, and flavonoids, while cardiac glycosides were absent (Table 2). Quantitative analysis of phenolic and flavonoid contents in EEAS yielded results as presented in Table 3. Specifically, the total phenolic content (TPC) was determined to be 70.51 ± 2.48 mg GAE/g DW, whereas the total flavonoid content (TFC) was found to be 43.37 ± 1.92 mg QE/g DW. These values provide insightful information regarding the concentration of phenolics and flavonoids within EEAS.

Table 2

Qualitative screening of phytochemicals in the ethanol extract of *A. sylvestris* leaves

Phytochemicals	Present in EEAS	Phytochemicals	Present in EEAS
Alkaloids	+	Cardiac glycosides	-
Tannins	+	Steroids	+
Saponins	+	Terpenoids	+
Polyphenols	+	Flavonoids	+

Note: Presence of phytochemicals in EEAS: (+) present and (-) absent

Table 3

Determining the concentrations of flavonoids, and polyphenols in the ethanol extract of *A. sylvestris*

Sample	Total flavonoid content (mg QE/g)	Total polyphenol content (mg GAE/g)
EEAS	43.37 ± 1.92	70.51 ± 2.48

Ardisia sylvestris P. is a member of the *Ardisia* genus, belonging to the *Myrsinaceae* family, with a long history of traditional

medicinal use due to the presence of bioactive compounds. *A. sylvestris* exhibits various valuable biological activities including

antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anti-diabetic, anti-osteoporotic, neuroprotective, hepatoprotective, and notably, highly effective anticancer properties [20]. To assess the potential toxicity of *A. silvestris*, a commonly used species in traditional medicine, both acute and sub-chronic toxicity are investigated. Current research reveals that the ethanol extract of *A. silvestris* leaves (EEAS) contains phytochemical compounds, notably exhibiting high concentrations of polyphenols and flavonoids. These findings align with those of Huynh et al., who utilized petroleum ether, ethyl acetate, ethanol, and water extracts and reported elevated TPC and TFC values in *A. silvestris* leaves [20]. The presence of alkaloids, tannins, saponins, polyphenols, steroids, terpenoids, and flavonoids in the extract signifies a rich concentration of phytochemicals with potential therapeutic benefits. These compounds are associated with various pharmacological properties such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and anticancer activities. The significant levels of phenolic and flavonoid contents in the extract indicate its potential efficacy. Phenolics and flavonoids are renowned for their antioxidant properties, playing a crucial role in neutralizing harmful free radicals and reducing oxidative stress-related damage in the body. Furthermore, flavonoids are linked to anti-inflammatory effects, cardiovascular protection, and modulation of cellular signaling pathways involved in disease progression [21]. Despite the promising therapeutic potential conferred by the botanical chemical composition and high levels of phenolic and flavonoid content in the extract, careful consideration of dosage and duration of use is paramount to mitigate potential adverse effects. Alkaloids, while often possessing therapeutic properties, can also exhibit toxic effects at high doses. Some tannins and saponins may cause gastrointestinal irritation and other adverse reactions when consumed excessively. Steroids, terpenoids, and flavonoids, although offering potential health benefits, can also have toxic effects on various organ systems if

consumed in excessive quantities, potentially causing gastrointestinal discomfort and interfering with nutrient absorption in large amounts. The high concentration of phenolic and flavonoid contents, while indicative of the extract's therapeutic potential, also raises concerns about potential toxicity, especially with prolonged or excessive consumption. Specifically, phenolic compounds may induce cellular toxicity at high doses, while flavonoids can interfere with certain enzyme processes and drug metabolism pathways, leading to adverse reactions [22]. Therefore, comprehensive toxicity studies of EEAS are necessary to assess the safety profile of the extract and ensure its suitability for therapeutic purposes.

Behavior evaluation

Observation of acute toxicity behavior in experimental animals following administration of the extract at concentrations of 1000, 3000, and 5000 mg/kg b.w revealed elevated respiration rates within the first hour in the treated groups, accompanied by increased body locomotor activity within the initial 2 hours. Sedative effects and drowsiness were noted across all extract-treated groups during the first 4 hours. Seizures and tremors were observed in animals treated with the extract consistently within the initial 4 hours, particularly in the 5000 mg/kg b.w dose group, with itching and tremors persisting up to 24 hours. Occasionally, itching was observed in the EEAS3000, EEAS5000 group, and satellite EEAS5000 group during the first week of the study. No mortality was recorded throughout the study period. However, signs gradually diminished after 14 days of observation, with complete disappearance by day 42 in the satellite EEAS5000 group.

The toxic effects of drugs on vital organs of the body are manifested through clinical signs and symptoms, which are among the primary observations of various toxicity indices [23]. In the initial hours following exposure to the extract, an increase in respiration rate and heightened body movements are observed, indicative of mental stimulation or activation of components within the nervous system. The effects of EEAS occur

either directly on portions of the central nervous system or through mechanisms akin to receptor stimulation, eliciting neural responses. The observed soothing and sedative effects stem from EEAS components capable of influencing the central nervous system, diminishing alertness, and promoting drowsiness. Convulsions and tremors in mice signify nervous system stimulation or aberrant neuronal activity. EEAS components impact the electrical activity of nerve cells, resulting in seizures and tremors. Sensations of itchiness and stinging denote the body's reaction to components within the extract [24]. Following initial exposure to the toxic extract, the animal body processes the toxin through metabolic pathways, urinary excretion, and other mechanisms. As the toxic load diminishes within the body, clinical symptoms gradually abate. Subsequently, there may be a phase where the toxic extract accumulates within the organism, precipitating symptomatic manifestations. However, by the 42nd day, the body has effectively eliminated the toxin, resulting in a gradual resolution of clinical manifestations. Of particular note is the adaptive capacity of the animal body to endure

the presence of toxins over some time. Once adaptation occurs, symptomatic manifestations also diminish as the body's inherent defense mechanisms stabilize endocrine and nervous system function. The detoxification process may extend over some time and does not occur immediately. By day 14, a substantial portion or the majority of the toxin may have been eliminated, with complete eradication achieved by day 42 [23].

Body weight changes

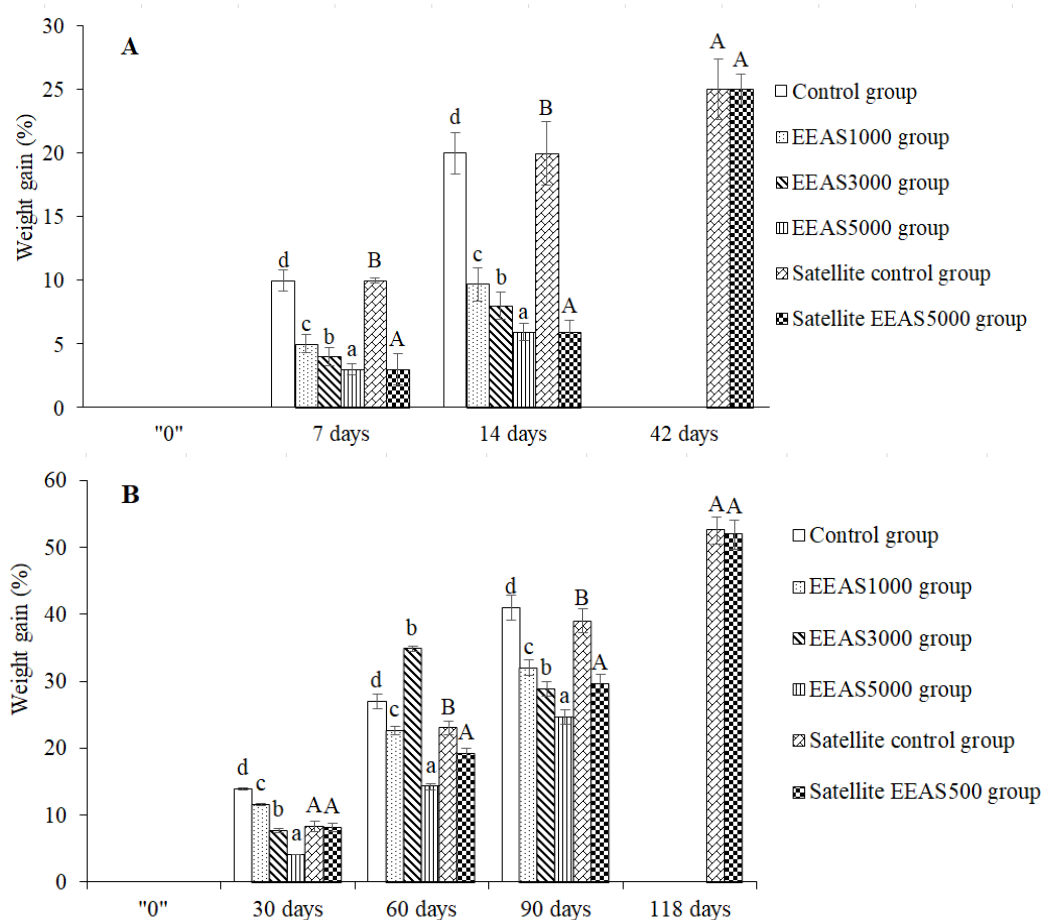
Throughout the study period, both control and ethanol extract of *A. sylvestris* leaves (EEAS) treated groups exhibited a gradual increase in body weight in both acute and sub-chronic toxicity experiments, as depicted in Table 4 ($p < 0.05$). The variation in body weight gain ($p < 0.05$) between EEAS-treated mice and the control group was observed consistently during the study phase (Fig. 1). Upon concluding acute and sub-chronic toxicity assessment, the body weight and weight gain of mice in satellite groups (Satellite EEAS5000 group and Satellite EEAS500 group) showed no significant difference ($p > 0.05$) compared to the satellite control groups (Table 4, Fig. 1).

Table 4

Effects on body weight indices in mice of extract and vehicle-treated groups

Acute toxicity test						
Days/ groups	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
“0”	31.36 ± 0.19 ^a	31.48 ± 0.22 ^a	30.99 ± 0.14 ^a	30.91 ± 0.16 ^a	31.24 ± 0.23 ^A	31.18 ± 0.20 ^A
7 days	34.49 ± 0.26 ^d	33.05 ± 0.16 ^c	32.23 ± 0.36 ^b	31.84 ± 0.29 ^a	34.36 ± 0.31 ^B	32.12 ± 0.38 ^A
14 days	37.63 ± 0.51 ^d	34.53 ± 0.33 ^c	33.47 ± 0.48 ^b	32.76 ± 0.38 ^a	37.48 ± 0.64 ^B	33.05 ± 0.49 ^A
42 days					39.05 ± 0.59 ^A	38.98 ± 0.61 ^A
Sub-chronic toxicity test						
Days/ groups	Control group	EEAS100 group	EEAS300 group	EEAS500 group	Satellite control group	Satellite EEAS500 group
“0”	28.77 ± 0.21 ^a	29.16 ± 0.28 ^a	29.22 ± 0.31 ^a	29.97 ± 0.28 ^a	28.22 ± 0.39 ^A	28.29 ± 0.19 ^A
30 days	32.79 ± 0.28 ^b	32.53 ± 0.26 ^b	31.47 ± 0.25 ^a	31.19 ± 0.31 ^a	30.55 ± 0.32 ^A	30.59 ± 0.38 ^A
60 days	36.54 ± 0.58 ^c	35.76 ± 0.51 ^b	34.82 ± 0.48 ^a	34.25 ± 0.46 ^a	34.71 ± 0.46 ^B	33.72 ± 0.43 ^A
90 days	40.57 ± 0.82 ^c	38.49 ± 0.71 ^b	37.64 ± 0.71 ^{ab}	37.36 ± 0.69 ^a	39.22 ± 0.83 ^B	36.67 ± 0.64 ^A
118 days					43.05 ± 0.93 ^A	42.98 ± 0.91 ^A

Note: Values are expressed as Mean±SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$).



Note: Results are expressed as Mean±SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$).

Fig. 1. Influence of extract treatment and vehicle on weight gain in mice.
Figure A: Acute toxicity test, Figure B: Sub-chronic toxicity test

In toxicity experiments, changes in body weight serve as an indicator of potential adverse effects of the administered extract. Body weight alterations signify nutritional status changes and the overall health of the animals, serving as markers for the influence of external factors such as stress, toxins, or environmental conditions. Variations in animal body weight serve as early manifestations of the toxic effects of the administered extract. Decreases in weight may indicate compromised health, nutritional disorders, bodily injury, or intricate and sensitive signs following exposure to the extract. Conversely, weight gain suggests enhanced nutrient absorption or increased cellular tissue production, while also signaling allergic reactions or metabolic stress [25]. In

the current study, both the group treated with ethanol extract from *A. sylvestris* leaves (EEAS) and the control group exhibited a gradual increase in average body weight within normal ranges. The weight gain between the control group and the EEAS-treated group at doses up to 5000 mg/kg b.w and 500 mg/kg b.w did not show significant differences, particularly in the satellite groups. These results indicate that both the EEAS-treated group and the control group demonstrated a normal trend of increasing average body weight. EEAS did not induce significant alterations in body weight compared to the control group under the established study conditions. EEAS may not exert significant harmful effects on the body weight of experimental animals.

Food and water intake

During the experiment, weekly recordings of food and water consumption were conducted. The results revealed a significant reduction in food and water intake at doses of 3000 and 5000 mg/kg body weight (in acute toxicity testing) and 300 and 500 mg/kg body weight (in sub-chronic toxicity testing) compared to the control group

($p < 0.05$) (Tables 5 and 6) on days 7 and 14. However, no significant differences in food and water intake were noted between the Satellite control group and the Satellite EEAS5000 and Satellite EEAS500 test groups on days 42 (in acute toxicity testing) and day 118 (in sub-chronic toxicity testing) ($p > 0.05$) (Tables 5 and 6).

Table 5

Influence of extract treatment and vehicle on food consumption in mice

Acute toxicity test						
Days/ groups	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
"0"	5.98 ± 0.16 ^a	6.05 ± 0.15 ^a	5.97 ± 0.15 ^a	5.99 ± 0.15 ^a	6.02 ± 0.11 ^A	6.01 ± 0.09 ^A
7 days	6.04 ± 0.14 ^b	5.87 ± 0.19 ^{ab}	5.79 ± 0.19 ^a	5.75 ± 0.16 ^a	5.99 ± 0.06 ^B	5.77 ± 0.06 ^A
14 days	6.01 ± 0.11 ^b	5.81 ± 0.18 ^a	5.74 ± 0.14 ^a	5.69 ± 0.16 ^a	6.04 ± 0.07 ^B	5.72 ± 0.03 ^A
42 days					6.01 ± 0.03 ^A	5.99 ± 0.03 ^A
Sub-chronic toxicity test						
Days/ groups	Control group	EEAS100 group	EEAS300 group	EEAS500 group	Satellite control group	Satellite EEAS500 group
"0"	6.27 ± 0.21 ^a	6.29 ± 0.18 ^a	6.21 ± 0.24 ^a	6.28 ± 0.21 ^a	6.29 ± 0.14 ^A	6.27 ± 0.22 ^A
30 days	6.31 ± 0.22 ^d	5.94 ± 0.19 ^c	5.46 ± 0.25 ^b	5.05 ± 0.24 ^a	6.27 ± 0.19 ^B	5.14 ± 0.21 ^A
60 days	6.29 ± 0.21 ^d	5.71 ± 0.27 ^c	5.23 ± 0.26 ^b	4.84 ± 0.22 ^a	6.31 ± 0.26 ^B	4.97 ± 0.18 ^A
90 days	6.28 ± 0.24 ^d	5.48 ± 0.19 ^c	5.01 ± 0.21 ^b	4.62 ± 0.26 ^a	6.28 ± 0.23 ^B	4.71 ± 0.19 ^A
118 days					6.32 ± 0.07 ^A	6.31 ± 0.09 ^A

Note: Values are expressed as Mean±SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs the satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$).

Table 6

Influence of extract treatment and vehicle on water consumption in mice

Acute toxicity test						
Days/ groups	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
"0"	7.82 ± 0.27 ^a	7.84 ± 0.24 ^a	7.85 ± 0.27 ^a	7.83 ± 0.27 ^a	7.85 ± 0.15 ^A	7.84 ± 0.14 ^A
7 days	7.85 ± 0.26 ^c	7.34 ± 0.16 ^b	7.11 ± 0.15 ^{ab}	6.88 ± 0.19 ^a	7.83 ± 0.19 ^B	6.91 ± 0.13 ^A
14 days	7.83 ± 0.27 ^c	6.73 ± 0.25 ^b	6.49 ± 0.27 ^{ab}	6.25 ± 0.25 ^a	7.82 ± 0.22 ^B	6.29 ± 0.18 ^A
42 days					7.84 ± 0.07 ^A	7.83 ± 0.04 ^A
Sub-chronic toxicity test						
Days/ groups	Control group	EEAS100 group	EEAS300 group	EEAS500 group	Satellite control group	Satellite EEAS500 group
"0"	8.07 ± 0.14 ^a	8.08 ± 0.19 ^a	8.06 ± 0.21 ^a	8.07 ± 0.25 ^a	8.05 ± 0.19 ^A	8.06 ± 0.24 ^A
30 days	8.09 ± 0.21 ^c	7.55 ± 0.19 ^b	7.34 ± 0.13 ^{ab}	7.13 ± 0.16 ^a	8.08 ± 0.15 ^B	7.17 ± 0.25 ^A
60 days	8.06 ± 0.25 ^c	6.94 ± 0.25 ^b	6.24 ± 0.21 ^{ab}	6.48 ± 0.23 ^a	8.06 ± 0.24 ^B	6.53 ± 0.24 ^A
90 days	8.08 ± 0.27 ^c	6.42 ± 0.26 ^b	6.21 ± 0.16 ^b	4.98 ± 0.15 ^a	8.04 ± 0.21 ^B	5.01 ± 0.19 ^A
118 days					8.09 ± 0.09 ^A	8.08 ± 0.08 ^A

Note: Values are expressed as Mean±SD. The letters (a, b, and c) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs the satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$).

Food and water intake play crucial roles as fundamental indicators of health and overall physiological status in an organism. Changes in consumption patterns may reflect alterations in physiological status, such as decreased appetite, and digestive or metabolic disorders, resulting from exposure to toxic substances [26]. Reductions in food and water intake following exposure to a potentially toxic substance can indicate adverse effects on the organism, including impacts on the digestive system, liver, kidneys, or central nervous system, among others. Changes in food and water intake serve as endpoints for toxicity assessment, providing vital information for evaluating the overall impact of the extracted substance and its safety profile. Monitoring food and water consumption over time allows for the assessment of dynamic changes in toxicity responses. Recovery or adaptation models following cessation of exposure provide insightful information on the reversibility of harmful effects and the organism's recovery capabilities [27]. The impact of EEAS on food and water consumption reflects the biological effects of this extract on the body. The reduced intake of food and water in the high-dose EEAS groups suggests that EEAS may affect or decrease the absorption of food, water, or nutrients in the body. This outcome may be due to the negative effects of EEAS on the digestive or endocrine systems, influencing metabolism and energy expenditure, or changes in taste perception and appetite. Changes in food and water consumption provide valuable information about the biological effects of EEAS on the body, aiding in understanding its potential to address health and environmental issues. However, no significant differences in food and water consumption were observed between the Satellite control group and the Satellite EEAS5000 and Satellite EEAS500 test groups on day 42 (in acute toxicity testing) and day 118 (in sub-chronic toxicity testing), indicating that the effects of EEAS on food and water consumption may be temporary and reversible after discontinuation of its use. This provides important insights into the

independence and recovery capabilities of the body after exposure to EEAS.

Hematological and biochemistry analysis

The effects of administering the ethanol extract of *A. sylvestris* leaves (EEAS) orally on hematological parameters are summarized in Table 7. In acute and sub-chronic toxicity experiments, we observed a significant decrease in the EEAS-treated groups ($p < 0.05$) compared to the control in terms of red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), and hematocrit levels (HCT). Additionally, white blood cell count (WBC) and platelet count (PLT) significantly increased ($p < 0.05$) during the 14-day (acute toxicity) and 90-day (sub-chronic toxicity) experimental periods. Table 8 illustrates the fluctuation of biochemical parameters in mice treated with EEAS compared to the control group. The results showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the levels of total protein (TP), glucose (GLU), and triglycerides (TRI) in the EEAS-treated groups at various doses compared to the control group. Meanwhile, the concentrations of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), uric acid (URA), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (CRE) significantly increased ($p < 0.05$) compared to the control group throughout the 14 and 90-day periods. These current findings indicate that oral administration of EEAS may impact hematological and biochemical parameters when exposed to it. However, in the satellite groups, no significant changes ($p > 0.05$) in hematological and biochemical parameters were observed after 42 and 118 days of follow-up (Tables 7 and 8). Specifically, after 42 days of follow-up in the acute toxicity model and after 118 days of follow-up in the sub-chronic toxicity model (i.e., 28 days after discontinuation of EEAS), there were no significant differences ($p > 0.05$) in hematological and biochemical levels between the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups compared to the control satellite group. These results indicate that the effects of EEAS on hematological and biochemical parameters are temporary and reversible after discontinuation of the extract.

Table 7

Impact of extract processing and administration on hematological parameters in mice

Acute toxicity test						
Parameters	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
RBC ($\times 10^6$ cells/mm ³)	8.25 $\pm$ 0.31 ^d	7.86 $\pm$ 0.28 ^c	7.51 $\pm$ 0.25 ^b	7.17 $\pm$ 0.26 ^a	8.27 $\pm$ 0.13 ^A	8.25 $\pm$ 0.11 ^A
HGB (g/dL)	13.71 $\pm$ 0.35 ^d	13.06 $\pm$ 0.34 ^c	12.46 $\pm$ 0.31 ^b	11.93 $\pm$ 0.32 ^a	13.72 $\pm$ 0.16 ^A	13.69 $\pm$ 0.13 ^A
HCT (%)	0.44 $\pm$ 0.04 ^b	0.41 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.37 $\pm$ 0.05 ^a	0.46 $\pm$ 0.02 ^A	0.47 $\pm$ 0.03 ^A
WBC ($\times 10^3$ cells/mm ³)	3.61 $\pm$ 0.04 ^a	3.79 $\pm$ 0.06 ^b	3.97 $\pm$ 0.05 ^b	4.15 $\pm$ 0.03 ^b	3.62 $\pm$ 0.02 ^A	3.63 $\pm$ 0.03 ^A
PLT ($\times 10^3$ cells/mm ³)	652.72 $\pm$ 29.29 ^a	685.37 $\pm$ 32.48 ^{ab}	717.99 $\pm$ 36.57 ^{bc}	750.63 $\pm$ 37.86 ^c	660.75 $\pm$ 15.17 ^A	661.23 $\pm$ 10.65 ^A
Sub-chronic toxicity test						
Parameters	Control group	EEAS100 group	EEAS300 group	EEAS500 group	Satellite control group	Satellite EEAS500 group
RBC ($\times 10^6$ cells/mm ³)	8.08 $\pm$ 0.23 ^d	7.69 $\pm$ 0.27 ^c	7.35 $\pm$ 0.18 ^b	7.03 $\pm$ 0.15 ^a	8.15 $\pm$ 0.07 ^A	8.17 $\pm$ 0.09 ^A
HGB (g/dL)	13.06 $\pm$ 0.19 ^d	12.44 $\pm$ 0.24 ^c	11.87 $\pm$ 0.27 ^b	11.36 $\pm$ 0.23 ^a	13.15 $\pm$ 0.14 ^A	13.14 $\pm$ 0.11 ^A
HCT (%)	0.38 $\pm$ 0.04 ^c	0.35 $\pm$ 0.06 ^{bc}	0.32 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.29 $\pm$ 0.05 ^a	0.39 $\pm$ 0.02 ^A	0.38 $\pm$ 0.03 ^A
WBC ($\times 10^3$ cells/mm ³)	3.41 $\pm$ 0.08 ^a	3.48 $\pm$ 0.07 ^b	3.75 $\pm$ 0.06 ^b	3.92 $\pm$ 0.07 ^b	3.38 $\pm$ 0.03 ^A	3.39 $\pm$ 0.04 ^A
PLT ($\times 10^3$ cells/mm ³)	670.11 $\pm$ 28.24 ^a	703.61 $\pm$ 31.38 ^{ab}	737.09 $\pm$ 35.56 ^{bc}	770.61 $\pm$ 36.48 ^c	676.85 $\pm$ 15.64 ^A	674.83 $\pm$ 12.71 ^A

Note: Values are expressed as Mean $\pm$ SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs the satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). Red blood cells (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), White blood cells (WBC), and Platelet (PLT).

Beginning of Table 8

Impact of extract processing and administration on biochemistry parameters in mice

Acute toxicity test						
Parameters	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
PT (g/dL)	4.54 $\pm$ 0.09 ^d	4.32 $\pm$ 0.08 ^c	4.13 $\pm$ 0.07 ^b	3.95 $\pm$ 0.06 ^a	4.59 $\pm$ 0.08 ^A	4.61 $\pm$ 0.07 ^A
GLU (mg/dL)	5.48 $\pm$ 0.12 ^d	5.22 $\pm$ 0.11 ^c	4.98 $\pm$ 0.14 ^b	4.77 $\pm$ 0.13 ^a	5.52 $\pm$ 0.04 ^A	5.55 $\pm$ 0.04 ^A
TRI (mg/dL)	118.99 $\pm$ 7.91 ^b	113.32 $\pm$ 9.04 ^{ab}	108.17 $\pm$ 7.53 ^a	103.47 $\pm$ 8.81 ^a	117.94 $\pm$ 10.33 ^A	118.01 $\pm$ 10.05 ^A
AST (U/L)	89.26 $\pm$ 1.37 ^a	93.72 $\pm$ 2.71 ^b	98.19 $\pm$ 2.61 ^c	102.65 $\pm$ 3.14 ^d	90.93 $\pm$ 1.94 ^A	91.05 $\pm$ 1.85 ^A
ALT (U/L)	58.26 $\pm$ 1.35 ^a	61.17 $\pm$ 1.41 ^b	64.09 $\pm$ 1.48 ^c	66.99 $\pm$ 1.52 ^d	59.08 $\pm$ 1.29 ^A	58.99 $\pm$ 1.49 ^A
ALP (U/L)	119.94 $\pm$ 2.57 ^a	125.94 $\pm$ 3.17 ^b	131.93 $\pm$ 3.25 ^c	137.93 $\pm$ 3.35 ^d	120.97 $\pm$ 1.92 ^A	121.05 $\pm$ 2.16 ^A
URA (mg/dL)	12.66 $\pm$ 0.52 ^a	13.29 $\pm$ 0.57 ^{ab}	13.93 $\pm$ 0.43 ^{bc}	14.56 $\pm$ 0.68 ^c	12.92 $\pm$ 1.49 ^A	13.02 $\pm$ 1.49 ^A
CRE (mg/dL)	0.38 $\pm$ 0.11 ^a	0.39 $\pm$ 0.11 ^a	0.42 $\pm$ 0.09 ^a	0.42 $\pm$ 0.11 ^a	0.38 $\pm$ 0.02 ^A	0.39 $\pm$ 0.01 ^A
BUN (mg/dL)	12.22 $\pm$ 1.16 ^a	12.83 $\pm$ 1.35 ^{ab}	13.44 $\pm$ 1.41 ^{ab}	14.05 $\pm$ 1.50 ^b	11.95 $\pm$ 0.31 ^A	12.03 $\pm$ 0.35 ^A
Sub-chronic toxicity test						
PT (g/dL)	4.93 $\pm$ 0.11 ^d	4.69 $\pm$ 0.04 ^c	4.48 $\pm$ 0.09 ^b	4.29 $\pm$ 0.07 ^a	5.03 $\pm$ 0.03 ^A	5.01 $\pm$ 0.06 ^A
GLU (mg/dL)	6.13 $\pm$ 0.13 ^d	5.84 $\pm$ 0.14 ^c	5.57 $\pm$ 0.11 ^b	5.33 $\pm$ 0.11 ^a	6.16 $\pm$ 0.07 ^A	6.13 $\pm$ 0.04 ^A
TRI (mg/dL)	133.84 $\pm$ 13.64 ^d	127.48 $\pm$ 10.34 ^{ab}	121.68 $\pm$ 11.52 ^{ab}	116.39 $\pm$ 9.02 ^a	135.97 $\pm$ 8.61 ^A	136.02 $\pm$ 8.72 ^A

End of Table 8

Impact of extract processing and administration on biochemistry parameters in mice

Parameters	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
Acute toxicity test						
AST (U/L)	97.59 ± 3.83 ^a	102.59 ± 7.55 ^{ab}	107.35 ± 6.18 ^{bc}	112.23 ± 5.32 ^c	97.96 ± 1.94 ^A	98.04 ± 1.77 ^A
ALT (U/L)	67.29 ± 2.46 ^a	70.65 ± 2.95 ^{ab}	74.02 ± 3.43 ^{bc}	77.36 ± 3.59 ^c	67.97 ± 1.34 ^A	68.04 ± 1.28 ^A
ALP (U/L)	132.24 ± 3.66 ^a	138.85 ± 3.01 ^b	145.47 ± 3.79 ^c	152.08 ± 4.26 ^d	134.03 ± 2.05 ^A	133.96 ± 1.77 ^A
URA (mg/dL)	11.74 ± 0.58 ^a	12.33 ± 0.71 ^{ab}	12.91 ± 0.82 ^{bc}	13.51 ± 0.76 ^c	12.02 ± 1.92 ^A	11.95 ± 1.61 ^A
CRE (mg/dL)	0.29 ± 0.07 ^a	0.31 ± 0.06 ^a	0.32 ± 0.09 ^a	0.33 ± 0.10 ^a	0.32 ± 0.01 ^A	0.33 ± 0.01 ^A
BUN (mg/dL)	11.99 ± 1.37 ^a	12.59 ± 1.49 ^a	13.1 ± 1.63 ^a	13.78 ± 1.81 ^a	11.97 ± 0.24 ^A	12.04 ± 0.16 ^A

Note: Values are expressed as Mean±SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs the satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). Total protein (PT), Glucose (GLU), Triglyceride (TRI), Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Uric acid (URA), Blood urea nitrogen (BUN), Creatinine (CRE).

Nutrients and foreign substances are primarily transported throughout the body via the bloodstream. Therefore, blood components such as RBCs, WBCs, PLTs, HCT, and HGB are often exposed to toxic substances. The results regarding the hematological parameters of the groups treated with EEAS in this study show a significant decrease in RBC, HGB, and HCT compared to the control group. This could be explained by the effects of active components in the extract on the production and maintenance processes of red blood cells in the body. The components in the extract may influence the production of red blood cells in the bone marrow or increase the destruction of red blood cells in the immune cell system, while also affecting the flexibility of the red blood cell membrane, leading to increased destruction and decreased lifespan of red blood cells, thereby reducing the number of RBCs. The decrease in RBC count also leads to a decrease in hemoglobin concentration and hematocrit level in the bloodstream. Additionally, the WBC and PLT counts increased significantly compared to the control group after using the extract. This increase is due to the body's immune response to the components in the extract. Upon exposure to the extract, the immune system stimulates the production and release of white blood cells and platelets from specific cell sources such as the

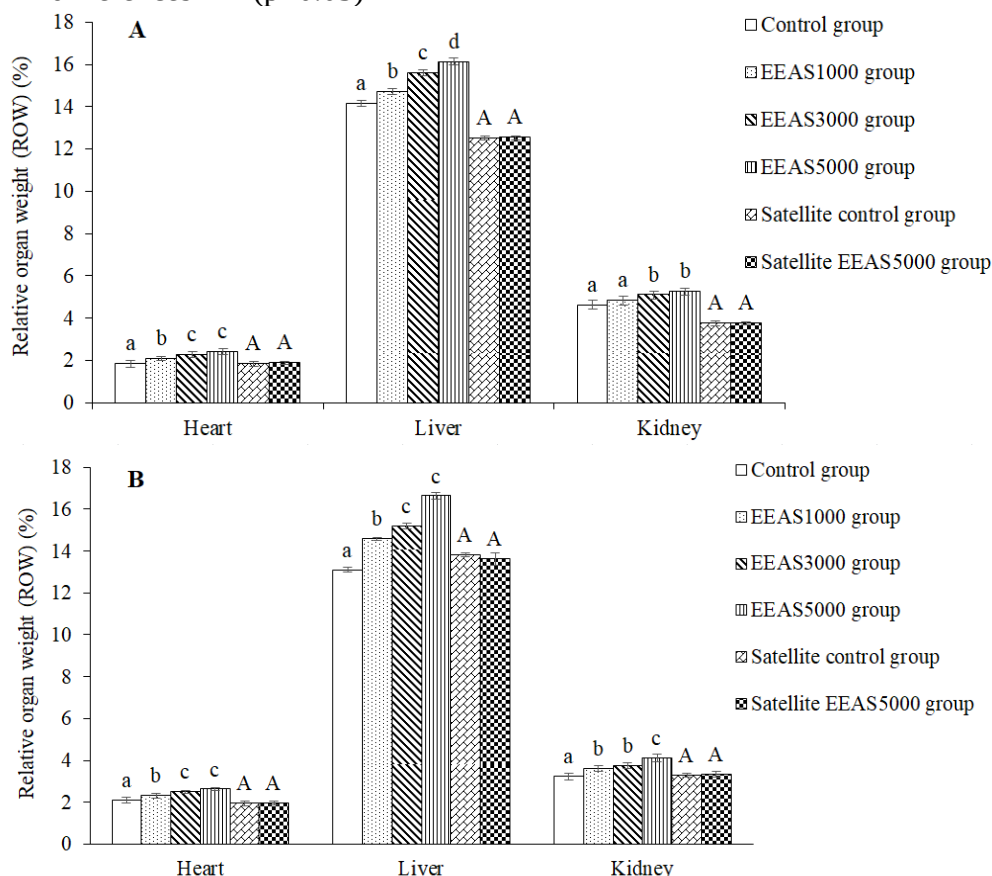
bone marrow and spleen, under the regulation of hormones and growth factors, thereby increasing the number of WBCs and PLTs to protect the body against harmful agents [28]. Biochemical parameters are fundamental diagnostic criteria in clinical practice. They indicate adverse effects caused by substances. Biochemical analyses are used to identify, detect, and describe the harmful effects caused by toxic compounds. These analyses are also crucial for assessing specific target organs affected by toxic compounds and provide valuable information to understand them. The values of URA, URE, and CRE are parameters used to assess kidney damage. Liver function can be evaluated by the levels of markers, including PT, GLU, TRI, ALT, AST, and ALP. The liver and kidneys, involved in xenobiotic elimination, are sensitive organs that can be altered by substances, including plants and drugs. After using EEAS, the levels of PT, GLU, and TRI significantly decreased compared to the control group, indicating the impact of active components in the extract on metabolic processes and nutrient storage in the body. The components in the extract affect protein synthesis, reduce glucose absorption from the intestine, and inhibit triglyceride synthesis and storage in the body. Moreover, they also inhibit the activity of enzymes involved in protein, glucose, and lipid

metabolism and affect the transformation of fat cells and their regulatory mechanisms [25]. Furthermore, the components in EEAS stimulate the growth of liver cells and intestinal mucosal cells, leading to the release of liver and intestinal enzymes. Additionally, EEAS also promotes the development of kidney cells, reducing renal filtration function and increasing the production of catabolites. As a result, the increased production and release of these enzymes into the bloodstream disrupt the body's water and electrolyte balance, leading to significant increases in AST, ALT, URE, CRE, and URA levels in the blood of mice after EEAS administration compared to the control group [28]. However, after 42 days of observation in the acute toxicity model and 118 days in the sub-chronic toxicity model (equivalent to 28 days after discontinuation of EEAS), there were no significant differences ($p>0.05$) in

hematological and biochemical parameters between the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups compared to the control satellite group. Therefore, the impact of EEAS on hematological and biochemical indices appears to be temporary and reversible after discontinuation of the extract.

Relative organ weight

After the experimental phase, the relative organ weights (ROW) of the mouse's vital organs (heart, liver, and kidneys) were assessed, with results depicted in Fig. 2. Overall, in both the acute toxicity model (Fig. 2A) and the sub-chronic toxicity model (Fig. 2B), the ROW of the mouse's heart, kidneys, and liver in groups treated with different doses of EEAS all showed significant statistical increases compared to the control group ($p<0.05$) after 14 and 90 days of observation.



Note: Results are expressed as Mean $\pm$ SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p<0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p<0.05$).

Fig. 2. Influence of extract treatment and vehicle on relative organ weight in mice. Figure A: Acute toxicity test, Figure B: Sub-chronic toxicity test.

Continued monitoring for an additional 28 days (without extract usage) showed that the ROW of the heart, kidneys, and liver in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups were nearly equivalent to the control satellite group ($p>0.05$).

In toxicity experiments, the relative organ weight (ROW) of the heart, liver, and kidneys is commonly used to assess the impact of toxic substances on the body. Changes in organ weight can reflect alterations in the structure and function of these organs following exposure to toxins, while also providing valuable insights into the extent of organ damage and recovery after cessation of exposure to the toxic substance. In the current study, the increase in relative organ weight (ROW) of the heart, liver, and kidneys following the use of the extract reflects the body's response to the extract or its active components. The body typically employs reactive mechanisms to adapt to the impact of new substances, including increasing the size and activity of vital organs such as the heart, liver, and kidneys. The significant increase in liver ROW indicates enhanced hepatocyte proliferation or increased cellular organization to aid in the elimination of toxins or boost the production of liver enzymes to process them. The increase in kidney ROW after EEAS use signifies the body's response to enhance the filtration and elimination of harmful substances. The heart, responsible for pumping blood to nourish the body, exhibits an increased ROW as a response to the increased demand for oxygen supply to the body to deal with toxic substances [29]. Hence, the use of EEAS induces significant changes in the size of vital organs such as the heart, liver, and kidneys. These results demonstrate the body's response to the extract or its active components. However, over time, these changes appear to be transient and may potentially reverse upon discontinuation of the extract. This suggests that the effects of the extract on the body may not be long-lasting or deeply impactful on the structure and function of these organs in the long term.

Macroscopic and histopathological structure of organs

Observations of the macroscopic structure of the heart, liver, and kidneys of mice in the experimental groups at doses of 5000 mg/kg b.w and 500 mg/kg b.w (Fig. 3Ab, e, h and Fig. 3Bb, e, h, respectively) revealed that these organs appeared dark red, the heart was slightly enlarged, with a non-smooth surface and poor elasticity. However, the macroscopic structure of the heart, liver, and kidneys of mice in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups (Fig. 3Ac, f, i and 3Bc, f, i, respectively) showed significant improvement. The organs exhibited uniform dark red coloration, smooth surfaces, soft texture, and resilience upon palpation, without protrusions or hemorrhage. The macroscopic structure of the heart, liver, and kidneys in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups closely resembled that of the control groups (Fig. 3Aa, d, g and Fig. 3Ba, d, g, respectively). The results indicate that the administration of EEAS at doses of 5000 mg/kg b.w and 500 mg/kg b.w resulted in visible improvements in the macroscopic structure of the heart, liver, and kidneys compared to the control group. These improvements include uniform dark red coloration, smooth surfaces, soft texture, resilience upon palpation, and absence of protrusions or hemorrhage, which are indicative of healthier organ morphology. Therefore, it suggests that EEAS treatment may have a positive effect on the structural integrity and function of these organs.

In the histopathological examination of the mouse heart treated with EEAS at doses of 5000 mg/kg b.w and 500 mg/kg b.w (Fig. 4Ab and Fig. 4Bb, respectively), alterations in the nucleus and myocardium were observed, along with the presence of lymphocyte infiltration. Similarly, the hepatic tissue structure exhibited changes (Fig. 4Ae and Fig. 4Be, respectively), characterized by disrupted cell arrangement, dilation of portal veins and central veins, and increased lymphocytic infiltration within the hepatic sinusoids. Likewise, renal tissue morphology was also affected (Fig. 4Ah and Fig. 4Bh, respectively), with distorted glomeruli and Bowman's capsules, as well as infiltration of lymphocytes into Bowman's capsules and renal tubules.

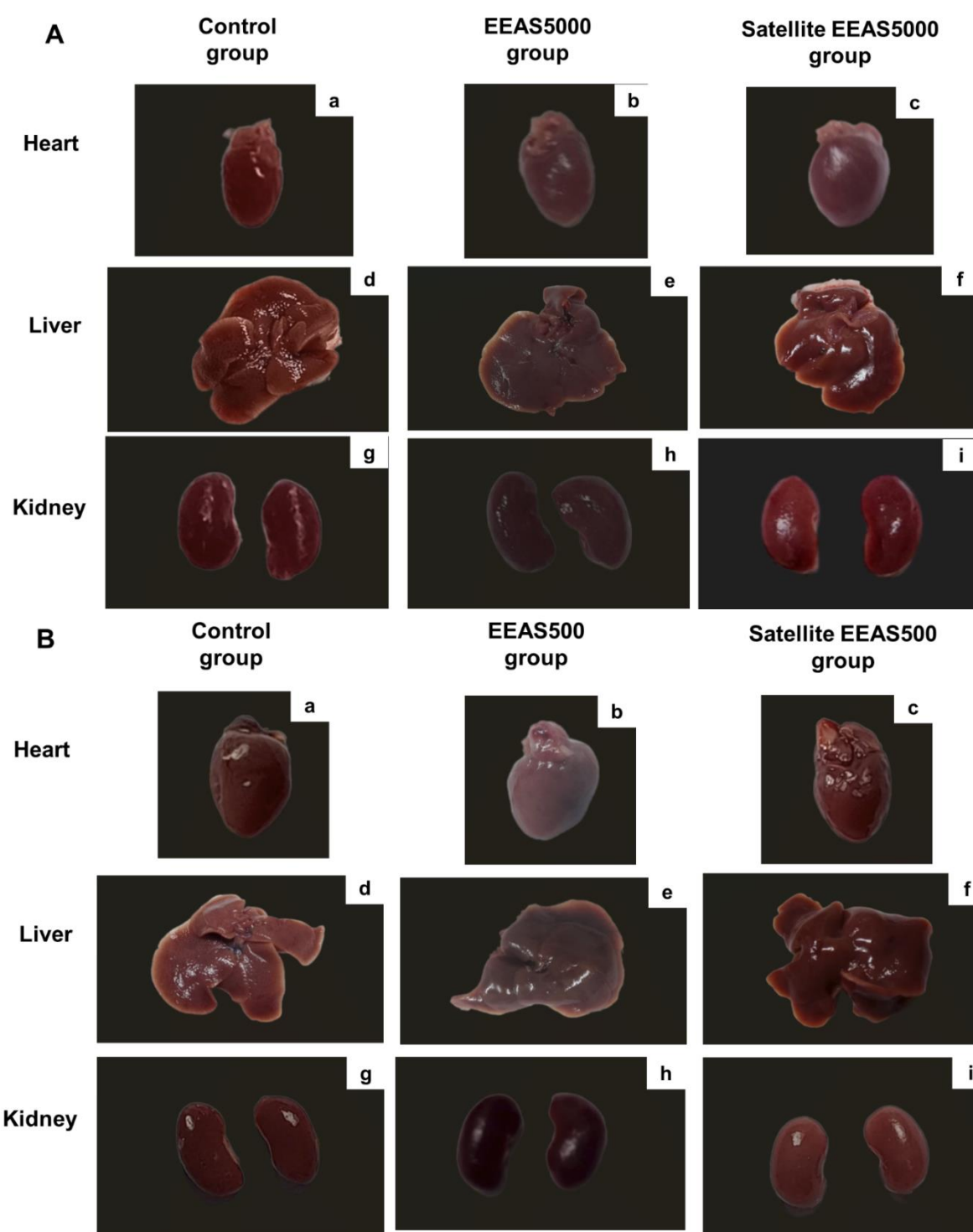
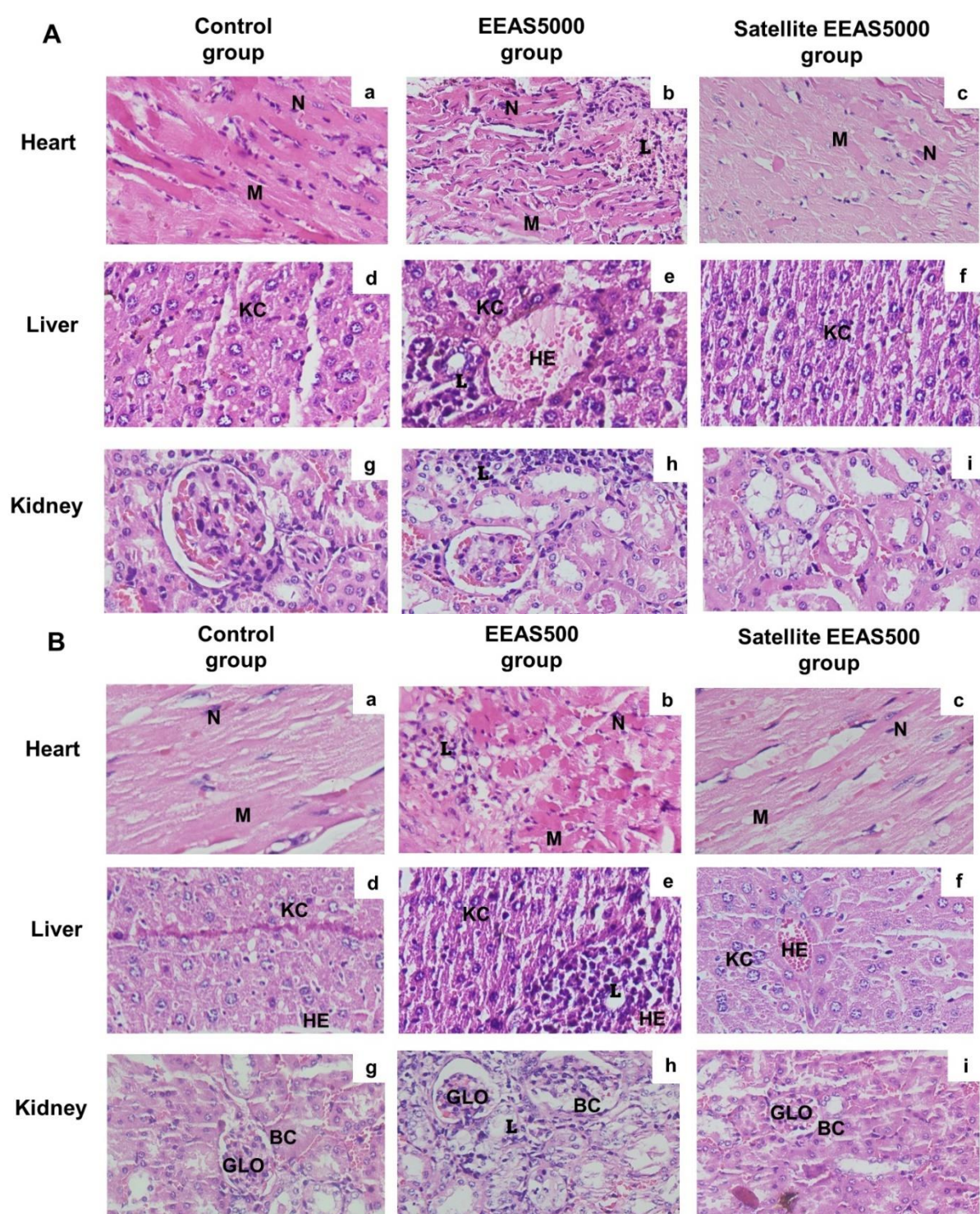


Fig. 3. Influence on macroscopic structures of mouse organs by treatment with extracts and vehicle.
Fig. A: Acute toxicity test, Fig. B: Sub-chronic toxicity test.



Note: Magnification 200× (hematoxylin-eosin stain). N: nucleus, M: myocardium, GLO: glomerulus, BC: Bowman's capsule, HE: Hepatocytes, KC: Kupffer cells, L: Lymphocytes.

Fig 4. Influence on histopathological of mouse organs by treatment with extracts and vehicle. Fig. A: Acute toxicity test, Fig. B: Sub-chronic toxicity test

The results indicate histopathological alterations in the heart, liver, and kidney tissues of mice treated with EEAS. These alterations include changes in cell morphology, such as lymphocyte infiltration, disruption of cell arrangement, and distortion of anatomical structures like glomeruli and Bowman's capsules. These findings suggest potential adverse effects of EEAS on the cellular integrity and structural organization of vital organs. However, the tissue structure of the heart, liver, and kidneys in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups returned to near-normal levels, comparable to the control group. The presence of hepatic cells, hepatic sinuses, portal triads, and central veins (Fig. 4Ae and 5Be, respectively) appeared normal compared to the control (Fig. 4Ad and 4Bd). In the renal histopathological study, the structure of the renal corpuscles, renal tubules, and Bowman's capsules in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups (Fig. 4Ai and 4Bi) did not differ from the control group (Fig. 4Ag and 4Bg).

The myocardial tissue in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups (Fig. 4Ac and 4Bc) also exhibited intact structures with nuclei and myocardium, comparable to the myocardial tissue structure of the control group (Fig. 4Aa and 4Ba). Importantly, there was no longer evidence of lymphocyte infiltration in the tissues of these organs. The results indicate that following the use of the extract, the tissue structure of the heart, liver, and kidneys has largely returned to a normal state, comparable to that of the control group. This suggests that the extract may not induce significant alterations in the tissue structure of these organs and may not exert significant adverse effects on them.

Urinalysis

In the present study, Table 9 illustrates the changes in urinary parameters observed in mice treated with different doses of EEAS compared to the control group ($p < 0.05$). Protein, glucose, and occult blood (red and white blood cells) were not detected in the urine of the experimental animals. However, specific gravity, pH, and ketone levels in the urine of mice treated with EEAS differed significantly from the control group ($p < 0.05$)

on days 14 and 90 of the two corresponding toxicity models. Nevertheless, in the EEAS5000 and EEAS500 satellite groups (groups monitored for an additional 28 days after drug administration), there was a significant decrease in specific gravity, pH, and ketone levels in the urine, with results nearly equivalent to the control satellite group ($p > 0.05$).

Long-term exposure to xenobiotics can have detrimental effects on various systems and organs in the body, including the nervous, endocrine, cardiovascular, and musculoskeletal systems, as well as organs such as the lungs, liver, and kidneys. Consequently, the liver and kidneys serve as the primary detoxification organs in the body. The process of xenobiotic detoxification in the body is intricate, with toxins being metabolized and eliminated through processes such as hydrolysis, oxidation-reduction, and detoxification, ultimately excreted via urine [30]. In the current study, significant increases in urinary specific gravity, pH, and ketone levels were observed in mice following the administration of the extract compared to the control group. Specific gravity serves as a measure of urine concentration, and the elevation may indicate dehydration or the presence of solutes increasing urine density, such as dissolved substances from the extract. The rise in pH is indicative of metabolic changes induced by the extract or its components. Additionally, the increased ketone concentration suggests enhanced fat metabolism or ketosis, possibly due to the metabolic influence of the extract on the body. These alterations collectively reflect changes in urinary composition and metabolic processes following extract administration [25]. In the satellite groups, the urinary-specific gravity, pH, and ketone concentrations have returned to baseline levels. This normalization could be attributed to the cessation of extract administration, allowing the body to restore normal metabolic processes and urinary parameters. The restoration of these urinary parameters indicates that any effects induced by the extract on urine composition and metabolism may be reversible upon discontinuation of use.

Table 9

Effects of extract processing and administration on urinary parameters in mice

Acute toxicity test						
Parameters	Control group	EEAS1000 group	EEAS3000 group	EEAS5000 group	Satellite control group	Satellite EEAS5000 group
Specific gravity	1.018 ± 0.002 ^a	1.069 ± 0.002 ^b	1.119 ± 0.001 ^c	1.171 ± 0.002 ^d	1.019 ± 0.001 ^A	1.017 ± 0.001 ^A
pH	6.98 ± 0.01 ^a	7.33 ± 0.02 ^b	7.68 ± 0.04 ^c	7.99 ± 0.02 ^d	7.04 ± 0.03 ^A	7.07 ± 0.02 ^A
Ketone (mg/dL)	0.79 ± 0.03 ^a	0.83 ± 0.04 ^{ab}	0.89 ± 0.06 ^{bc}	0.91 ± 0.06 ^c	0.82 ± 0.04 ^A	0.81 ± 0.02 ^A
Glucose (mg/dL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Protein (mg/dL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Erythrocytes (cells/μL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Leukocytes (cells/μL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Sub-chronic toxicity test						
Parameters	Control group	EEAS100 group	EEAS300 group	EEAS500 group	Satellite control group	Satellite EEAS500 group
Specific gravity	1.021 ± 0.001 ^a	1.072 ± 0.002 ^b	1.123 ± 0.003 ^c	1.174 ± 0.003 ^d	1.019 ± 0.001 ^A	1.018 ± 0.001 ^A
pH	7.02 ± 0.04 ^a	7.37 ± 0.02 ^b	7.72 ± 0.05 ^c	7.98 ± 0.06 ^d	7.08 ± 0.03 ^A	7.05 ± 0.03 ^A
Ketone (mg/dL)	0.77 ± 0.03 ^a	0.81 ± 0.03 ^b	0.85 ± 0.02 ^c	0.89 ± 0.02 ^d	0.81 ± 0.03 ^A	0.79 ± 0.04 ^A
Glucose (mg/dL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Protein (mg/dL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Erythrocytes (cells/μL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL
Leukocytes (cells/μL)	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL	NIL

Note: Values are expressed as Mean±SD. The letters (a, b, c, and d) represent the difference between the control group vs the EEAS1000-5000 groups (acute toxicity test); and between the control group vs the EEAS100-500 groups (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$). The letters (A and B) represent the difference between the satellite control group vs the satellite EEAS5000 (acute toxicity test); and between the satellite control group vs the satellite EEAS500 (sub-chronic toxicity test) ($p < 0.05$).

Conclusion. The study investigated the acute and sub-chronic toxicity of the ethanol extract of *A. sylvestris* leaves *in vivo*. The findings revealed acute toxicity symptoms, including elevated respiration rates, sedative effects, and seizures, which gradually diminished over time. Additionally, the extract affected body weight gain, food and water intake, hematological and biochemical parameters, relative organ weights, macroscopic and histopathological changes, and urinary parameters. However, these effects

were temporary and reversible after discontinuation of the extract, suggesting potential safety concerns but also indicating the possibility of manageable toxicity levels with proper monitoring and management.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Saggarr S, Mir PA, Kumar N, et al. Traditional and herbal medicines: Opportunities and challenges. *Pharmacognosy Research*. 2022;14(2):107-114. DOI: <https://doi.org/10.5530/pres.14.2.15>
2. Nouioura G, Tourabi M, Tahraoui A, et al. Assessment of the acute and subacute toxicity of the aqueous extract of Moroccan *Ferula communis* fruit in a mouse model. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(8):101701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101701>
3. Li Y, Zhuang Y, Tian W, et al. *In vivo* acute and subacute toxicities of phenolic extract from rambutan (*Nephelium lappaceum*) peels by oral administration. *Food Chemistry*. 2020;320:126618. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126618>
4. Benrahou K, Mrabti HN, Assaggaf HM, et al. Acute and subacute toxicity studies of *Erodium guttatum* extracts by oral administration in rodents. *Toxins*. 2022;14(11):735. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14110735>
5. Liu B, Liu R, Liu Q, et al. The ethnomedicinal and functional uses, phytochemical and pharmacology of compounds from *Ardisia* species: An updated review. *Medicinal Research Reviews*. 2022;42(5):1888-1929. DOI: <https://doi.org/10.1002/med.21894>
6. Blin JA, Hamid RA, Khaza H. Bioactive fractions and compounds of *Ardisia crispa* roots exhibit anti-arthritis properties mediated via angiogenesis inhibition *in vitro*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21:176. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03341-y>
7. He C, Hao E, Du C, et al. Investigating the underlying mechanisms of *Ardisia japonica* extract's anti-blood-stasis effect via metabolomics and network pharmacology. *Molecules*. 2023;28(11):7301. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28217301>
8. Huang L, You L, Aziz N, et al. Antiphotaging and skin-protective activities of *Ardisia silvestris* ethanol extract in human keratinocytes. *Plants*. 2023;12(5):1167. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12051167>
9. Tran TPN, Nguyen TT, Tran GB. Anti-arthritis effect of ethanol extract of *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) leaves against complete Freund's adjuvant-induced arthritis model in mice. *Tropical Life Sciences Research*. 2023;34(3):237-257. DOI: <https://doi.org/10.21315/tlsr2023.34.3.13>
10. Nhung TTP, Quoc LPT. Investigation of the inflammatory, antipyretic, and analgesic potential of ethanol extract from *Hedyotis capitellata* Wall. ex G. Don leaves in mice. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2023;7(11):5501-5508. DOI: <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i12.20>
11. Petkov CI, Flecknell P, Murphy K, et al. Unified ethical principles and an animal research 'Helsinki' declaration as foundations for international collaboration. *Current Research in Neurobiology*. 2022;3:100060. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2022.100060>
12. OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing; 2022. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>
13. Mlozi SH, Mmongoyo JA, Chacha M. The *in vivo* toxicity evaluation of leaf and root methanolic extracts of *Tephrosia vogelii* Hook. f using animal models. *Clinical Phytoscience*. 2020;6:73. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00216-6>
14. OECD. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing; 2018. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070707-en>
15. Burn CC, Mazlan NHB, Chancellor N, et al. The pen is milder than the blade: identification marking mice using ink on the tail appears more humane than ear-punching even with local anaesthetic. *Animals*. 2021;11(6):1664. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11061664>
16. Mpofana N, Chipangura JK, Paulse M, et al. An investigation into the acute and subacute toxicity of extracts of *Cassipourea flanaganii* stem bark *in vivo*. *Plants*. 2023;12(12):2281. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12122281>
17. Nhung TTP, Quoc LPT. Assessment of the acute and chronic toxicity studies of ethanol extract of *Blumea balsamifera* (L.) DC. leaves on murine models. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2024;8(2):6224-6233. DOI: <http://doi.org/10.26538/tjnpr/v8i2.20>
18. Nhung TTP, Quoc LPT. Counteracting paracetamol-induced hepatotoxicity with black shallot extract: an animal model investigation. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2024;8(1):5875-5880. DOI: <http://doi.org/10.26538/tjnpr/v8i1.24>
19. Nhung TTP, Quoc LPT. Acute and sub-chronic toxicity studies of the ethanol extract of

Erythrina fusca Lour. fruit via oral administration in mice. *Acta Biologica Szegediensis*. 2023;67(1):111-122. DOI:

<https://doi.org/10.14232/abs.2023.1.111-122>

20. Phung HVC, Huynh VB, Truong TQ, et al. Phytochemical analysis of *Ardisia silvestris* leaf extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Agriculture and Development*. 2020;19(4):28-35. DOI:

<https://doi.org/10.52997/jad.4.04.2020>

21. Afzal I, Habiba U, Yasmeen H. Review on therapeutic potential of phytochemicals from medicinal plants. *Journal of Bioresource Management*, 2023;10(4):62-75.

22. Rodríguez-Negrete EV, Morales-González A, Madrigal-Santillán EO, et al. Phytochemicals and their usefulness in the maintenance of health. *Plants*. 2024;13(4):523. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13040523>

23. Vani AT, Putri AR, Abdullah DA, et al. In vivo acute toxicity of aloin extract on male white mice (*Mus musculus*). *Majority Science Journal*. 2024;2(1):200-207. DOI:

<https://doi.org/10.61942/msj.v2i1.101>

24. Saleem U, Amin S, Ahmad B, et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicology Reports*. 2017;4:580-585. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.10.005>

25. Murwanti R, Nurrochmad A, Gani AP, et al. Acute and subchronic oral toxicity evaluation of herbal formulation: *Piper crocatum* Ruiz and Pav., *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume, and *Phyllanthus niruri* L. in Sprague–Dawley rats. *Journal of Toxicology*. 2023;2023:7511397. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/7511397>

26. Devi TB, Jena S, Patra B, et al. Acute and sub-chronic toxicity evaluation of dihydro-p-coumaric acid isolated from leaves of *Tithonia diversifolia* Hemsl. A. Gray in BALB/c mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1055765.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1055765>

27. Abdill AA, Kitimu SR, Ndubi MM, et al. Sub-chronic and sub-chronic toxicity assessment of the antimicrobial peptide Dermaseptin B2 on biochemical, hematological, and histopathological parameters in BALB/c mice and Albino Wistar rats. *Heliyon*. 2022;8(12):12124. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12124>

28. Mačianskienė R, Zigmantaitė V, Andriulė I, et al. Acute and sub-chronic intraperitoneal toxicity studies of the *Elsholtzia ciliata* herbal extract in Balb/c mice. *Pharmaceutics*. 2023;15(10):2417. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102417>

29. Liu J, Yao Y, Cheng Y, et al. Acute oral toxicity evaluation of almond hull powders in balb/c mice. *Foods*. 2023;12(22):4111. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12224111>

30. Godínez-Palma S, González-González E, Ramírez-Villedas F, et al. Efficacy, pharmacokinetics, and toxicity profiles of a broad anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody. *Viruses*. 2023;15(8):1733. DOI:

<https://doi.org/10.3390/v15081733>

Received 2 May 2024

Revised 28 May 2024

Accepted 10 June 2024

Information about the authors

Tran T.P. Nhung, MSc, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5733-8545>.

Le P.T. Quoc, PhD, Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam, E-mail: lephamtanquoc@iuh.edu.vn, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2309-5423>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-6

УДК 615

Development of Novel Antimicrobial Peptides Targeting Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Ali H. Salama 

Hashemite University,
Damascus Hwy., Zarqa, 13133, Jordan
Corresponding author: Ali H. Salama (ali.hasan@hu.edu.jo)

Abstract

Background: Antibiotic resistance is a global health threat, especially with pathogens like *Pseudomonas aeruginosa*, which displays high resistance to many antibiotics. Innovative solutions, such as antimicrobial peptides (AMPs), are being explored to combat these multidrug-resistant organisms. **The aim of the study:** This study aimed to design and synthesize an antimicrobial peptide (AMP) effective against both antibiotic-resistant and susceptible strains of *P. aeruginosa*, while ensuring safety for human cells. **Materials and methods:** A novel antimicrobial peptide, WW-185, was designed based on the structure-function relationship of existing AMPs. Its antimicrobial activity was evaluated through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assays against standard and multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains. Hemolytic activity was tested to assess safety for human erythrocytes, and time-kill assays were performed to study the peptide's bactericidal action. **Results:** WW-185 demonstrated potent antimicrobial activity, with MIC and MBC values comparable to conventional antibiotics. It showed low hemolytic effects on human erythrocytes and exhibited rapid bactericidal action, killing bacteria within 15 minutes and maintaining efficacy for up to 24 hours. The peptide's activity was attributed to bacterial membrane disruption, facilitated by its structural features. **Conclusion:** WW-185 is a promising antimicrobial candidate, with potent efficacy against multidrug-resistant *P. aeruginosa* and low toxicity to human cells. Its potential to reduce rapid resistance development makes it a valuable option for treating antibiotic-resistant infections.

Keywords: bactericidal activity; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; membrane permeabilization; hemolytic activity; WW-185 peptide

For citation: Salama AH. Development of Novel Antimicrobial Peptides Targeting Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):675-683. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-6

Introduction. *Pseudomonas aeruginosa*, a widespread Gram-negative bacterium, has become a significant opportunistic pathogen, greatly affecting human health [1]. Known for its adaptability and robustness, *P. aeruginosa* is associated with a wide range of infections, from minor skin and soft tissue infections to

serious systemic conditions [2]. This bacterium is especially problematic in causing infections in people with weakened immune systems, such as those with cystic fibrosis, burn injuries, or those undergoing invasive medical treatments [3]. Its capability to form strong biofilms and develop resistance

mechanisms makes *P. aeruginosa* a major clinical challenge, often resulting in hard-to-treat persistent infections [4]. The growing issue of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* strains further complicates treatment, highlighting the critical need for new methods to fight this resilient pathogen [5]. The rising resistance of *P. aeruginosa* to standard antibiotics is a significant concern in healthcare settings [6]. The bacterium employs various resistance strategies, including efflux pumps, impermeable membranes, and beta-lactamase production, endowing it with an exceptional ability to resist many antimicrobial agents. This resistance not only makes treatment difficult but also stresses the importance of finding new ways to tackle *P. aeruginosa* infections [7]. Amidst growing antibiotic resistance, antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as a promising alternative for dealing with bacterial infections [8]. AMPs are naturally occurring molecules with strong antimicrobial properties, crucial to the innate immune system in different organisms [9]. They are effective against a range of bacteria, including Gram-negative pathogens like *P. aeruginosa*. AMPs typically attack bacterial membranes, disrupting cell integrity, and often bypassing usual resistance mechanisms. This distinct action mode positions AMPs as a solution for multidrug-resistant bacteria challenges [10]. The need to investigate AMPs as a potential treatment against *P. aeruginosa* is highlighted by their ability to counteract resistance mechanisms. By attacking bacterial membranes and disrupting vital cellular functions, AMPs could be a strategy against strains resistant to conventional antibiotics [11]. Additionally, the variety of AMPs found in nature offers a vast pool for discovering new compounds specifically effective against *P. aeruginosa* [12].

The aim of the study. To create new antimicrobial peptides designed to specifically target *P. aeruginosa*, with a particular emphasis on strains that demonstrate resistance to conventional antibiotics. The objective is to evaluate the effectiveness of these peptides against both antibiotic-resistant

and susceptible strains of *P. aeruginosa*. This study not only enhances our comprehension of antimicrobial peptide actions against *P. aeruginosa* but also offers potential for the development of novel therapeutic approaches to tackle the urgent problem of antibiotic resistance in clinical environments.

Materials and method

Peptide design and synthesis

The peptide, named WW-158, is a tri-antimicrobial peptide consisting of two tryptophan and one ornithine amino acid units. For this study, the peptide was sourced from GL Biochem Ltd., Shanghai, China, and synthesized using the solid-phase technique in a lyophilized form. Its purification was carried out through reverse-phase high-performance liquid chromatography using a C18 Internsil® column (Thermo Fisher, USA) and an ODS-SP column. The elution process involved an acetonitrile/H₂O-TFA gradient at a flow rate of 1.0 mL/min. The purity and identity of the synthesized peptide were verified using electrospray ionization-mass spectrometry [13]. The design strategy aimed to endow the peptide with low cationicity by incorporating the two aforementioned positively charged amino acids [14], facilitating its attachment to the negatively charged bacterial cell membranes via electrostatic interaction. Furthermore, to enhance its ability to permeate the target membranes, the peptide was conjugated with ferulic acid, a highly hydrophobic compound. This molecule is presumed to function as a binding agent, fostering hydrophobic interactions between the peptide and the membrane.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) for WW-158

The process for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of WW-158 was carried out following the microbroth dilution method as prescribed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [15], using sterile 96-well polypropylene microtiter plates. Muller-Hinton broth (MHB) was used as the growth

medium to cultivate various bacterial strains, which were initially revived from a frozen glycerol state.

The bacterial cells were grown overnight in MHB and then diluted to a density of 10^6 CFU/mL in the same broth. Various concentrations of WW-158 were prepared, and in separate wells of the 96-well microtiter plates, 50 μ L of each peptide concentration was mixed with 50 μ L of the bacterial suspension. Each plate had six replicas of every peptide concentration spread over six wells. After an 18-hour incubation at 37 °C, bacterial growth was measured by assessing the optical density (OD) at $\lambda = 570$ nm using an ELISA plate reader (Biotech USA). The MIC was identified as the lowest peptide concentration that inhibited bacterial growth. Each plate included a positive control (50 μ L of bacterial suspension plus 50 μ L MHB without antimicrobial agents) and a negative control (100 μ L MHB) to verify bacterial growth and medium sterility, respectively. For MBC determination, 10 μ L samples from the clear wells showing no growth and the turbid wells from the positive control were streaked onto sterile, labeled nutrient agar plates. After 24 hours of incubation at 37 °C, the MBC was determined as the lowest concentration at which <0.1% of the original inoculum survived, indicating 99.9% bacterial eradication. All tests were performed in triplicate to ensure result accuracy.

Hemolytic activity of WW-185

The evaluation of WW-185's potential to cause membrane damage in normal erythrocytes was carried out using well-established erythrocyte hemolytic tests, as referenced in previous studies [16]. To guarantee the robustness and reliability of the findings, each test was conducted in triplicate. The formula used to analyze hemolysis is:

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

where A: is OD 450 with the peptide solution,
A₀: is OD 450 of the blank.

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

MTT Cell Proliferation Assay

The MTT Cell Proliferation Assay was employed in this study using the mammalian Vero cell line obtained commercially from ATCC (ATCC CCL81). Yellow tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT was utilized, which, when reduced to purple formazan by reductase enzymes inside metabolically active cells, allowed for the generation of insoluble purple crystals. These crystals were subsequently dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and their color was measured spectrophotometrically at a wavelength of 550 nm. For the assay, cells were initially seeded at a density of 5×10^3 cells per well in a flat-bottomed 96-well plate, followed by an incubation period of 18-24 hours at 37°C with 5% CO₂ to facilitate cell attachment. Subsequently, different concentrations of two peptides and their combination were suspended in RPMI as the dissolving media and added to the cells in the plates at concentrations of 2, 4, 6, 8, and 10 mg/mL for the peptides and 200, 400, 600, 800, and 1000 μ g/mL, respectively. An untreated medium was used as a control. The plates were then incubated for an additional 24 hours at 37°C with 5% CO₂. After the 24-hour incubation, 20 μ L of MTT solution (2.5 mg/mL) was added to each well, and the plates were further incubated for 2-5 hours at 37°C with 5% CO₂. Following this incubation, the well contents were removed, ensuring complete removal of all solution. Subsequently, each well received 100 μ L of DMSO, which was thoroughly mixed by pipetting to dissolve the formazan crystals until a clear purple color was obtained. The plates were then placed on an absorbance microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA), and the absorbance at 550 nm was measured [17].

Time killing curve

For bacteria, this test has been well standardized and described in M26-A document of CLSI . It is performed in broth culture medium using three tubes containing a bacterial suspension of 5×10^5 CFU/mL. The first and the second tubes contain the molecule or the extract tested usually at final

concentrations of $0.25 \times \text{MIC}$ and $1 \times \text{MIC}$, and the third one is considered as the growth control. The incubation is done under suitable conditions for varied time intervals (0, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h). Then, the percentage of dead cells is calculated relative to the growth control by determining the number of living cells (CFU/mL) of each tube using the agar plate count method. Generally, the bactericidal effect is obtained with a lethality percentage of 90% for 6 h, which is equivalent to 99.9% of lethality for 24 h [18].

Results

Peptide Design and synthesis

The peptide design involved the creation of an enhanced tri-antimicrobial peptide (tri-AMPs) composed of two subunits of tryptophan and one subunit of ornithine amino acids. Ornithine was chosen to confer a positive charge to the peptide. Its uniqueness as an unnatural and non-coded amino acid provides excellent stability against proteases. Tryptophan, selected for its hydrophobic

properties and membrane interface interaction, demonstrated a strong preference compared to other hydrophobic amino acids. To further enhance the hydrophobic characteristics of the peptide and exploit its potential antimicrobial activity, it was conjugated to para-hydroxy cinnamic acid

(PHCA). This addition aimed to increase the overall hydrophobicity of the peptide. Notably, PHCA itself possesses inherent antimicrobial properties, thereby contributing to the anticipated enhancement of the peptide's activity. The resulting designed peptide structure was illustrated in Figure 1, showcasing the integration of ornithine, tryptophan, and the conjugated PHCA subunits. This novel peptide design aimed to capitalize on the synergistic effects of its components, combining the stability provided by ornithine, the membrane-interacting properties of tryptophan, and the additional antimicrobial activity conferred by PHCA.

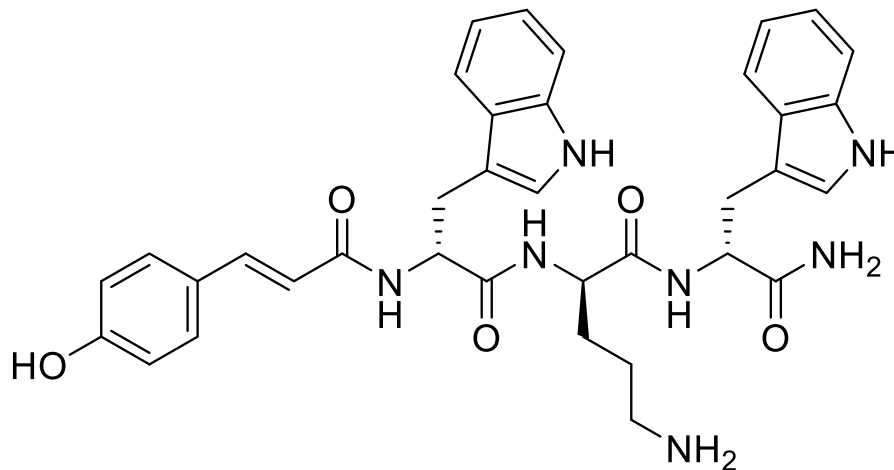


Fig. 1. Structure of WW-158 peptide

Antimicrobial activity of the peptide

As shown in (Table 1), WW-185 displayed good activity against the standard strain *Ps. aeruginosa* (ATCC 9027) with an MIC of $6 \mu\text{g/mL}$ and MIC of $25 \mu\text{g/mL}$ against MDR *Ps. aeruginosa* (ATCC BAA-2108). The MBC

values were the same as MIC values against the two bacterial types.

Hemolytic activity of the peptides:

The percentage of the red blood cells hemolysis of the peptides alone is shown in Table 2.

Table 1

MIC and MBC values of WW-185 against the bacterial strains employed in the study

Bacteria strains	ATCC	WW-185	
		MIC value (µg/mL)	MBC value (µg/mL)
Standard <i>Ps. aeruginosa</i>	9027	6	6
MDR <i>Ps. aeruginosa</i>	BAA-2108	25	25

Note: MDR; multidrug **resistance**

Table 2

Hemolytic activity of WW-185 against human erythrocytes after 60 minutes' incubation

Concentration (µM)	Hemolysis %
5	1
10	1
20	1
40	2
60	2
80	2
100	2

Note: The results were recorded at $\lambda = 450$ nm.

MTT Cell Proliferation

The results of the cytotoxicity assay

revealed that the conjugate has an IC₅₀ value of 130 for WW-185 (Fig. 2).

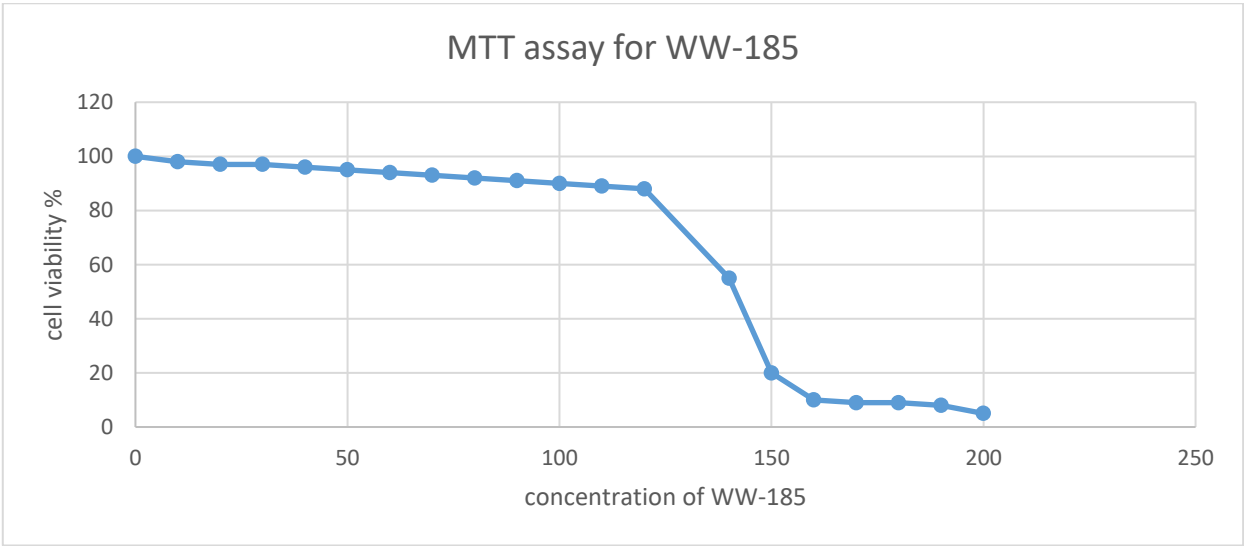


Fig. 2. MTT assay for WW-185

Time kill curve

Results in Figure 3 WW-185 exhibited

(no comma) bactericidal effect, reducing the starting log CFU/mL by 3 logs.

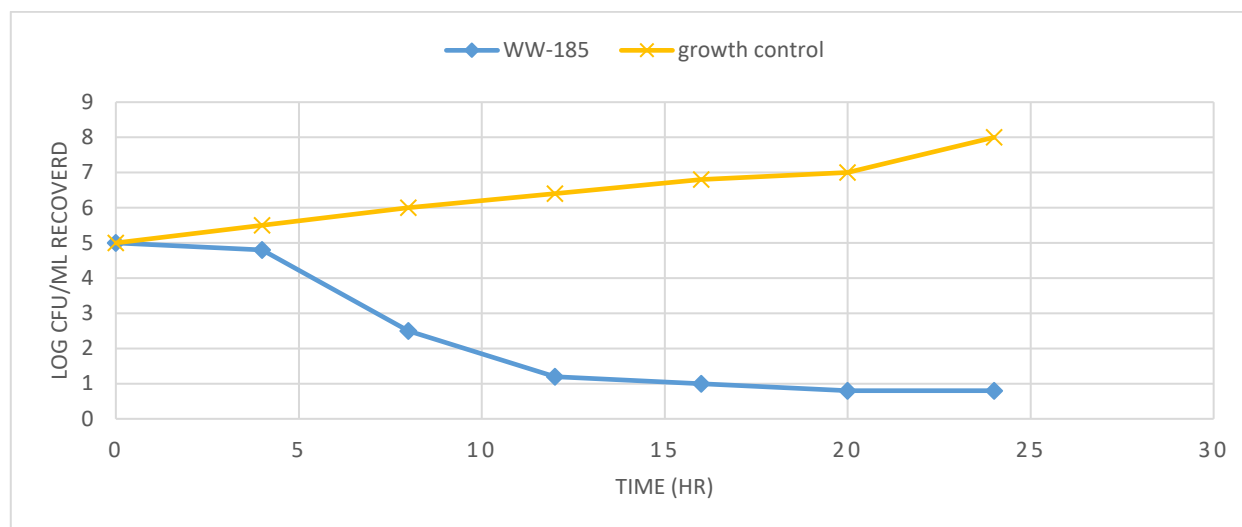


Fig. 3. The time killing curve for WW-185

Determination of the MIC and MBC of the Individual Antibiotics

The eight different antibiotics employed in this study were challenged with control and multidrug-resistant strains of Gram-positive

and Gram-negative bacteria to determine the antimicrobial activity of each antibiotic against the employed bacterial strains. All the reported data of MIC and MBC values of antibiotics are summarized in Table 3.

Table 3

The minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of the nine antibiotics against the tested bacterial strains

Antibiotics	Standard <i>Ps. aeruginosa</i>	MDR <i>Ps. aeruginosa</i>
	MIC (MBC) ($\mu\text{g/mL}$)	MIC (MBC) ($\mu\text{g/mL}$)
Levofloxacin	9 (9)	30 (30)
Chloramphenicol	80 (105)	150 (220)
Rifampicin	15 (15)	50 (50)
Amoxicillin	25 (25)	200 (200)
Clarithromycin	125 (125)	125 (125)
Doxycycline	6 (25)	34 (45)
Vancomycin	200 (350)	260 (400)
Cefixime	6 (10)	82 (110)
Gentamicin	2 (2)	20 (20)

Discussion. Antibiotic resistance has evolved into a worldwide health crisis, demanding innovative strategies to counteract multidrug-resistant pathogens [19, 20]. *Pseudomonas aeruginosa*, a well-known opportunistic pathogen, presents a formidable challenge due to its inherent resistance to numerous antibiotics. In response to this challenge, newly synthesized antimicrobial peptides were developed and specifically tailored to target *P. aeruginosa*, particularly strains exhibiting resistance to conventional antibiotics. Antimicrobial peptides hold promise due to their broad-spectrum activity

and their potential to overcome resistance mechanisms [21].

However, drug development for such peptides has been primarily constrained by safety concerns [22]. This study introduces an approach to peptide design and synthesis, drawing on insights from the structure-function relationship of established AMPs [23]. The effectiveness of these peptides against both antibiotic-resistant and susceptible strains of *P. aeruginosa* was evaluated in the study. The research revealed that the newly designed peptide, WW-185, exhibits antimicrobial effectiveness similar to

conventional antibiotics while having a low hemolytic effect on normal erythrocytes. Both the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of WW-185 were on a par with antibiotics from various chemical classes against both standard and multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas* strains. The identical values of MIC and MBC indicate the bactericidal nature of WW-185. Its microbicidal action primarily stems from the permeabilization of the bacterial cell membrane [24]. The ability of WW-185 to penetrate membranes is likely due to its structure, which features a charge segregation from the hydrophobic center [25]. Consequently, the peptide operates through a unique bacterial membrane disruption mechanism that may be less prone to triggering rapid resistance, suggesting a potentially extended therapeutic application. The study also demonstrated that WW-185, in concentrations up to 100 µg/ml, does not cause hemolysis in human erythrocytes, indicating its selectivity for bacterial over host membranes. This finding is consistent with previous research on the peptide 6K-F17, which has shown remarkable bacterial selectivity and non-hemolytic properties towards human erythrocytes at concentrations exceeding 500 µg/ml, as reported by Beaudoin et al. (2008) [26]. This specificity may arise because, upon electrostatic attraction to the anionic surface of a bacterial membrane, WW-185's effective hydrophobicity surpasses the threshold for spontaneous membrane penetration. However, in the absence of such attraction, its hydrophobicity remains below the threshold for penetrating mammalian cell membranes, which are zwitterionic. Moreover, the MICs of WW-185 against both standard and MDR *P. aeruginosa* strains are comparable to those of conventional antibiotics; in some cases, WW-185's MICs are equal to or lower than those of other antibiotics.

The time-kill curve analysis revealed that the bactericidal effect of the peptide was rapid and sustained, exhibiting significant activity against both tested strains in under 15 minutes and maintaining this effect for up to

24 hours. These characteristics are highly sought after in an antimicrobial agent. The peptide's killing action was observed to be time-dependent, aligning with the kinetics of soluble peptides noted in previous research [27]. The mechanism of action for this peptide involves disrupting the cytoplasmic membrane, leading initially to the leakage of small ions and subsequently to the release of larger cellular molecules as the membrane disruption becomes more pronounced [28]. The efficacy of WW-185 against multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* is particularly noteworthy. This effectiveness offers fresh perspectives in the battle against MDR strains, underscoring the potential of WW-185 as a valuable tool in antimicrobial therapy.

Conclusion. The creation of novel antimicrobial peptides designed to combat antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa* represents a crucial advancement in tackling the global challenge of antibiotic resistance. This research not only contributes to the comprehension of antimicrobial peptide mechanisms but also holds significant promise for the development of innovative treatment approaches in the ongoing fight against multidrug-resistant bacteria. The potential efficacy of the synthesized peptides may pave the way for groundbreaking treatment modalities in clinical settings, addressing the critical issue of antibiotic resistance.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The author has no conflict of interest to declare.

References

1. Lyu Z, Yang P, Lei J, et al. Biological function of antimicrobial peptides on suppressing pathogens and improving host immunity. *Antibiotics*. 2023;12(6):1037. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061037>
2. King AM, Zhang Z, Glassey E, et al. Systematic mining of the human microbiome identifies antimicrobial peptides with diverse

activity spectra. *Nature Microbiology*. 2023;8(12):2420-2434. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01524-6>

3. Chen N, Jiang C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023;255:115377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115377>

4. Chen X, Su S, Yan Y, et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of natural antimicrobial peptides when used alone or in combination with antibiotics. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1239540. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1239540>

5. Juárez-López D, Morales-Ruiz E, Herrera-Zúñiga LD, et al. The resilience of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics and the designing of antimicrobial peptides to overcome microbial resistance. *Current Medicinal Chemistry*. 2023;30(1):72-103. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867329666220907100505>

6. Klimovich A, Bosch TCG. Novel technologies uncover novel ‘anti’-microbial peptides in hydra shaping the species-specific microbiome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2024;379(1901):58. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0058>

7. Zhang W, An Z, Bai Y, et al. A novel antimicrobial peptide Scyreptin1-30 from *Scylla paramamosain* exhibiting potential therapy of *Pseudomonas aeruginosa* early infection in a mouse burn wound model. *Biochemical Pharmacology*. 2023;218:115917. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115917>

8. Mildenberger V, Alpízar-Pedraza D, Martell-Huguet EM, et al. The Designed Pore-Forming Antimicrobial Peptide C14R Combines Excellent Activity against the Major Opportunistic Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* with Low Cytotoxicity. *Pharmaceuticals*. 2024;17(1):83. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph17010083>

9. Jing R, Zhang L, Li R, et al. Milk-derived extracellular vesicles functionalized with anti-tumour necrosis factor- α nanobody and antimicrobial peptide alleviate ulcerative colitis in mice. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2024;13(6):e12462. DOI: <https://doi.org/10.1002/jev2.12462>

10. Hyun JE, Hwang CY. Antimicrobial Peptide Reduces Cytotoxicity and Inflammation in Canine Epidermal Keratinocyte Progenitor Cells

Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Veterinary Sciences*. 2024;11(6):235. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci11060235>

11. Ji S, An F, Zhang T, et al. Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2024;265:116072. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116072>

12. Jordan O, Gan BH, Alwan S, et al. Highly Potent Cationic Chitosan Derivatives Coupled to Antimicrobial Peptide Dendrimers to Combat *Pseudomonas aeruginosa*. *Advanced Healthcare Materials*. 2024;13(19):2304118. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202304118>

13. Murphy RA, Pizzato J, Cuthbertson L, et al. Antimicrobial peptide glatiramer acetate targets *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides to breach membranes without altering lipopolysaccharide modification. *npj Antimicrobials and Resistance*. 2024;2(1):4. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00022-x>

14. He S, Deber CM. Interaction of designed cationic antimicrobial peptides with the outer membrane of gram-negative bacteria. *Scientific Reports*. 2024;14(1):1894. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51716-1>

15. Roque-Borda CA, Primo LMDG, Franzyk H, et al. Recent advances in the development of antimicrobial peptides against ESKAPE pathogens. *Heliyon*. 2024;10(11):e31958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31958>

16. Wan X, Wang W, Zhu J, et al. Antibacterial peptide Reg4 ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Microbiology Spectrum*. 2024;12(5):e03905-23. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03905-23>

17. Büyükkiraz ME, Kesmen Z. Antimicrobial peptides (AMPS): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 2022;132(3):1573-1596. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15314>

18. Li Z, Qu W, Zhang D, et al. The antimicrobial peptide chensinin-1b alleviates the inflammatory response by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway and inhibits *Pseudomonas aeruginosa* infection and LPS-mediated sepsis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023;165:115227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115227>

19. Talapko J, Meštrović T, Juzbašić M, et al. Antimicrobial peptides—mechanisms of action, antimicrobial effects and clinical applications.

Antibiotics. 2022;11(10):1417. DOI:
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11101417>

20. Bucataru C, Ciobanasiu C. Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. Microbiological Research. 2024;286:127822. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127822>

21. Li G, Lai Z, Shan A. Advances of antimicrobial peptide-based biomaterials for the treatment of bacterial infections. Advanced Science. 2023;10(11):2206602. DOI:
<https://doi.org/10.1002/advs.202206602>

22. Cresti L, Cappello G, Pini A. Antimicrobial peptides towards clinical application—a long history to be concluded. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(9):4870. DOI:
<https://doi.org/10.3390/ijms25094870>

23. Fahmy L, Ali YM, Seilly D, et al. An attacin antimicrobial peptide, Hill_BB_C10074, from *Hermetia illucens* with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. BMC Microbiology. 2023;23(1):378. DOI:
<https://doi.org/10.1186/s12866-023-03131-1>

24. Wood S J, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: infections, animal modeling, and therapeutics. Cells. 2023;12(1):199. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12010199>

25. Maasch JRMA, Torres MDT, Melo MCR, et al. Molecular De-Extinction of Ancient Antimicrobial Peptides Enabled by Machine Learning. 2022;11(15):516443. DOI:

<https://doi.org/10.1101/2022.11.15.516443>

26. Sathe N, Beech P, Croft L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. Infectious Medicine. 2023;2(3):178-194. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.imj.2023.05.003>

27. Sanya DRA, Onésime D, Vizzarro G, et al. Recent advances in therapeutic targets identification and development of treatment strategies towards *Pseudomonas aeruginosa* infections. BMC Microbiology. 2023;23(1):86. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02832-x>

28. Johnson K, Delaney JC, Guillard T, et al. Development of an antibody fused with an antimicrobial peptide targeting *Pseudomonas aeruginosa*: A new approach to prevent and treat bacterial infections. PLoS Pathogens. 2023;19(9):e1011612. DOI:
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011612>

Received 13 June 2024

Revised 25 September 2024

Accepted 8 October 2024

Information about the author

Ali H. Salama, PhD, Lecturer at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hashemite University, Zarqa, Jordan, E-mail: ali.hasan@hu.edu.jo, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2141-5857>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-7

УДК: 616.892.32; 546.171.8

Экспериментальная модель болезни Альцгеймера, вызванная интрагиппокаммальным введением натрия азида. Сопоставимость с амилоидной моделью

Д.И. Поздняков 

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»,
пл. Павших борцов, д. 1, г. Волгоград, 400131, Российская Федерация
Автор для переписки: Д.И. Поздняков (pozdniackow.dmitry@yandex.ru)

Резюме

Актуальность: В настоящее время лечение болезни Альцгеймера является сложной медицинской задачей, требующей постоянного поиска и разработки новых средств для терапии данного состояния. В связи с чем встает вопрос выбора релевантной экспериментальной модели болезни Альцгеймера. **Цель исследования:** Провести сравнительную оценку двух интервенционных экспериментальных моделей болезни Альцгеймера: индуцированной введением фрагментов β -амилоида и индуцированной введением натрия азида. **Материалы и методы:** Болезнь Альцгеймера моделировали путем инъекции фрагментов β -амилоида 1-42 (1 ммоль/л) или растворов натрия азида (1М, 2М, 3М и 4М концентрации) в СА1 часть гиппокампа крыс самцов Wistar. По истечении 60 дней у животных оценивали изменение когнитивных функций в тесте Y-образный лабиринт. В ткани гиппокампа определяли изменение концентрации фосфорилированного тау-белка, апоптоз-индуцирующего фактора, реакций аэробного и анаэробного метаболизма, а также активности супероксиддисмутазы и концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программный комплекс StatPlus 7.0. **Результаты:** Проведенное исследование показало, что введение в гиппокамп животных натрия азида в концентрации 3М и 4М, а также фрагментов β -амилоида способствует развитию сопоставимого по выраженности когнитивного дефицита, повышению концентрации тау-белка в ткани гиппокампа в 4,1; 3,9 и 4,7 раза (все показатели $p < 0,05$ относительно нелеченых животных) соответственно. На фоне инъекции в гиппокамп крыс 3М и 4М растворов натрия азида, а также фрагментов β -амилоида наблюдалось повышение содержания апоптоз-индуцирующего фактора в 3,5 ($p < 0,05$); 3,4 ($p < 0,05$) и 4,0 раза ($p < 0,05$) соответственно, сопровождаемое угнетением аэробного метаболизма и активацией анаэробного, и окислительного стресса. Стоит отметить, что введение натрия азида в концентрации 1М и 2М приводило к статистически значимо меньшим изменениям, чем инъекция 3М и 4М растворов натрия азида, и фрагментов β -амилоида. **Заключение:** Анализируемые в ходе данной работы экспериментальные модели болезни Альцгеймера демонстрируют формирование сопоставимых патогенетических изменений, при этом

оптимальной концентрацией натрия азида для индуцирования болезни Альцгеймера можно считать 3М или 4М.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; β -амилоид; натрия азид; митохондриальная дисфункция; апоптоз

Для цитирования: Поздняков ДИ. Экспериментальная модель болезни Альцгеймера, вызванная интрагиппокампальным введением натрия азида. Сопоставимость с амилоидной моделью. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(4):684-698. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-7

Experimental model of Alzheimer's disease caused by intrahippocampal injection of sodium azide. Comparability with the amyloid model

Dmitry I. Pozdnyakov 

Volgograd State Medical University,

1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russia

Corresponding author: Dmitry I. Pozdnyakov (pozdniackow.dmitry@yandex.ru)

Abstract

Background: The treatment of Alzheimer's disease is currently a complex medical task, requiring constant research and development of new medicines. This raises the question of choosing a relevant experimental model of Alzheimer's disease. **The aim of the study:** To conduct a comparative evaluation of two interventional experimental models of Alzheimer's disease: induced by the injection of beta-amyloid fragments and induced by the sodium azide injection. **Materials and methods:** Alzheimer's disease was modeled by injection of beta-amyloid fragments 1-42 (1 mmol/L) or sodium azide solutions (1M, 2M, 3M and 4M concentrations) into the CA1 part of the hippocampus of male Wistar rats. After 60 days, the animals were evaluated for changes in cognitive functions in the Y-maze test. Changes in the concentration of phosphorylated tau-protein, apoptosis-inducing factor, aerobic and anaerobic metabolism reactions, superoxidedismutase activity and thiobarbituric acid reactive substances were determined in the hippocampal tissue. The obtained results statistically were processed using the StatPlus 7.0 software. **Results:** The study showed that the injection of sodium azide in concentrations of 3M and 4M into the hippocampus of animals, as well as fragments of β -amyloid, contributes to the development of cognitive deficits comparable in severity, increases the concentration of tau-protein in hippocampal tissue by 4.1, 3.9 and 4.7 times (all indicators $p < 0.05$ relative to untreated animals), respectively. Also, injection of 3M and 4M solutions of sodium azide into the hippocampus of rats, as well as fragments of β -amyloid, an increase in the content of apoptosis-inducing factor in 3.5 ($p < 0.05$); 3.4 ($p < 0.05$) and 4.0 times ($p < 0.05$), respectively, accompanied by inhibition of aerobic metabolism and activation of anaerobic one, and oxidative stress also. Injecting sodium azide at concentrations of 1M and 2M resulted in significantly smaller changes than injecting 3M and 4M solutions of sodium azide and beta-amyloid fragments. **Conclusion:** The experimental models of Alzheimer's disease analyzed in the course of this work demonstrate the formation of comparable pathogenetic changes, while the optimal concentration of sodium azide for inducing Alzheimer's disease can be considered 3M or 4M.

Keywords: Alzheimer's disease; β -amyloid; sodium azide; mitochondrial dysfunction; apoptosis

For citation: Pozdnyakov DI. Experimental model of Alzheimer's disease caused by intrahippocampal injection of sodium azide. Comparability with the amyloid model. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):684-698. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-7

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) – одна из самых распространенных форм деменции, входящая в топ 10 ведущих причин смертности. Согласно статистическим отчетам Всемирной организации здравоохранения БА занимает 7-е место антирейтинге летальности унося ежегодно около 1,8 млн. жизней [1]. В Российской Федерации по данным *Global Burden of Disease 2019* заболеваемость БА достигает 1,150 случая на 100 тыс. человек населения [2]. Неутешительными являются и прогностические выкладки по распространенности БА. Так только в США к 2060 году, если не будут разработаны новые методы лечения, предполагается увеличение новых случаев БА до более чем 13 млн. в год [1, 2]. Как правило, в области создания новых средств терапии БА и сосредоточены объединённые исследования специалистов экспериментальной и практической медицины. Однако, в силу комплексного патогенеза, не до конца установленной этиологии и высокой связи с нарушениями функционирования генетического аппарата разработка новых методов лечения БА является сложной задачей. В этой связи острой встает вопрос выбора релевантной экспериментальной модели БА, используемой на этапе доклинических исследований. *Dhapola et al, 2023* в зависимости от патофизиологических особенностей выделяют три группы моделей БА: спонтанные, интервенционные и генетические [3]. Спонтанные модели БА подразумевают использование в качестве биологической модели приматов – павианов и макаков, у которых отмечается спонтанное накопление в ткани мозга нейрофибриллярных клубков фосфорилированного тау-белка и конгломератов β -амилоида ($A\beta$)

соответственно, что является отличительным признаком патогенеза БА. Однако, данные модели имеют ряд недостатков, что ограничивает их широкое использование в рутинной экспериментальной деятельности: высокие затраты на содержание приматов, низкий репродуктивный потенциал, сложности с манипуляциями в ходе работы и риск заражения персонала зоонозными инфекциями. Трансгенные животные также являются важным исследовательским инструментом, применяемым при разработке новых средств для лечения БА. Использование методов генной инженерии позволило создать трансгенных мышей *p25*, воспроизводящих CDK- зависимый фенотип заболевания со склонностью к прогрессирующему нейровоспалению и накоплению тау-белка [4]. Несмотря на это трансгенные животные не находят столь обширного использования в экспериментальной работе в силу их высокой стоимости. В этой связи на первый план среди доклинических моделей БА выходят интервенционные модели, подразумевающие введение химических соединений, вызывающих состояние, схожее по фенотипу с БА. Одной из самых распространенных интервенционных моделей БА, воспроизводящей патогенез и симптоматику заболевания, в том числе спорадической формы, является экспериментальная модель, основанная на инъекции фрагментов $A\beta$ в гиппокамп животных [5]. Однако, и данная экспериментальная модель не лишена недостатков, самым значимым из которых является трудоемкость получения агрегатов $A\beta$ и их стоимость [6]. В тоже время учитывая особенности патогенеза БА, а именно зависимость накопления агрегатов $A\beta$ и тау-белка от уровня внутриклеточного АТФ и, соответственно,

функциональной активности митохондрий [7], можно предположить, что введение соединений, оказывающих негативное влияние на митохондрии клетки, будет способствовать формированию фенотипа БА. Одним из таких веществ может являться натрия азид – ингибитор цитохром-с-оксидазы, который оказывает выраженное цитотоксическое действие, индуцируя апоптоз, окислительный стресс, эксайтотоксичность и энергодефицит [8].

Цель исследования. Провести сравнительную оценку Аβ-индуцированной и натрий азид-индуцированной БА в эксперименте,

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на крысах самцах Wistar массой тела $215 \pm 10\%$ грамм, 7-недельного возраста. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» (д.Рапполово, Ленинградская обл.). Перед включением в эксперимент крысы 14 дней содержались в условиях карантинного помещения. Во время исследования животные размещались в полипропиленовых клетках по 5 особей со свободным доступом к воде и полнорационному корму. Условия содержания крыс соответствовали требованиям Директивы EU 2010/63 [9]. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ПМФИ от 15.05.2023 протокол № 5.

Животные были рандомизированы по массе (не более 10% отклонений по массе в группе) на 6 групп (n=10 каждая группа). Первая группа – ложноперированные животные (ЛО). Остальным экспериментальным группам моделировали БА, при этом выделялись группы: Аβ – группа крыс, которым вводили фрагменты Аβ; натрия азид 1М - группа крыс, которым вводили раствор натрия азид в концентрации 1М; натрия азид 2М - группа крыс, которым вводили раствор натрия азид в концентрации 2М; натрия азид 3М - группа крыс, которым вводили раствор натрия азид в концентрации 3М; натрия азид 4М - группа

крыс, которым вводили раствор натрия азид в концентрации 4М. Концентрации растворов натрия азид были выбраны на основании данных предыдущих исследований по изучению гипометаболических реакций в ткани головного мозга животных [10].

БА воспроизводили путем инъекции фрагментов Аβ или натрия азид в СА1 часть гиппокампа (передне-задняя = -3,8 мм, медиально-латеральная = 2,0 мм, дорсально-вентральная = 2,6 мм от брегмы. Стереотаксические координаты определены согласно G. Paxinos, 2013 [11].

Перед введением Аβ₁₋₄₂ (Sigma-Aldrich, Германия) растворяли при температуре 4⁰С в фосфатно-солевом буфере (pH =7,4). Далее раствор непрерывно перемешивании в течение 36ч при указанной температуре до образования агрегатов. Натрия азид растворяли в воде для инъекций до получения растворов с концентрацией 1М, 2М, 3М и 4М. После приготовления растворов для введения животных наркотизировали хлоралгидратом (интраперитонеально, 350 мг/кг), скальпировали теменную область, продельвали трепанационное отверстие (d=1 мм) и при помощи микро-дозатора с иглой G30 вводили либо фрагменты Аβ₁₋₄₂ в конечной концентрации 1 ммоль/л и в объеме 2 мкл [12], либо растворы натрия азид в эквивалентном объеме. Иглу фиксировали в месте введения в течении 5 минут, после чего ее извлекали. Рану ушивали и обрабатывали 10%-ным раствором повидон-йода. К животным ЛО группы применялись все последовательные процедуры за исключением введения Аβ или натрия азид. Крыс оставляли на 60 дней, после чего производили оценку когнитивного дефицита в тесте Y-образный лабиринт. Тестирование осуществляли на протяжении 8 мин.: животное помещали в центр лабиринта, представляющего собой три рукава, соединенных под углом 120⁰, и фиксировали число перемещений животных между рукавами (общее количество и спонтанные чередования рукавов лабиринта: 1-2-3, 3-1-2, 2-3-1). На

основании полученных данных определяли процент спонтанного чередования, который отражает изменение когнитивных способностей животных [12].

После оценки когнитивного дефицита крыс наркотизировали и декапитировали, извлекали головной мозг, отсекали мозжечок, разделяли полушария и выделяли гиппокамп. Гиппокамп животных гомогенизировали в буферном растворе, состоящем из 1 ммоль ЭГТА + 215 ммоль маннита + 75 ммоль сахарозы + 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина + 20 ммоль HEPES, с pH 7,2. Гомогенат разделяли на 2 части. В первой оценивали изменение концентрации продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП).

Содержание ТБК-АП определяли спектрофотометрическим методом в реакции конденсации с 2-тиобарбитуровой кислотой. В результате реакции образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 532 нм, окраска которого прямо пропорциональна концентрации ТБК-АП. Количество ТБК-АП рассчитывали по величине молярного коэффициента экстинкции малонового диальдегида ($1,56 \cdot 10^5$ лмоль⁻¹см⁻¹), полученные результаты выражали в нмоль/мг белка [13].

Вторую часть супернатанта центрифугировали при 1100g в течение 2-х минут. Полученный супернатант разделяли на две части. Первую аликвоту в количестве 700 мкл переносили в пробирки типа Эппендорф и наслаивали 75 мкл 10% раствора перколла (Sigma-Aldrich, Германия), после чего центрифугировали при 18000g в течении 10 минут. Осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующей среды и повторно центрифугировали в течение 5 минут при 10 000g. Полученный супернатант использовали для оценки изменения аэробных и анаэробных реакций обмена [14].

Интенсивность аэробного клеточного дыхания определяли по изменению потребления кислорода в анализируемой среде при добавлении 4 - (трифлюо-

рометокси)фенил)гидразоно)малононитрила в концентрации 1 мМ/л и пирувата в качестве субстрата (15 ммоль/л). Активность анаэробного обмена оценивали при внесении в среду олигомицина (1 мкг/мл) и глюкозы (15 ммоль/л) в качестве субстрата. Потребление кислорода (OCR) регистрировали на лабораторном респирометре АКПМ 1-01Л и выражали в промилле (ppm)/мг белка [15].

Во второй аликвоте первичного супернатанта оценивали изменение концентрации фосфорилированного таубелка и апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ) методом ИФА. При проведении ИФА использовали видоспецифичные наборы реактивов (Cloud clone, США). Также во второй аликвоте супернатанта оценивали активность супероксиддисмутазы (СОД).

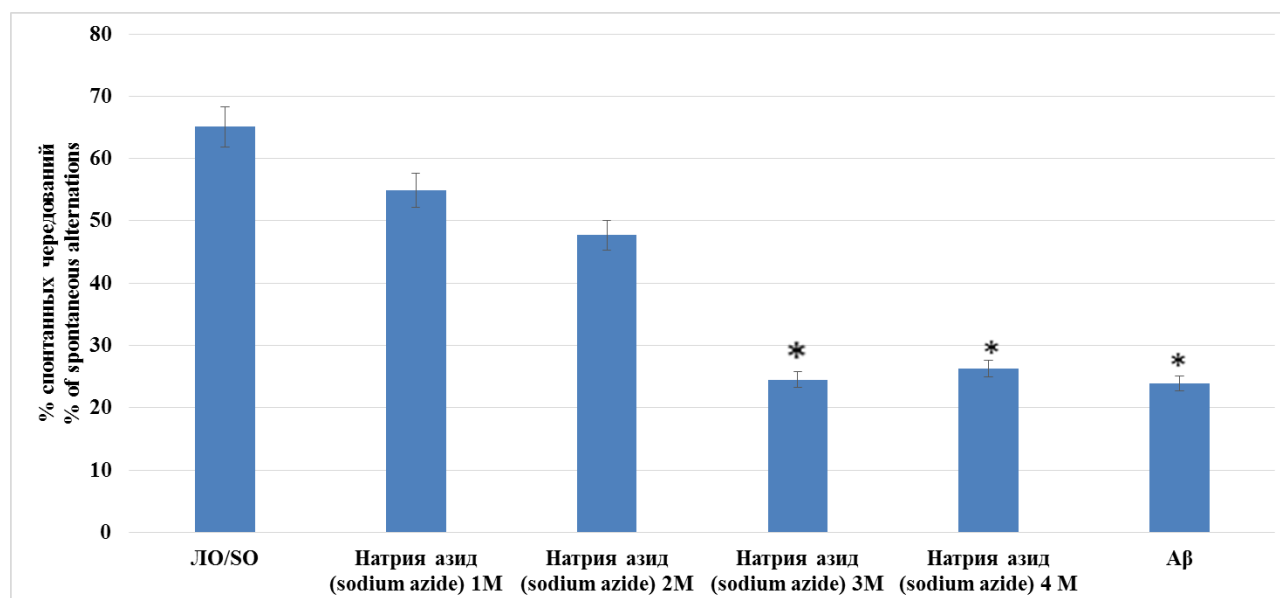
Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали ксантиноксантинооксидазным методом, основанным на реакции дисмутации супероксидного радикала, образующегося в ходе окисления ксантина и восстановления 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия хлорида. Среда инкубации содержала: ксантин 0,05 ммоль/л; 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия хлорид 0,025 ммоль/л; ЭДТА 0,94 ммоль/л, ксантинооксидаза 80 Ед/л, N -циклогексил-3-аминопропансульфоновой кислоты – 40 ммоль/л. Оптическую плотность смеси регистрировали при 505 нм. Активность СОД выражали в ЕД/мг белка [16]. Во всех случаях концентрацию белка определяли по методу Бредфорда.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением возможностей программного комплекса StatPlus 7.0 (AnalystSoft, США). Нормальность распределения данных оценивали с применением теста Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий определяли тестом Левена. Статистически значимые отличия между группами оценивали методом ANOVA. Сравнение с ЛО группой осуществляли в тесте Даннета.

Достоверные отличия между остальными группами определяли с применением пост-теста Ньюмена-Кейлса (при нормальном распределении данных) или пост-теста Краскелла-Уоллиса (при распределении данных отличных от нормального) с последующим парным сравнением в тесте Данна. Критический уровень значимости во всех случаях принимали $p < 0,05$.

Результаты. В ходе исследования было показано, что при интрагиппокампальном введении животным фрагментов Аβ наблюдалось снижение числа спонтанных чередований в Y-образном лабиринте на 63,3% ($p < 0,05$) по отношению к ЛО группе крыс (Рис. 1).

Аналогичная тенденция изменений была отмечена при введении животным 3М и 4М растворов натрия азида, а именно процент спонтанных чередований уменьшился в сравнении с ЛО группой крыс на 62,4% ($p < 0,05$) и 59,6% ($p < 0,05$) соответственно. В тоже время на фоне инъекции 1М и 2М растворов натрия азида достоверных отличий относительно ЛО группы крыс в поведении животных в Y-образном лабиринте не установлено. Стоит отметить, что статистических значимых отличий между группами животных, которым вводили 3М, 4М растворы натрия азида и фрагменты Аβ установлено не было.



Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; Аβ – группа крыс, которой вводили фрагменты Аβ; натрия азид – группа крыс, которой вводили натрия азид в разных концентрациях (1М, 2М, 3М и 4М соответственно); * – статистически значимо относительно ЛО крыс ($p < 0,05$, тест Даннета).

Note: SO – sham-operated animals; Аβ – a group of rats to which fragments of Аβ were injected; sodium azide – a group of rats to which sodium azide was injected at different concentrations (1M, 2M, 3M and 4M, respectively); * – significant relative to SO rats ($p < 0.05$, Dunnet test).

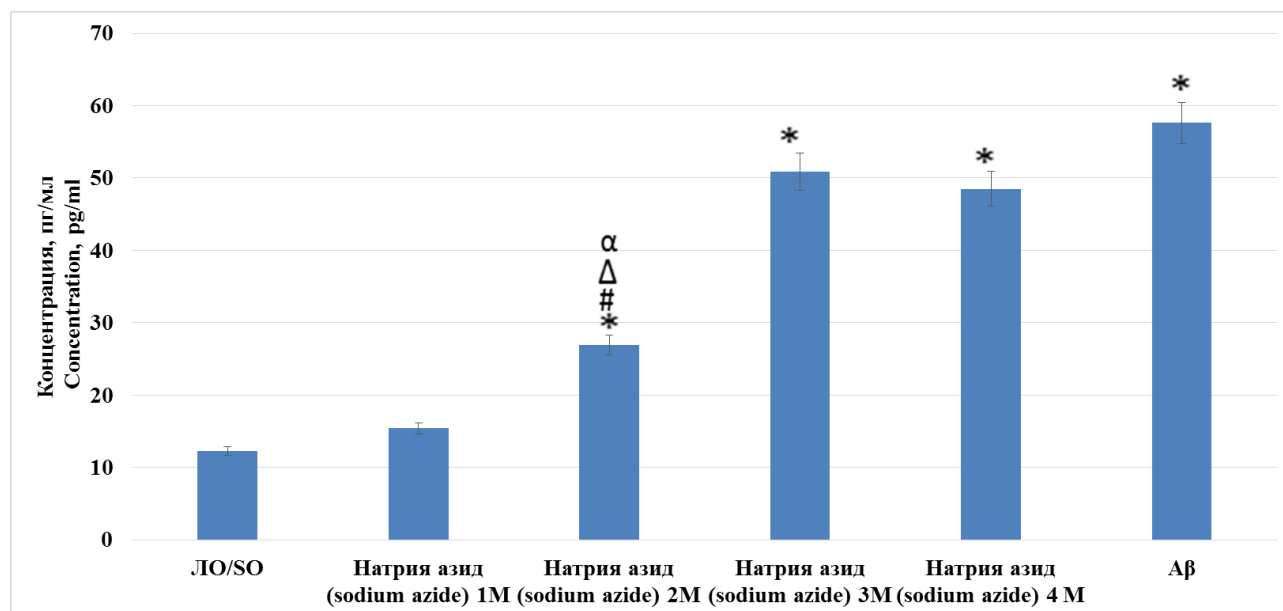
Рис. 1. Изменение поведенческих реакций животных в Y-образном лабиринте на фоне введения фрагментов Аβ и разных концентраций натрия азид в гиппокамп животных
Fig. 1. Changes in the behavioral reactions of animals in the Y- maze against the background of the injection of Аβ fragments and different concentrations of sodium azide into the hippocampus of animals

Также было показано, что в ткани гиппокампа крыс, которым вводили фрагменты Аβ, концентрация фосфорилированного тау-белка (Рис. 2) была выше нежели у ЛО животных в 4,7 раза ($p < 0,05$). На фоне инъекции в

гиппокамп крыс раствора натрия азида в концентрациях 2М, 3М и 4М содержание тау-белка превосходило аналогичное у ЛО группы крыс в 2,2; 4,1 и 3,9 раза соответственно (все показатели $p < 0,05$). При этом, введение 1М раствора натрия

азид не оказало значимого влияния на процесс накопления фосфорилированного тау-белка в гиппокампе животных. Кроме того, содержание тау-белка в ткани гиппокампа у крыс, которым вводили 2М

раствор натрия азиды было достоверно ($p < 0,05$) меньше такового у животных, которым вводили как фрагменты Аβ, так и натрия азиды в концентрации 3М и 4М.



Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; Аβ – группа крыс, которой вводили фрагменты Аβ; натрия азид – группа крыс, которой вводили натрия азид в разных концентрациях (1М, 2М, 3М и 4М соответственно); * – статистически значимо относительно ЛО крыс ($p < 0,05$, тест Даннета); # – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили Аβ ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); Δ – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 3М концентрации ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); α – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 4М концентрации ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса).

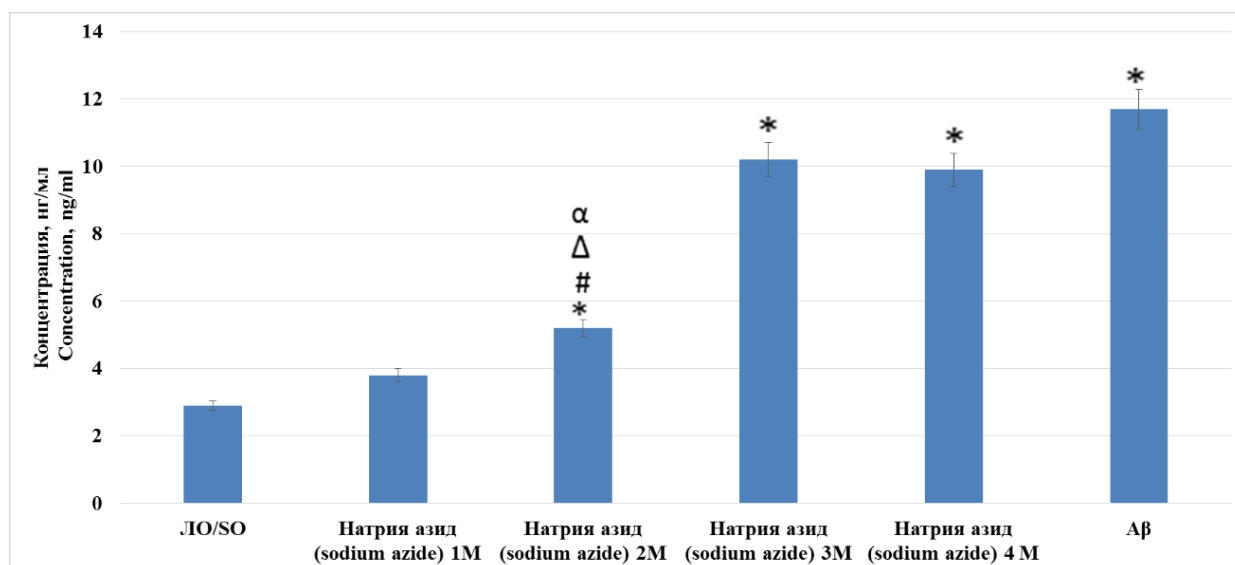
Note: SO – sham-operated animals; Aβ – a group of rats to which fragments of Aβ were injected; sodium azide – a group of rats to which sodium azide was injected at different concentrations (1M, 2M, 3M and 4M, respectively); * – significant relative to SO rats ($p < 0,05$, Dunnett test); # – significant relative to the group of rats injected with Aβ ($p < 0,05$, Newman-Keulse test); Δ – significant relative to the group of rats injected with 3M sodium azide concentration ($p < 0,05$, Newman-Keulse test); α – significant relative to the group of rats injected with sodium azide 4M concentration ($p < 0,05$, Newman-Keulse test).

Рис. 2. Изменение концентрации тау-белка в ткани гиппокампа крыс на фоне введения фрагментов Аβ и разных концентраций натрия азиды

Fig. 2. Changes in the concentration of tau protein in rat hippocampal tissue against the background of injection of Aβ fragments and different concentrations of sodium azide

Анализ изменения концентрации АИФ позволил установить, что у крыс, которым вводили натрия азид в концентрациях 2М, 3М и 4М данный показатель превышал аналогичный у ЛО животных в 1,8 ($p < 0,05$); 3,5 ($p < 0,05$) и 3,4 ($p < 0,05$) раза соответственно, тогда как на фоне введения Аβ, содержание АИФ в ткани гиппокампа увеличилось в 4,0 раза ($p < 0,05$) по отношению к ЛО группе крыс (Рис. 3). При этом, у крыс которым

вводили 2М раствор натрия азиды, концентрация АИФ была достоверно ($p < 0,05$) меньше аналогичной у животных, которым вводили Аβ и 3М/4М растворы натрия азиды и статистически значимо не отличалась от показателей ЛО группы крыс. Также стоит отметить, что достоверных отличий между группами животных, которым вводили Аβ и натрия азиды в концентрации 3М и 4М, не установлено.



Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; Aβ – группа крыс, которой вводили фрагменты Aβ; натрия азид – группа крыс, которой вводили натрия азид в разных концентрациях (1М, 2М, 3М и 4М соответственно); * – статистически значимо относительно ЛО крыс ($p < 0,05$, тест Даннета); # – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили Aβ ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); Δ – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 3М концентрации ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); α – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 4М концентрации ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса).

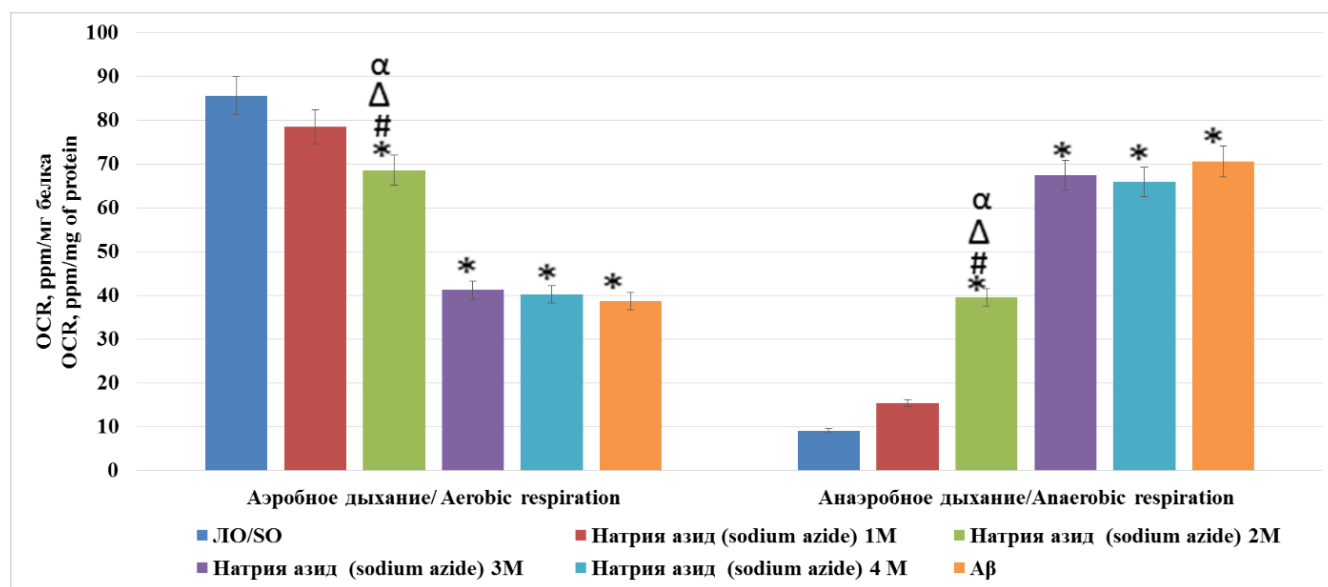
Note: SO – sham-operated animals; Aβ – a group of rats to which fragments of Aβ were injected; sodium azide – a group of rats to which sodium azide was injected at different concentrations (1M, 2M, 3M and 4M, respectively); * – significant relative to SO rats ($p < 0.05$, Dunnet test); # – significant relative to the group of rats injected with Aβ ($p < 0.05$, Newman-Keulse test); Δ – significant relative to the group of rats injected with 3M sodium azide concentration ($p < 0.05$, Newman-Keulse test); α – significant relative to the group of rats injected with sodium azide 4M concentration ($p < 0.05$, Newman-Keulse test).

Рис. 3. Изменение концентрации АИФ в ткани гиппокампа крыс на фоне введения фрагментов Aβ и разных концентраций натрия азида

Fig. 3. Changes in the concentration of AIF in rat hippocampal tissue against the background of injection of Aβ fragments and different concentrations of sodium azide

На фоне введения фрагментов Aβ в гиппокамп крыс отмечено снижение (относительно ЛО животных) интенсивности аэробного метаболизма на 54,8% ($p < 0,05$) при сопутствующем повышении анаэробных реакций обмена в 7,8 раза ($p < 0,05$). В тоже время при инъекции натрия азида в концентрациях 2М, 3М и 4М аэробный метаболизм уменьшился в сравнении с ЛО животными на 20,0%; 51,9% и 53,0% соответственно

(все показатели $p < 0,05$), тогда как анаэробный метаболизм, напротив, увеличился в 4,4 ($p < 0,05$); 7,4% ($p < 0,05$) и 7,2 ($p < 0,05$) раза соответственно (Рис. 4). Также было показано, что у крыс, которым вводили 2М раствор натрия азида, реакции аэробного обмена были достоверно ($p < 0,05$) ниже, а анаэробного выше, чем у животных, которым вводили Aβ и натрия азид в концентрациях 3М и 4М.



Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; Аβ – группа крыс, которой вводили фрагменты Аβ; натрия азид – группа крыс, которой вводили натрия азид в разных концентрациях (1М, 2М, 3М и 4М соответственно); * – статистически значимо относительно ЛО крыс ($p < 0,05$, тест Даннета); # – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили Аβ ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); Δ – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 3М концентрации ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); α – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 4М концентрации ($p < 0,05$, тест Ньюмена-Кейлса).

Note: SO – sham-operated animals; Aβ – a group of rats to which fragments of Aβ were injected; sodium azide – a group of rats to which sodium azide was injected at different concentrations (1M, 2M, 3M and 4M, respectively); * – significant relative to SO rats ($p < 0.05$, Dunnet test); # – significant relative to the group of rats injected with Aβ ($p < 0.05$, Newman-Keulse test); Δ – significant relative to the group of rats injected with 3M sodium azide concentration ($p < 0.05$, Newman-Keulse test); α – significant relative to the group of rats injected with sodium azide 4M concentration ($p < 0.05$, Newman-Keulse test).

Рис. 4. Изменение аэробных и анаэробных реакций метаболизма в ткани гиппокампа крыс на фоне введения фрагментов Аβ и разных концентраций натрия азид.

Fig. 4. Changes in aerobic and anaerobic metabolic reactions in rat hippocampal tissue against the background of injection of Aβ fragments and different concentrations of sodium azide.

При анализе изменения реакция окислительного стресса в ткани гиппокампа крыс с БА (Табл. 1), было установлено, что при инъекции фрагментов Аβ у животных по отношению к ЛО крысам отмечается снижение активности СОД на 74,8% ($p < 0,05$), при повышении концентрации ТБК-АП в 2,53 раза ($p < 0,05$). В группах крыс, которым БА моделировали путём введения натрия азид в концентрации 1М и 2М, значимых отличий в содержании ТБК-АП и активности СОД в

сравнении с ЛО группой крыс установлено не было, хотя была отмечена тенденция к негативному изменению данных показателей (повышение и снижение соответственно). В тоже время на фоне инъекции в гиппокамп крыс раствора натрия азид в концентрации 3М и 4М наблюдалось уменьшение активности СОД на 70,2% ($p < 0,05$) и 71,9% ($p < 0,05$) соответственно, при повышении содержания ТБК-АП в 2,0 ($p < 0,05$) и 2,05 ($p < 0,05$) раза соответственно.

Таблица 1

Изменение реакций окислительного стресса в ткани гиппокампа крыс на фоне введения фрагментов Аβ и разных концентраций натрия азида

Table 1

Changes in oxidative stress reactions in rat hippocampal tissue against the background of administration of Aβ fragments and different concentrations of sodium azide

Группа	СОД, Ед/мг белка	ТБК-АП, нмоль/мг белка
ЛО/SO	52,3±1,5	0,56±0,08
Натрия азид (sodium azide) 1M	41,1±1,6# αΔ	0,53±0,08# αΔ
Натрия азид (sodium azide) 2M	36,4±1,4#αΔ	0,64±0,03# αΔ
Натрия азид (sodium azide) 3M	15,6±1*	1,12±0,1*
Натрия азид (sodium azide) 4 M	14,7±1,6*	1,15±0,05*
Аβ	13,2±0,9*	1,42±0,04*

Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; Аβ – группа крыс, которой вводили фрагменты Аβ; натрия азид – группа крыс, которой вводили натрия азид в разных концентрациях (1М, 2М, 3М и 4М соответственно); * – статистически значимо относительно ЛО крыс ($p<0,05$, тест Даннета); # – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили Аβ ($p<0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); Δ – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 3М концентрации ($p<0,05$, тест Ньюмена-Кейлса); α – статистически значимо относительно группы крыс, которым вводили натрия азид 4М концентрации ($p<0,05$, тест Ньюмена-Кейлса).

Note: SO – sham-operated animals; Aβ – a group of rats to which fragments of Aβ were injected; sodium azide – a group of rats to which sodium azide was injected at different concentrations (1M, 2M, 3M and 4M, respectively); * – significant relative to SO rats ($p<0.05$, Dunnet test); # – significant relative to the group of rats injected with Aβ ($p<0.05$, Newman-Keulse test); Δ – significant relative to the group of rats injected with 3M sodium azide concentration ($p<0.05$, Newman-Keulse test); α – significant relative to the group of rats injected with sodium azide 4M concentration ($p<0.05$, Newman-Keulse test).

Обсуждение результатов. Выбор экспериментальной модели нейродегенеративных заболеваний, в частности, БА играет определяющую роль в успешном доклиническом изучении новых фармакологически активных соединений. Наряду с классическими моделями, например, амилоидной или алюминий-хлоридной, в экспериментальной практике все чаще используются альтернативные подходы, позволяющие воспроизвести отдельные патофизиологические механизмы БА. Silva, et al., 2023 сообщают, что в качестве агента, индуцирующего БА, возможно использование стрептозоточина. В данной работе при введении в гиппокамп животного стрептозоточин вызывал усиление нейродегенеративного процесса и активацию ацетилхолинэстеразы, что в свою очередь является одними из ведущих патогенетических элементов БА [17].

В тоже время, принимая во внимание особенности патогенеза БА, а именно наличие выраженного энергодефицита и митохондриальной дисфункции, можно предположить, что некоторые митохондриальные токсиканты могут выступать в качестве БА-индуцируемых соединений. Одним из таких веществ является натрия азид.

Натрия азид представляет собой сопряженное основание с азотистоводородной кислотой. Это белый кристаллический порошок без вкуса и запаха, хорошо растворимый в воде. Натрия азид при контакте с водой превращается в азотистоводородную кислоту. Используется, в первую очередь в промышленности в качестве газогенерирующей среды в пиропатронах для автомобильных подушек безопасности. Также возможно применение натрия азиды как катализатора химического синтеза или

консерванта. Токсичность натрия азида зависит от дозы и проявляется в виде тошноты, рвоты, гипотонии, тахикардии и головных болей, гипотонии, аритмии, ацидоза, судорог [18].

Тенденция использования натрия азида для моделирования БА прослеживается в работе, представленной Jabeen, et al., 2022. В данном исследовании авторами сравнивались две экспериментальные модели БА: вызванная азидом натрия и алюминия хлоридом. В итоге была продемонстрирована сопоставимость данных экспериментальных техник. Однако, авторами рассматривалось системное воздействие натрия азида на организм животного с вовлечением в патологический процесс печени, сердца и поджелудочной железы, что указывает на формирование коморбидной патологии [19]. В тоже время представляется актуальным локальное введение натрия азида в гиппокамп животного, что вероятно может индуцировать локальные церебральные изменения, характерные для БА.

В ходе исследования было показано, что введение растворов натрия азида в концентрации 3М и 4М в ткань гиппокампа крыс приводит к повышению концентрации гиперфосфорилированного тау-белка, угнетению аэробного, увеличению анаэробного обмена и активации внутреннего пути апоптоза, что выражалось в росте содержания АИФ. Также у крыс наблюдалось угнетение активности СОД с активацией липопероксидативных процессов. В итоге отмечено развитие когнитивного дефицита, что подтверждалось данными, полученными при оценке поведения животных в тесте Y-образный лабиринт. Стоит отметить, что наблюдаемые изменения при введении натрия азида в указанных концентрациях были эквивалентны таковым, отмечаемым на фоне инъекции фрагментов Аβ, тогда как при использовании натрия азида в более низких концентрациях (1М раствор) статистически значимых отличий по

отношению к ЛО животным не наблюдалось, либо они были достоверно меньше, чем при применении натрия азида в высоких концентрациях или при введении Аβ (как в случае введения 2М раствора натрия азида). Подобные изменения, наблюдаемые в ткани гиппокампа могут быть связаны с характером действия натрия азида. Данное соединение обладает выраженным цитотоксическим действием, реализуемым по двум молекулярным механизмам: ингибирование цитохром-с-оксидазы митохондриальной дыхательной цепи и каталазы, индуцируя тем самым энергодефицит и окислительный стресс, что особенно негативно сказывается на клетках с высокой метаболической активностью, например, нейронов головного мозга [20]. В тоже время, нарушение синтеза АТФ и сопутствующее подавление АТФ-зависимых процессов приводит к снижению буферной кальциевой емкости митохондрий, инициируя набухание и «блэббинг» митохондрий, в результате активируя внутренний путь апоптоза [21]. Кроме того, было показано снижение активности цитохром-с-оксидазы у пациентов с БА в ткани гиппокампа, что клинически подтверждает развитие митохондриальной дисфункции при БА [22]. Описанные механизмы практически полностью отражают положения «митохондриальной теории» БА [23]. Согласно данной гипотезе, нарушение функционирования митохондрий клетки способствует повышенной агрегации Аβ и тау-белка, что было подтверждено *Abyadeh, et al., 2021* [24]. Стоит отметить, что хронологически митохондриальная дисфункция является более ранним патогенетическим механизмом БА, чем формирование агрегатов Аβ [25]. Таким образом, введение натрия азида в гиппокамп крыс в экспериментальных условиях может обеспечить формирование ранних стадий БА, связанных с развитием митохондриальной дисфункции, что в дальнейшем приводит к феноменонимическим изменениям в ткани

гиппокампа, выражаемым в накоплении фосфорилированного тау-белка.

Заключение. Проведенное исследование показало, что введение 3М и 4М растворов натрия азида в гиппокамп крыс приводит патофизиологическим изменениям сопоставимыми с аналогичными при инъекции фрагментов Аβ. При этом, отмечается дисбаланс реакций основного обмена, активация апоптоза, окислительного стресса и накопление фосфорилированных форм тау-белка. Таким образом, введение 3М и 4М растворов натрия азида в гиппокамп крыс может представлять собой альтернативный введению фрагментов Аβ экспериментальный подход к моделированию БА.

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. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's and Dementia. 2023;19(4):1598-1695. DOI: <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
2. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet. 2020;396(10258):1223-1249. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30752-2)
3. Dhapola R, Kumari S, Sharma P, et al. Insight into the emerging and common experimental in-vivo models of Alzheimer's disease. Laboratory Animals Research. 2023;39(1):33. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42826-023-00184-1>
4. Sharma H, Chang KA, Hulme J, et al. Mammalian Models in Alzheimer's Research: An Update. Cells. 2023;12(20):2459. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12202459>
5. Lee JY, Jeong EA, Lee J, et al. TonEBP Haploinsufficiency Attenuates Microglial Activation and Memory Deficits in Middle-Aged and Amyloid β Oligomer-Treated Mice. Cells. 2023;12(22):2612. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12222612>
6. Facchinetti R, Bronzuoli MR, Scuderi C. An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid β -Peptide (1–42). In: Skaper S, editor. Neurotrophic Factors. Methods in Molecular Biology, vol 1727. New York: Humana Press; 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_25
7. Dewanjee S, Chakraborty P, Bhattacharya H, et al. Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 2022;193(Pt 1):134-157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.032>
8. Zuo Y, Hu J, Xu X, et al. Sodium azide induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells through Pgc-1 α -associated signaling pathway. Molecular Medicine Reports. 2019;19(3):2211-2219. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9853>
9. Marinou KA, Dontas IA. European Union Legislation for the Welfare of Animals Used for Scientific Purposes: Areas Identified for Further Discussion. Animals. 2023;13(14):2367. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13142367>
10. Воронков АВ, Поздняков ДИ, Аджиахметова СЛ, и др. Влияние экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга. Фармация и фармакология. 2019;7(4):198-207. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-4-198-207>
11. Paxinos G, Watson J. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 7th Edition. New York: Academic Press; 2013.
12. Amani M, Zolghadrnasab M, Salari AA. NMDA receptor in the hippocampus alters

neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiology and Behavior*. 2019;202:52-61. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.01.005>

13. De Leon JAD, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of Visual Experiments*. 2020;(159):10.3791/61122. DOI: <https://doi.org/10.3791/61122>

14. Connolly NMC, Theurey P, Adam-Vizi V, et al. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*. 2018;25(3):542-572. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0020-4>

15. Shen Y, Dinh HV, Cruz ER, et al. Mitochondrial ATP generation is more proteome efficient than glycolysis. *Nature Chemical Biology*. 2024;20:1123-1132. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01571-y>

16. Istek O, Tanrisever M, Kucukler S, et al. Comparison of the effects of Aloe vera gel and coconut oil on the healing of open wounds in rats. *Veterinary Medicine*. 2023;68(1):17-26. DOI: <https://doi.org/10.17221/101/2021-VETMED>

17. Tat J, Heskett K, Satomi S, et al. Sodium azide poisoning: a narrative review. *Clinical Toxicology*. 2021;59(8):683-697. DOI: <https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1906888>

18. van der Heijden LT, van den Hondel KE, Olyslager EJH, et al. Internet-Purchased Sodium Azide Used in a Fatal Suicide Attempt: A Case Report and Review of the Literature. *Toxics*. 2023;11(7):608. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics11070608>

19. Zhang X, Wang L, Li B, et al. Targeting Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases: Expanding the Therapeutic Approaches by Plant-Derived Natural Products. *Pharmaceuticals*. 2023;16(2):277. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16020277>

20. Silva SSL, Tureck LV, Souza LC, et al. Animal model of Alzheimer's disease induced by streptozotocin: New insights about cholinergic pathway. *Brain Research*. 2023;1799:148175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148175>

21. Jabeen K, Rehman K, Awan FR, et al. Comparative Biochemical Profiling of Aluminum Chloride and Sodium Azide Induced Neuroinflammation and Cardiometabolic Disturbance. *ACS Omega*. 2022;7(44):40432-

40445.

DOI:

<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05467>

22. Fišar Z, Hroudová J. CoQ10 and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Antioxidants*. 2024;13(2):191. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13020191>

23. Javadpour P, Abbaszadeh F, Ahmadiani A, et al. Mitochondrial Transportation, Transplantation, and Subsequent Immune Response in Alzheimer's Disease: An Update. *Molecular Neurobiology*. 2024;61:7151-7167. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04009-7>

24. Abyadeh M, Gupta V, Chitranshi N, et al. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease – a proteomics perspective. *Expert Review of Proteomics*. 2021;18(4):295-304. DOI: <https://doi.org/10.1080/14789450.2021.1918550>

25. Sharma C, Kim S, Nam Y, et al. Mitochondrial Dysfunction as a Driver of Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4850. DOI:

<https://doi.org/10.3390/ijms22094850>

References

1. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*. 2023;19(4):1598-1695. DOI: <https://doi.org/10.1002/alz.13016>

2. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396(10258):1223-1249. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30752-2)

3. Dhapola R, Kumari S, Sharma P, et al. Insight into the emerging and common experimental in-vivo models of Alzheimer's disease. *Laboratory Animals Research*. 2023;39(1):33. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42826-023-00184-1>

4. Sharma H, Chang KA, Hulme J, et al. Mammalian Models in Alzheimer's Research: An Update. *Cells*. 2023;12(20):2459. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12202459>

5. Lee JY, Jeong EA, Lee J, et al. TonEBP Haploinsufficiency Attenuates Microglial Activation and Memory Deficits in Middle-Aged and Amyloid β Oligomer-Treated Mice. *Cells*. 2023;12(22):2612. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12222612>

6. Facchinetti R, Bronzuoli MR, Scuderi C. An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid

β -Peptide (1–42). In: Skaper S, editor. Neurotrophic Factors. Methods in Molecular Biology, vol 1727. New York: Humana Press; 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_25

7. Dewanjee S, Chakraborty P, Bhattacharya H, et al. Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 2022;193(Pt 1):134-157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.032>

8. Zuo Y, Hu J, Xu X, et al. Sodium azide induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells through Pgc-1 α -associated signaling pathway. Molecular Medicine Reports. 2019;19(3):2211-2219. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9853>

9. Marinou KA, Dontas IA. European Union Legislation for the Welfare of Animals Used for Scientific Purposes: Areas Identified for Further Discussion. Animals. 2023;13(14):2367. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13142367>

10. Voronkov AV, Pozdnyakov DI, Adzhiakhmetova SL, et al. Effect of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) and marigold (*Tagetes patula* L.) extracts on hippocampal mitochondria functional activity within conditions of experimental acute brain hypometabolism. Pharmacy and Pharmacology. 2019;7(4):198-207. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-4-198-207>

11. Paxinos G, Watson J. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 7th Edition. New York: Academic Press; 2013.

12. Amani M, Zolghadrasab M, Salari AA. NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. Physiology and Behavior. 2019;202:52-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.01.005>

13. De Leon JAD, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. Journal of Visual Experiments. 2020;(159):10.3791/61122. DOI: <https://doi.org/10.3791/61122>

14. Connolly NMC, Theurey P, Adam-Vizi V, et al. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. Cell Death and Differentiation. 2018;25(3):542-572. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0020-4>

15. Shen Y, Dinh HV, Cruz ER, et al. Mitochondrial ATP generation is more proteome efficient than glycolysis. Nature Chemical Biology. 2024;20:1123-1132. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01571-y>

16. Istek O, Tanrisever M, Kucukler S, et al. Comparison of the effects of Aloe vera gel and coconut oil on the healing of open wounds in rats. Veterinary Medicine. 2023;68(1):17-26. DOI: <https://doi.org/10.17221/101/2021-VETMED>

17. Tat J, Heskett K, Satomi S, et al. Sodium azide poisoning: a narrative review. Clinical Toxicology. 2021;59(8):683-697. DOI: <https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1906888>

18. van der Heijden LT, van den Hondel KE, Olyslager EJH, et al. Internet-Purchased Sodium Azide Used in a Fatal Suicide Attempt: A Case Report and Review of the Literature. Toxics. 2023;11(7):608. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics11070608>

19. Zhang X, Wang L, Li B, et al. Targeting Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases: Expanding the Therapeutic Approaches by Plant-Derived Natural Products. Pharmaceuticals. 2023;16(2):277. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16020277>

20. Silva SSL, Tureck LV, Souza LC, et al. Animal model of Alzheimer's disease induced by streptozotocin: New insights about cholinergic pathway. Brain Research. 2023;1799:148175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148175>

21. Jabeen K, Rehman K, Awan FR, et al. Comparative Biochemical Profiling of Aluminum Chloride and Sodium Azide Induced Neuroinflammation and Cardiometabolic Disturbance. ACS Omega. 2022;7(44):40432-40445. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05467>

22. Fišar Z, Hroudová J. CoQ10 and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. Antioxidants. 2024;13(2):191. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13020191>

23. Javadpour P, Abbaszadeh F, Ahmadiani A, et al. Mitochondrial Transportation, Transplantation, and Subsequent Immune Response in Alzheimer's Disease: An Update. Molecular Neurobiology. 2024;61:7151-7167. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04009-7>

24. Abyadeh M, Gupta V, Chitranshi N, et al. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease – a proteomics perspective. Expert Review of Proteomics. 2021;18(4):295-304. DOI: <https://doi.org/10.1080/14789450.2021.1918550>

25.Sharma C, Kim S, Nam Y, et al. Mitochondrial Dysfunction as a Driver of Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(9):4850. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22094850>

Статья поступила в редакцию 13 марта 2024 г.
Поступила после доработки 21 апреля 2024 г.
Принята к печати 9 мая 2024 г.

Received 13 March 2024
Revised 21 April 2024
Accepted 9 May 2024

Информация об авторе

Дмитрий Игоревич Поздняков, кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий

кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск, Российская Федерация, E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5595-8182>.

Information about the author

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

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА MEDICINE



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-8

УДК 616.89:616.5-002

The role of mental disorders in the pathogenesis of atopic dermatitis (review)

Natalya L. Levintova¹ , Yulia V. Keniksfest² , Konstantin Yu. Retyunskiy³ ,
Alexandra V. Staruseva⁴ , Victoria V. Ruzhenkova⁵ , Inna S. Khamaskaya⁵

¹ Novourengoy Psychoneurological Dispensary,
38 Yamalskaya St., Novy Urengoy, 629305, Russia

² Ural Research Institute of Dermatovenereology and Immunopathology,
8 Shcherbakova St., Yekaterinburg, 620076, Russia

³ Professorika Clinic,
250 Chkalov St., Yekaterinburg, 620110, Russia

⁴ Talitskaya Central Regional Hospital,
23 Krasnoarmeyskaya St., Talitsa, 623640, Russia

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

Corresponding author: Victoria V. Ruzhenkova (ruzhenkova@bsuedu.ru)

Abstract

Background: The problem of atopic dermatitis has received significant attention from researchers across different fields over the years. Despite its high prevalence, there remains an incomplete understanding of the underlying pathogenetic mechanisms, leading to ineffective therapeutic strategies. This lack of consensus regarding a unified model of dermatitis development creates challenges in selecting appropriate treatment options. **The aim of the study:** To analyze the current scientific literature data describing the relationship between central nervous system damage, psychogenic factors and the development of atopic dermatitis. **Materials and methods:** Data were searched in the electronic libraries of scientific articles PubMed, eLIBRARY.RU, and Google Scholar. A total of 41 publications corresponding to the objectives of the current review were analyzed. **Results:** Numerous studies highlight the dual contribution of exogenous (environmental) and endogenous (internal) factors in the etiology of atopic dermatitis. Psychogenic elements, particularly psychological stress, emerge as key drivers influencing disease progression. Recent advancements in psychoneuroimmunology underscore the profound effect of psychophysiological variables on immune responses. Additionally, a correlation exists between the degree of pathological changes, distribution of skin lesions, and the severity of associated psychopathological manifestations. However, these findings predominantly focus on adults, with less exploration into pediatric populations where mental health aspects are often overlooked. Current investigations typically prioritize cutaneous pathologies rather than considering broader implications related to systemic impacts. **Conclusion:** Further investigation into the interplay between psychogenic influences and individual personality traits could provide valuable insights into the mechanisms

underpinning atopic dermatitis. Addressing the gaps in our knowledge concerning the contributions of intrinsic neurological anomalies and their consequences on autonomic-nervous and immunological balance may yield more effective diagnostic tools and therapies.

Keywords: atopic dermatitis; mental disorders in atopic dermatitis; the mechanism of their occurrence; literature review

For citation: Levintova NL, Keniksfest YuV, Retyunskiy KYu, et al. The role of mental disorders in the pathogenesis of atopic dermatitis (review). *Research Results in Biomedicine*. 2025;11(4):699-708. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-8

Introduction. Atopic dermatitis (AD) is the result of the impact of a large number of pathological factors on the human body, the mechanism of which has yet to be fully studied. Today, it is known that the pathogenesis of atopic dermatitis affects all human organ systems. Over the past 20 years, there has been an increase in the incidence of AD by more than 2 times. The prevalence of AD varies depending on the region [1, 2] and among the paediatric population exceeds the figure of 20%, and among the adult population it reaches almost 10% [3].

The incidence of atopic dermatitis (AD) among children in different regions of Russia ranges from 10 to 28%, accounting for 50–75% of all allergic diseases [3].

The role of genetic influence on the occurrence of AD is obvious. For instance, AD develops in 81% of children when both parents suffer from this disease, and in 56% of children when only one parent is ill. Moreover, the risk of developing AD increases 1.5 times if the mother is ill [3]. AD is a disease with a genetic predisposition [4, 5], which is strongly influenced by the innate and adaptive immune response as well as environmental factors [6, 7, 8].

Researchers attach great importance to psychogenic factors, primarily to psychological stress [9]. Modern advances in psychoneuroimmunology demonstrate an enormous influence of psychophysiological factors on the immune system. Psychotraumatic factors among women, intrafamilial stressors are in first place in terms of prevalence and significance (44.1%); among men, work-related stressors predominate (29.8%) and family problems are less frequent (24.8%). At the same time, 34%

of the patients experienced the onset or recurrence of the skin disease 1-2 days after severe stress. Severe stressful situations account for 28% of all cases, psychic trauma of moderate severity occurs in 39% of cases. As a result of psychogenic exacerbation of atopic dermatitis, the production of regulatory neurotrophins and neuropeptides increases. This leads to impaired cytokine secretion and imbalance in cellular immunity, which in turn contributes to the development of inflammation [10].

Domestic scientists noting that the concentration of a neurotrophic factor in the blood closely correlates with the activity of the disease support the latter conclusion. In morphofunctional terms, the immune system is not isolated from the central nervous system but serves as the object of its regulatory influences.

Chronic stress is commonly associated with immunosuppression. The relationship between the most important systems of the body is carried out through endocrine factors. Another possible mechanism for the transformation of psychogenic effects during aggravation of AD is the involvement of neural pathways providing signal transmission between the central nervous system (CNS) and the skin. This conclusion was based on the identified features of clinical manifestations. Such as the symmetry of the rash, the complete absence of rashes in areas of skin denervation, the occurrence of erythema and itching when experiencing a stressful situation. Thus, it was established that with AD, a high density of nerve endings is observed in areas of chronic rashes.

The aim of the study. To analyze the current scientific literature data describing the

relationship between central nervous system damage, psychogenic factors and the development of atopic dermatitis.

Materials and methods. Data were searched in the electronic libraries of scientific articles PubMed, eLIBRARY.RU, and Google Scholar. The search was conducted using the following keywords: atopic dermatitis, pathogenesis of atopic dermatitis, psychosomatic disorders, neuropsychiatric model. Initially, 183 publications were retrieved. Of these, 74 did not meet the inclusion criteria, 37 were duplicates and were therefore excluded, and 31 were of poor quality or lacked sufficient information. Ultimately, 41 original publications aligned with the aims of the review were analyzed.

Inclusion Criteria:

- Original research, qualitative reviews, and meta-analyses published from 2010 until today.

- Studies focusing on the interaction between mental disorders and atopic dermatitis, as well as the psychoneurological component in the pathogenesis of the disease.

- High levels of evidence (classification levels 1 and 2 according to the Oxford Centre for Evidence-Based Medicine scale).

- Statistically significant outcomes ($p \leq 0.05$).

- Accessible full text or sufficient information to evaluate the study comprehensively.

Exclusion Criteria:

- Unreliable or poorly executed studies.

- Papers not addressing the topic of the link between mental disorders and atopic dermatitis.

- Cases of duplicate publication (only the most complete version was retained).

- Small sample sizes (less than 50 subjects) unless the study had exceptional relevance or uniqueness.

- Partial texts or fragmented publications preventing a full assessment of methodology and results.

Theories on the occurrence of atopic dermatitis in children

The formation and course of AD in children is significantly influenced by genetic

predisposition to allergic reactions with polygenic forms of inheritance. It should be noted that it is not the disease itself that is inherited, but a set of genetic factors that contribute to the formation of allergic pathology [11]. It has been established that, in most cases, atopic dermatitis is a hereditary condition. Studies show that 40% of patients have one or more family members with signs of atopic dermatitis in their anamnesis. It is generally accepted that the prevalence of AD among children whose parents suffer from AD is more than 60%. If both parents are ill, then AD develops in the child in more than 80% of cases. The researchers haven't established differences in gender-based inheritance. According to Toppila-Salmi S. (2019), a predominant influence of the maternal line is assumed. For instance, a connection with atopic diseases on the mother's side is detected in 60-70% of cases, less often on the father's side – 18-22% of cases. AD is often combined with respiratory atopies [12].

Immune mechanisms of atopic dermatitis

Russian and European scientists have established that the main mechanism in the pathogenesis of AD is immune dysfunction [13]. In the pathogenesis of AD, two factors are crucial, namely impaired skin barrier function and violations of the body's immunological reactivity, with a shift in the balance between Th1 and Th2 lymphocytes towards the latter, as well as an increase in the production of corresponding cytokines [14].

Normally, Th 1 and Th 2 immune cells act in a balanced manner. However, when AD is biased towards hyperactivation Th 2, which leads to an inadequate immune response and disruption of IgE production. A significant decrease in the level of gamma interferon is also noted. It could be argued that this mechanism plays a key role in the development of AD. It should be noted that in patients with atopy, the number of Langerhans cells, which are the main cells of the skin immune system responsible for the accumulation of IgE-mediated allergens in the skin and their presentation to T lymphocytes, is significantly higher than in healthy people [15].

The pathogenesis of AD is not limited to the reagin type of allergy by which, with increasing duration of the disease, there is a persistent imbalance between Th2 and Th22/Th1 and Th17, which remains even during the remission of dermatosis, as well as disturbances in the cytokine profile, in particular the IL-4/IL-13 ratio [16].

Dendritic cells activated by mediators of acute inflammation infiltrate the epidermis and initiate an immune response through the Th1 pathway, leading to increased production of INF γ , IL-2, IL-12. Skin brushing exacerbates damage to keratinocytes, mast cells and macrophages that contain IgE. This triggers the release of IL-1, TNF- α , platelet-activating factor, leukotrienes and other mediators that support the inflammatory process [15].

In the genesis of chronic inflammation in AD, we cannot exclude autoimmune processes and features of the immune response, which may contribute to the development of a hypersensitivity reaction and induce the proliferation of autoreactive T cells. At the same time, the development and course of immune reactions in the skin is influenced by the peripheral nervous system [17].

The intensity of itching in patients with chronic dermatoses depends on the severity of cutaneous innervation by nerve C-fibers. AD may be only triggered by various environmental factors in people prone to it [7]. Food sensitization is also of importance in the pathogenesis of AD. It is well known that when following a hypoallergenic diet and refusing to eat foods such as eggs, milk, seafood, mushrooms, cereals, legumes, citrus fruits, the severity of AD is alleviated, which is observed in more than 90% of patients with severe AD [8]. To date, it has been established that the causes of constant exacerbation of allergic reactions in children with AD are disorders (chronic diseases of the gastrointestinal tract), hepatobiliary system, parasitic invasions) and true food allergy [18]. In addition to the above-mentioned factors affecting the course of AD, the researchers point to the role of many background disorders in manifestation of the disease. In their opinion, these disorders may enhance certain

components of pathogenesis: internal focal infections, dysmetabolic nephropathies, interstitial nephritis, disorders of intestinal biocenosis, congenital, genetically mediated intestinal fermentopathy, impaired metabolism of fatty acids in formed elements, blood plasma, and adipose tissue [19].

The role of CNS damage in the pathogenesis of atopic dermatitis

Great importance in the development of AD is given to the pathology of the central nervous system. Interesting results were obtained during the neurological examination of children with atopic dermatitis. A total of 124 children were examined. In 71.4% of cases, corresponding neurological symptoms were detected, which, according to the authors, indicated dysfunction of the brain at the level of the cortex and limbic-reticular complexes [20]. So, based on the results of a study conducted using cardiointervalography under the Reocard program, notes the secondary nature of changes in autonomic regulation that progress against the background of the torpid course of atopic syndrome. When examining the functional state of the central and autonomic nervous system (EEG, REG, ultrasound dopplerography of vessels in the brain and spinal cord), pathological changes were identified in 76.6% of AD patients. Only a few publications in modern literature are devoted to the study of EEG in AD. The study was carried out exclusively by Russian authors. EEG is a prognostic examination method, since persistent EEG changes after treatment indicate the possibility of a relapse in the near future in some patients. EEG examinations in children and adolescents with skin pathology showed the signs of residual organic cerebral insufficiency in all patients.

Of particular interest is an EEG examination of children with AD conducted on a "Neurocartograph" computer encephalograph using color mapping, spectral and correlation analysis. In 36% of the children, the absence of alpha rhythm on the EEG was revealed, which, according to the authors, is due to profound changes in the functional state of the cerebral cortex and subcortical structures [20]. The revealed

changes in the cerebral bioelectrical activity usually manifested themselves as disturbances in the regularity of the basic rhythm, the inequalities of its frequency and amplitude, disturbances in zonal differences, the presence of slow waves, mainly in the Θ -band, sometimes in the form of bilaterally

synchronous bursts, single acute oscillations, and impaired reactivity. As a result, three variants of changes were presented on the EEG with an increasing degree of severity (phasing) of disturbances in the cerebral bioelectrical activity (Table 1).

Table 1

Changes in brain electrical activity detected by EEG in children with atopic dermatitis

EEG Findings	Percentage of Cases
Absence of Alpha Rhythm	36%
Abnormal Basic Rhythm	28%
Presence of Slow Waves (θ -band)	20%
Single Acute Oscillations	16%

These EEG findings illustrate disrupted electrical functioning in the brain, consistent with profound changes in cortical and subcortical areas. Three distinct phases of EEG disturbance severity were documented, emphasizing the dynamic nature of neurological perturbations in AD.

Rheoencephalography in almost all examined AD children enabled establishing the asymmetry of blood flow with changes (increase or decrease, often combined) in blood filling and tone of medium- and small-caliber vessels of anterior and vertebral artery circulation as well as the difficulty in venous blood flow. By means of REG, in AD patients, a dystonic state of the vessels in posterior circulation with asymmetry of blood flow up to 50% and a tendency of the cerebral vessels to hypertonicity was determined. The authors linked the formation of dermatosis clinical forms with the influence of certain risk factors in the corresponding age periods. Thus, both external (physical, chemical, biological) and internal (pathology of the nervous system, gastrointestinal tract, genetic predisposition and immune disorders) factors have a direct impact on the occurrence and development of atopic dermatitis [20].

The role of psychogenic and personal factors in the development of atopic dermatitis

The provocative role of psychogenic factors in the development of skin diseases was noted by many physicians [21]. At the end of the 19th century, Brocq L, Jacquet L. introduced the term “psychoneurodermatitis”,

which, according to the researchers of that time, clearly indicated the origin of the disease.

The direct impact of stress factors on the course of AD is based on the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal system, which is responsible for the transmission of control impulses from the central nervous system to the immune, endocrine and other systems. In atopic dermatitis under conditions of stress there is a decrease in the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system. The described mechanisms contribute to the exacerbation and development of atopic process under the influence of psychogenic factors. For instance, researchers revealed a statistically significant increase in the number of CD8+ lymphocytes and CLA in the blood, expressed by more than 80% of T cells infiltrating the skin [21]. It is well known that in atopic dermatitis, CLA causes an increase in IL-13 and IL-5 levels. Excessive blood levels of CLA cells as a result of stress indicate an increased ability of T lymphocytes to migrate into eczematous damaged skin during psychological stress, reflecting a link between psychoneuroendocrine mechanisms and Alzheimer's disease [21].

Another most probable mechanism of stress effect on skin condition is the influence of neuropeptides and their receptors on the transmission between the central nervous system, skin cells and the immune system. The described mechanisms are reflected in the concept of neurogenic inflammation in AD.

It should be noted that for more than half a century, studies have been conducted to

establish the role of personality traits of the patient in the development of AD. To date, no personality type specific to AD has been identified [22]. However, personality characteristics common to patients with AD have been established. Among them are mood swings, irritability, anxiety, depression, and neuroticism [23]. It should be noted that AD patients are characterized by the whole spectrum of nosogenic reactions complicating the course of the disease. The most important factor is the recurrent nature of the disease, subjective intolerance of itching, resistance to therapy, as well as cosmetic defects of the skin at the site of rashes [3]. In other words, the skin symptoms themselves are provoking factors and have a psychotraumatizing effect. They contribute to the progression of the disease in the form of the formation of new waves of exacerbations "inside" the relapse. The result is a kind of "vicious circle" of the disease [9]. Thus, we can speak about a close relationship between mental disorders and the course of clinical symptoms of skin diseases [24].

AD patients are characterized by certain neurotic personality traits. These include alienation, mood swings, depression, tension, aggressiveness, anxiety, and hypochondria. In turn, the reaction of introverted individuals, expressing anxiety and "hostile emotional conflict," often manifests itself in the form of scratching the skin [25].

The psychological portrait of a patient with atopic dermatitis is reflected in many literary data. Most often, the characteristics of such patients include anxious-depressive features, pronounced tension, which is largely due to the disease itself with its frequent exacerbations, discomfort in the form of itching and disfiguring lesions of the skin [26]. Numerous studies have also demonstrated an association between certain subtypes of depression and elevated levels of systemic inflammatory markers, such as interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein. Elevated levels of these biomarkers in AD patients may indicate a general inflammatory aetiology [10].

Skin lesions, their prevalence and severity of symptoms are closely related to the development of psychopathological changes in

the patient. It is noteworthy that the duration of the skin disease (eczema, psoriasis, atopic dermatitis) does not affect the spectrum of concomitant mental disorders, in contrast to the localization of the pathological process, which is of great importance [22].

Today, there is no doubt that it is important to study the mechanisms of mutual influence of psychogenic and personal risk factors of the patient on the development and exacerbation of the atopic process. It is obvious that the relationship between psychological, personal and physiological components of the pathogenesis of atopic dermatitis allows us to classify this disease as a psychosomatic disorder.

Impact of positive emotions and non-pharmacological approaches on the course of atopic dermatitis

Multiple scientific studies have demonstrated the beneficial effects of laughter, with researchers from various countries conducting experiments measuring its physiological impacts and advantages. It's been established that laughter helps reduce the production of allergen-specific IgE antibodies, diminishing allergic skin reactions and significantly boosting the activity of natural killer cells. Positive emotions consequently exert a noticeable influence on both hormonal and immune responses [27].

Certain studies have shown that kissing can substantially alleviate skin conditions associated with allergies by reducing levels of neurotrophic growth factors such as NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in patients with atopic dermatitis. These findings imply that kissing plays a significant role in neuroimmunological studies concerning atopic dermatitis [28].

Music offers yet another advantage, helping divert patients' attention away from distressing experiences or negative thoughts, greatly enhancing their quality of life. In addition, musical accompaniment can have a regulatory effect on immune responses, resulting in an increase in the number of lymphocytes, T cells, CD4 + T cells and memory T cells, as well as an increase in the level of IFN - γ and IL -6. These changes directly affect the barrier function of the skin

and the severity of general symptoms of atopic dermatitis.

Contemporary research suggests incorporating familiar and enjoyable music into routine music therapy sessions to help mitigate symptoms of multiple illnesses, including atopic dermatitis [28].

Additionally, a notable correlation has emerged between the progression of atopic dermatitis and watching entertaining television programs. Observations show that watching movies causes measurable shifts in blood parameters, mitigating allergic responses. Specifically, the count of plasma neutrophils noticeably drops after film viewings, thus improving indirectly mediated allergic reactions [29].

Emphasizing well-being, humor, and joy

as potential therapeutic interventions, it's vital to incorporate positive emotions into treatment regimens for patients with atopic dermatitis.

Mental disorders in atopic dermatitis

It's known that psychological disorders, including depression and anxiety, are closely connected to the development of atopic dermatitis and demand thorough attention [30]. Data indicates that mental disorders are prevalent in a sizable portion of patients with atopic dermatitis (Table 2), with nonpsychotic mental disorders occurring in nearly half of young patients afflicted by this condition. Remarkably, in severe cases, roughly two-thirds of patients encounter a variety of psychological issues, spanning from anxiety and phobia to depressive symptoms [31].

Table 2

Prevalence of mental disorders in children with atopic dermatitis

Diagnosis	Percentage of Patients
Affective Disorders	21-43%
Neurosis-like Depression	>66%
Anxiety-Fear Disorders	39.5%
Hysteriform Disorders	21.1%

It was found that children with atopic dermatitis are more likely to have depressive and anxiety disorders, behavioral disorders, autism spectrum disorders and hyperactivity disorder. They are characterized by suicidal thoughts and suicidal tendencies compared to healthy peers [23]. Concurrently, atopic dermatitis frequently contributes to sleep disturbances, lowered self-esteem, and social difficulties in peer relationships [32].

Most authors note the severity of depressive disorders, which correlate with the severity of skin manifestations [10]. Depressive reactions were predominant, cyclothymia was more typical for common forms of AD (28.7%). AD patients were characterized by anxious (39.5%) and hysterical (21.1%) variants of neurotic development.

It was found that in the younger age group (12-13 years old), mental disorders manifested themselves in the form of short-term neurotic reactions and behavioral

disorders. In the middle age group (14-15 years old), mental disorders were characterized by greater severity and clinical polymorphism with emotional experiences of the disease, especially a cosmetic defect. In the senior group (16-17 years old), persistent and clinical mental disorders as well as disorders that fitted within the framework of pathocharacterological development of personality were more often observed [33, 34]. The researchers have an ambiguous opinion regarding the relationship between depression, pain, itching and tingling. An interesting position is taken by other researchers who claim that sensations of the skin (burning, pain, etc.), having an obvious organic genesis, which can be regarded as equivalent to the latent course of depression [35, 36, 37]. It is also known that depression occurs with changes in a number of immunological indicators [38].

At the neuroendocrinological level, a number of signs common to depression and AD have also been found.

Today, the study of the prevalence and severity of anxiety and depression in patients with atopic dermatitis is conducted mainly by dermatologists using appropriate psychometric scales [39, 40].

It is generally accepted to attribute atopic dermatitis to a group of psychosomatic disorders characterized by variability of symptoms. Some experts contend, however, that only a fraction of cases fit this categorization, as many patients follow an autonomous disease trajectory. Meanwhile, the efficacy of treatments for atopic dermatitis and the length of remission periods tend to decline notably [41].

Conclusion. Atopic dermatitis is a complex disease involving immune, genetic, and psychoneuroimmunological factors. Comorbid mental disorders, such as anxiety and depression, exacerbate symptom severity and flare-ups. Effective treatment requires an interdisciplinary approach integrating dermatological, psychopharmacological, and psychotherapeutic measures to break the vicious cycle of psychosomatic interactions and improve long-term outcomes.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Cork MJ, Danby SG, Ogg GS. Atopic dermatitis epidemiology and unmet need in the United Kingdom. *Journal of Dermatological Treatment*. 2020;31(8):801-809. DOI: <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1655137>
2. Bylund S, von Kobyletzki LB, Svalstedt M, et al. Prevalence and Incidence of Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *Acta Dermato-Venereologica*. 2020;100(12):adv00160. DOI: <https://doi.org/10.2340/00015555-3510>
3. Kern C, Wan J, LeWinn KZ, et al. Association of Atopic Dermatitis and Mental Health Outcomes Across Childhood: A Longitudinal Cohort Study. *JAMA Dermatology*. 2021;157(10):1200-1208. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2021.2657>
4. Nedoszytko B, Reszka E, Gutowska-Owsiak D, et al. Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:6484. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21186484>
5. Martin MJ, Estravís M, García-Sánchez A, et al. Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis: An Updated Systematic Review. *Genes*. 2020;11(4):442. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11040442>
6. Ahn K, Kim BE, Kim J, et al. Recent advances in atopic dermatitis. *Current Opinion in Immunology*. 2020;66:14-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.02.007>
7. Alkotob SS, Cannedy C, Harter K, et al. Advances and novel developments in environmental influences on the development of atopic diseases. *Allergy*. 2020;75(12):3077-3086. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.14624>
8. Hülpmusch C, Weins AB, Traidl-Hoffmann C, et al. A new era of atopic eczema research: Advances and highlights. *Allergy*. 2021;76(11):3408-3421. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.15058>
9. Levine H. Beneath the Skin: Mental Health and Atopic Dermatitis [Internet]. 2023 [cited 2025 March 25]. Available from: <https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/eczema/mental-health-atopic-dermatitis>
10. Mac Giollabhui N, Ng TH, Ellman LM, et al. The longitudinal associations of inflammatory biomarkers and depression revisited: systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Molecular Psychiatry*. 2021;26:3302-3314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00867-4>
11. Boutin RCT, Sbihi H, Dsouza M, et al. Mining the infant gut microbiota for therapeutic targets against atopic disease. *Allergy*. 2020;75(8):2065-2068. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.14244>
12. Toppila-Salmi S, Chanoine S, Karjalainen J, et al. Risk of adult-onset asthma increases with the number of allergic multimorbidities and decreases with age. *Allergy*. 2019;74(12):2406-2416. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.13971>
13. Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *The Lancet*. 2020;396(10274):345-360. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31286-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31286-1)
14. Sroka-Tomaszewska J, Trzeciak M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis

Pathogenesis. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(8):4130. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22084130>

15. Kim J, Kim BE, Leung DYM. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. Allergy and Asthma Proceedings. 2019;40(2):84-92. DOI: <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4202>

16. Murashkin NN, Namazova-Baranova LS, Opratin LA, et al. Biologic Therapy of Moderate and Severe Forms of Atopic Dermatitis in Children. Current Pediatrics. 2020;19(6):432-443. Russ. DOI: <https://doi.org/10.15690/vsp.v19i6.2145>

17. Yosipovitch G, Berger T, Fassett MS. Neuroimmune interactions in chronic itch of atopic dermatitis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2020;34(2):239-250. DOI: <https://doi.org/10.1111/jdv.15973>

18. Venter C, Meyer RW, Nwaru BI, et al. EAACI position paper: Influence of dietary fatty acids on asthma, food allergy, and atopic dermatitis. Allergy. 2019;74(8):1429-1444. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.13764>

19. Torres T, Ferreira EO, Gonçalo M, et al. Update on Atopic Dermatitis. Acta Medica Portuguesa. 2019;32:606-613. DOI: <https://doi.org/10.20344/amp.11963>

20. Bakhtilin VYa, Toropova NP. Bioelectric activity of the brain according to electroencephalography in children with atopic dermatitis. New medical technologies in helping children of the Sverdlovsk region. Sbornik nauchno-prakticheskikh rabot, posvjashhennyh 50-letiju Oblastnoj detskoj klinicheskoy bol'nicy № 1. Ekaterinburg; 2007. Russian.

21. Huang IH, Chung WH, Wu PC, et al. JAK-STAT signaling pathway in the pathogenesis of atopic dermatitis: An updated review. Frontiers in Immunology. 2022;8(13):1068260. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1068260>

22. Silverberg JI. Comorbidities and the impact of atopic dermatitis. Annals of Allergy, Asthma and Immunology. 2019;123:144-151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.04.020>

23. Muzzolon M, Muzzolon SRB, Lima M, et al. Mental disorders and atopic dermatitis in children and adolescents. Advances in Dermatology and Allergology. 2021;38:1099-1104. DOI: <https://doi.org/10.5114/ada.2021.112280>

24. Teixeira C, Garcia MJ, Freitas A, et al. Impact of Atopic Dermatitis on the Mental Health of Adolescents—Literature Review. Medical

Sciences Forum. 2022;16(1):8. DOI: <https://doi.org/10.3390/msf2022016008>

25. Ballardini N, Kramer MS, Oken E, et al. Associations of atopic dermatitis and asthma with child behaviour: results from the PROBIT cohort. Clinical and Experimental Allergy. 2019;49(9):1235-1244. DOI: <https://doi.org/10.1111/cea.13417>

26. Shakoei S, Atefi N, Rohaninasab M, et al. The association between attention-deficit/hyperactivity disorder and Atopic dermatitis: A study among iranian children. Indian Journal of Dermatology. 2019;64:451-455. DOI: https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_458_18

27. Thyssen JP, Hamann CR, Linneberg A, et al. A. Atopic dermatitis is associated with anxiety, depression, and suicidal ideation, but not with psychiatric hospitalization or suicide. Allergy. 2018;73(1):214-220. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.13231>

28. Solomon I, Ilie MA, Draghici C, et al. The impact of lifestyle factors on evolution of atopic dermatitis: An alternative approach. Experimental and Therapeutic Medicine. 2019;17(2):1078-1084. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6980>

29. Sur M, Boca A, Ilies R. Correlation between quality of life and disease severity of pediatric patients with atopic dermatitis. Experimental and Therapeutic Medicine. 2020;20(6):189. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9319>

30. Lada G, Talbot PS, Bewley A, et al. Mental health and dermatology practice in the COVID-19 pandemic. Clinical and Experimental Dermatology. 2020;45(7):816-817. DOI: <https://doi.org/10.1111/ced.14330>

31. Xu X, van Galen LS, Koh MJA, et al. Factors influencing quality of life in children with atopic dermatitis and their caregivers: A cross-sectional study. Scientific Reports. 2019;9:15990. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51129-5>

32. Kyung Y, Lee JS, Lee JH, et al. Health-related behaviors and mental health states of South Korean adolescents with atopic dermatitis. Journal of Dermatology. 2020;47(7):699-706. DOI: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15386>

33. Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. Allergy. 2018;73(6):1284-1293. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.13401>

34. Harter K, Hammel G, Krabiell L, et al. Different Psychosocial Factors Are Associated

with Seasonal and Perennial Allergies in Adults: Cross-Sectional Results of the KORA FF4 Study. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2019;179(4):262-272. DOI: <https://doi.org/10.1159/000499042>

35.Kubanov AA. Organization and results of medical care in the field of dermatovenerology in the Russian Federation. Results of 2018. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2019;95(4):8-23. Russian.

36.Kowalska-Oledzka E, Czarnecka M, Baran A. Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *Journal of Drug Assessment*. 2019;8(1):126-128. DOI: <https://doi.org/10.1080/21556660.2019.1619570>

37.Mortz CG, Andersen KE, Poulsen LK, et al. Atopic diseases and type I sensitization from adolescence to adulthood in an unselected population (TOACS) with focus on predictors for allergic rhinitis. *Allergy*. 2019;74(2):308-317. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.13630>

38.Kruglova LS, Gensler EM. Atopic dermatitis: new horizons of therapy. *Medical alphabet*. 2019;1(7):29-32. Russian. DOI: [https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-1-7\(382\)-29-32](https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-1-7(382)-29-32)

39.Sandhu JK, Wu KK, Bui TL. Association Between Atopic Dermatitis and Suicidality. *JAMA Dermatology*. 2019;155(2):178-187. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.4566>

40.Fishbein AB, Tilley C, Begolka WS, et al. Sleep Disturbance in School-Aged Children with Atopic Dermatitis: Prevalence and Severity in a Cross-Sectional Sample. *Journal of Allergy and Clinical Immunology In Practice*. 2021;9(8):3120-3129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.04.064>

41.Keller W, Vogel M, Prenzel F, et al. Atopic diseases in children and adolescents are associated with behavioural difficulties. *BMC Pediatrics*. 2021;21:197. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12887-021-02663-7>

Received 5 May 2025

Revised 2 June 2025

Accepted 18 June 2025

Information about the authors

Natalya L. Levintova, MD, Psychiatrist, Novourengoy Psychoneurological Dispensary, Novy Urengoy, Russia, E-mail: Levnataleo@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-0317-5078>.

Yulia V. Keniksfest, Doct. Sci. (Medicine), MD, Head of the Department of Chronic Dermatoses for Adults, Leading Researcher, Ural Research Institute of Dermatovenerology and Immunopathology, Yekaterinburg, Russia, E-mail: keniksfest@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8431-5664>.

Konstantin Yu. Retyunskiy, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Professorika Clinic, Yekaterinburg, Russia, E-mail: retiunsk@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1302-483X>.

Alexandra V. Staruseva, MD, Dermatovenerologist, Talitskaya Central Regional Hospital, Talitsa, Russia, E-mail: starusevaav@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1814-1581>.

Victoria V. Ruzhenkova, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Psychiatry, Narcology and Clinical Psychology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: ruzhenkova@bsuedu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0991-2084>.

Inna S. Khamaskaya, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Psychiatry, Narcology and Clinical Psychology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: lukyantseva@bsuedu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8753-1805>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-9

УДК 616.8-009.24-02:618.3/7-008.9-074

Влияние полиморфизмов генов цитокинов на риск развития преэклампсии

Ф.К. Ахмедов¹ , М.М. Рахматуллаева¹ , О.А. Якубова²

¹ Бухарский государственный медицинский институт имени Абу Али ибн Сино,
ул. Гиждуванская, д. 23, г. Бухара, 200126, Республика Узбекистан

² Андижанский государственный медицинский институт,

ул. Атабекова, д. 1, г. Андижан, 170100, Республика Узбекистан

Автор для переписки: М.М. Рахматуллаева (rahmatullayeva.mahfuza@bsmi.uz)

Резюме

Актуальность: Преэклампсия представляет собой мультисистемное расстройство, в основе которого лежит плацентарная и эндотелиальная дисфункция, приводящая к гипертензии и другим повреждениям органов и систем во время беременности и является основной причиной материнской смертности. Предполагают, что риск развития преэклампсии формируется еще в первые недели беременности, включая инвазию трофобласта, перестройку спиральных артерий эндометрия и иммунную дезадаптацию. В связи с чем, выявление иммунологических и генетических маркеров, предсказывающих преэклампсию на доклиническом этапе, представляет значительный клинический интерес. **Цель исследования:** Определить значение полиморфизмов rs1143627 (T-31C) гена *IL-1β*, rs1800629 (G-308A) гена *TNFα* и rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* в прогнозировании риска преэклампсии. **Материалы и методы:** В исследование включены 231 женщин в сроке беременности 16-28 недель. 1-группу (n=71) составили женщины во II триместре гестации с риском развития преэклампсии; 2-группу (n=50) – пациентки в III триместре гестации с развившейся преэклампсией; контрольную группу (n=50) – с физиологическим течением беременности. Исследованы гематологические и гемостазиологические показатели, концентрация цитокинов *IL-1β*, *TNFα* и *IL-10* в крови. Генотипирование полиморфизмов rs1143627 (T-31C) гена *IL-1β*, rs1800629 (G-308A) гена *TNFα* и rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты:** Аллель С гена *IL-1β* (T-31C) чаще встречался в 1-й группе (OR=1,6; 95% CI: 1,07-2,49; p=0,02) по сравнению с контролем (41,4%). Ввиду низкой доли мутантного аллеля А и отсутствия генотипа А/А гена *TNFα* (G-308A) среди лиц узбекской национальности связь данного маркера с риском преэклампсии не подтверждена. Но высокое содержание *TNFα* в крови у женщин с генотипом G/A 1-й и 2-й групп (p<0,001) указывает на ассоциацию аллеля А данного полиморфизма с гипертензивными нарушениями. Риск развития преэклампсии значимо повышается у носителей низкофункционального генотипа А/А гена *IL-10* (A-1082G) (OR=16,5; 95% CI: 7,78-34,97; p=0,01). **Заключение:** Аллель С rs1143627 (T-31C) гена *IL-1β*, аллель А и генотип А/А rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* связаны с повышением риска преэклампсии и могут быть использованы в качестве генетических предикторов заболевания.

Ключевые слова: преэклампсия; цитокины; полиморфизмы генов; *IL-1β*; *TNFα*; *IL-10*

Для цитирования: Ахмедов ФК, Рахматуллаева ММ, Якубова ОА. Влияние полиморфизмов генов цитокинов на риск развития преэклампсии. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(4):709-726. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-9

Effect of cytokine gene polymorphisms on the risk of preeclampsia

Farkhod K. Akhmedov¹ , Makhfuza M. Rakhmatullaeva¹ ,
Oltinoy A. Yakubova² 

¹ Bukhara State Medical Institute,
23 Gijduvan St., Bukhara, 200126, Uzbekistan

² Andijan State Medical Institute,
1 Atabekova St., Andijan, 170100, Uzbekistan

Corresponding author: Makhfuza M. Rakhmatullaeva (rahmatullayeva.mahfuza@bsmi.uz)

Abstract

Background: Preeclampsia is a multisystem disorder based on placental and endothelial dysfunction, leading to hypertension and other damage to organs and systems during pregnancy and is the leading cause of maternal mortality. It is assumed that the risk of developing preeclampsia is formed in the first weeks of pregnancy, including trophoblast invasion, endometrial spiral artery remodeling, and immune maladaptation. Therefore, the identification of immunological and genetic markers predicting preeclampsia at the preclinical stage is of significant clinical interest. **The aim of the study:** To determine the significance of polymorphisms rs1143627 (T-31C) of the *IL-1 β* gene, rs1800629 (G-308A) of the *TNFA* gene and rs1800896 (A-1082G) of the *IL-10* gene in predicting the risk of preeclampsia. **Materials and methods:** The study included 231 women who were 16-28 weeks pregnant. Group 1 (n=71) consisted of women in the second trimester of gestation at risk of developing preeclampsia; group 2 (n=50) – patients in the third trimester of gestation with preeclampsia; control group (n=50) – women with the physiological course of pregnancy. Hematological and hemostasis parameters, the concentration of cytokines IL-1b, TNFa and IL-10 in the blood were studied. Polymorphisms rs1143627 (T-31C) of the *IL-1 β* gene, rs1800629 (G-308A) of the *TNFA* gene, and rs1800896 (A-1082G) of the *IL-10* gene were genotyped using real-time polymerase chain reaction. **Results:** The C allele of the *IL-1 β* (T-31C) gene was more common in group 1 (OR=1.6; 95% CI: 1.07-2.49; p=0.02) compared with the control (41.4%). Due to the low proportion of mutant allele A and the absence of genotype A/A of the *TNFA* gene (G-308A) in Uzbek people, the association of this marker with the risk of preeclampsia has not been confirmed. However, the high TNFa content in the blood of women with G/A genotypes of groups 1 and 2 (p<0.001) indicates the association of the A allele of this polymorphism with hypertensive disorders. The risk of developing preeclampsia is significantly increased in carriers of the low-functional genotype A/A of the *IL-10* gene (A-1082 G) (OR=16.5; 95% CI: 7.78-34.97; p=0.01). **Conclusion:** Allele C rs1143627 (T-31C) of the *IL-1 β* gene, allele A and genotype A/A rs1800896 (A-1082G) of the *IL-10* gene are associated with an increased risk of preeclampsia and can be used as genetic predictors of the disease.

Keywords: preeclampsia; cytokines; gene polymorphisms *IL-1 β* ; *TNFA*; *IL-10*

For citation: Akhmedov FK, Rakhmatullaeva MM, Yakubova OA. Effect of cytokine gene polymorphisms on the risk of preeclampsia. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):709-726. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-0-9

Введение. Рост акушерских заболеваний в мире становится проблемой не только медицинского, но и социального значения, в том числе осложнения при преэклампсии считаются одними из самыми сложными и тяжелыми в современной акушерской практике, а предотвращение, обусловленной ими материнской смертности, является одним из важных задач современного акушерства. Преэклампсия, характеризующаяся гестационной гипертензией и протеинурией, является серьезным осложнением, которое встречается в 5-8% случаев всех беременностей во всем мире [1]. Несмотря на то, что данная патология анализируется в течение долгих лет, проведенные исследования предоставили ограниченную информацию для прогнозирования преэклампсии.

Проблема ранней диагностики, родоразрешения и лечения беременных с преэклампсией находит отражение в работах ряда исследователей. Определена важность роли плаценты в патогенезе преэклампсии, которая включает атеросклероз сосудов плаценты, склеротическое сужение артерий и артериол, образование очагов фибрина и инфарктов, что приводит к гипоперфузии и ишемии плаценты, в результате чего повышается риск развития преэклампсии [2, 3]. У беременных с риском развития преэклампсии наблюдается дисбаланс уровней растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt-1) и плацентарного фактора роста (PlGF) с 10-й недели беременности, а со II триместра беременности начинают проявляться клинические признаки преэклампсии [4, 5]. Определена важная роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе преэклампсии. В результате дисфункции sFlt-1, PlGF, D-димера и интерлейкина (IL)-1 β эндотелиальные клетки продуцируют прокоагулянты, вазоконстрикторы и факторы роста [6, 7], что приводит к увеличению тромбогенного потенциала стенок кровеносных сосудов [8, 9]. При преэклампсии поверхностная инвазия

трофобласта приводит к неадекватной трансформации спиральных артерий матки, в результате чего возникает неправильное распределение крови, с последующим нарушением кровообращения в плаценте, ее ишемией [10], оксидативным стрессом [11, 12], повышенной чувствительностью эндотелиальных клеток к sFlt-1, а повышенный уровень провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли- α (TNF α), обусловленный эндотелиальной дисфункцией вызывает мультисистемные повреждения в организме матери [13]. Увеличение количества sFlt-1, TNF α , IL-1 β следует интерпретировать, как фактор высокого риска развития эндотелиальной дисфункции и преэклампсии.

Считается, что в патогенез преэклампсии вовлечены как врожденные, так и приобретенные иммунные процессы и предполагается, что Th1-иммунный ответ способствует патологической плацентации и усилению воспалительной реакции и эндотелиальной дисфункции, наблюдаемых при преэклампсии [14]. Имеются сообщения, указывающие на чрезмерную врожденную иммунную активность и изменение в сторону провоспалительного профиля цитокинов при преэклампсии. Например, у пациенток с преэклампсией наблюдаются высокие уровни Th1-цитокинов, TNF α и интерферона- γ (IFN- γ) и низкая продукция IL-4, стимулированных фитогемагглютинином мононуклеарных клеток периферической крови [15, 16]. Кроме того, в плаценте отмечается подавление продукции IL-10 [17], трансформирующего фактора роста β -рецептора 1 (TGF- β 1) [7] и измененные соотношения IL-2, IL-2/IL-10 и TNF α /IL-10 [17, 18]. Преэклампсия также связана с увеличением количества клеток Th17, секретирующих IL-17 и играющих важную роль в развитии заболевания [19].

Важно отметить, что продукция цитокинов в определенной мере зависит от наличия полиморфизма их генов. Наличие высоко- или низкопродуцирующих генов-кандидатов могут влиять на установление

адекватного иммунного фона в системе мать-плацента-плод. Несмотря на значительные успехи в области молекулярно-генетической основы преэклампсии, она остается сложной патологией. Результаты исследований по ассоциации полиморфизмов генов про- и противовоспалительных цитокинов с риском развития преэклампсии разнонаправленные, что возможно связано с различием в этнических группах, гетерогенностью преэклампсии и включением в исследование с учетом разных патологических механизмов, критерием отбора больных [20, 21]. Следует отметить, что среди лиц узбекской национальности исследования по выявлению молекулярно-генетических маркеров преэклампсии не проводились. Продолжение исследований, интегрирующих геномные, эпигеномные и клинические данные, имеет решающее значение для выявления факторов, способствующих ее развитию и прогрессированию. Полученные данные могут улучшить стратификацию риска, раннее выявление и целевые терапевтические вмешательства, снижая бремя этого значительного акушерского осложнения. В связи с чем, определение молекулярно-генетических предикторов развития преэклампсии имеет особое значение в прогнозировании риска развития данной патологии на ранних этапах беременности.

Цель исследования. Определить значение полиморфизмов *rs1143627 (T-31C) гена IL-1 β* , *rs1800629 (G-308A) гена TNF α* и *rs1800896 (A-1082G) гена IL-10* в прогнозировании риска преэклампсии.

Материал и методы исследования. В исследовании приняли участие 231 женщин узбекской национальности в возрасте от 19 до 42 лет в сроке беременности от 16 до 28 недель. Основную группу составили 121 беременных женщин: 1-группа (n=71) – женщины во II триместре гестации с риском развития преэклампсии (имеющих в анамнезе преэклампсию); 2-группа (n=50)

– женщины в III триместре гестации с клиническими проявлениями преэклампсии. Контрольную группу составили 110 женщин с физиологически протекающей беременностью. В соответствии с принципами Хельсинской декларации от каждого участника исследования получено информированное согласие и заполненная анкета, утвержденные Этическим комитетом Бухарского государственного медицинского института (протокол №9 от 30 марта 2021 года).

Изучали клинико-анамнестические данные, гематологические (общий анализ крови) и гемостазиологические показатели (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПТИ), Международное нормализованное отношение (МНО), фибриноген, D-димер) крови. Концентрацию цитокинов IL-1 β , TNF α и IL-10 в крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Выбранные полиморфные локусы *rs1143627 (T-31C) гена IL-1 β* , *rs1800629 (G-308A) гена TNF α* и *rs1800896 (A-1082G) гена IL-10* наиболее часто анализируются в научной литературе, и, располагаясь в промоторной области генов тесно связаны с изменениями транскрипционной активности и уровнями цитокинов в крови [22, 23, 24]. Для исследования вышеуказанных полиморфизмов применен метод полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Материалом для молекулярно-генетических исследований послужила цельная кровь, полученная из локтевой вены пациентки, которую помещали в вакуумные пробирки Vacuette 4,0 мл с содержанием антикоагулянта динатриевой соли этилендиамин-тетраацетата. Для выделения ДНК из цельной крови использовали наборы реагентов «Проба-Рapid-Генетика» ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия). Детекцию результатов анализа проводили на

амплификаторе «ДТпрайм» ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия). Для анализа полиморфного участка гена IL-1 β использована пара олигонуклеотидных праймеров (F) 5'-CCCCTTTCSTTTAACTTGATTGTG-3' и (R) 5'-AGGTTTGGTATCTGCCAGTTTCTC-3'; для гена TNF α – (F) 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' и (R) 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'; для гена IL-10 (F) 5'-CACAATCCAAGACAACAATACT-3' и (R) 5'-GATAGGAGGTCCCTTACTTTCC-3'. Температура отжига праймеров – 60°C. Подбор праймеров проведен с помощью онлайн-программы от NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Статистический анализ полученных данных проведен с помощью статистического пакета прикладных программ «Statistica 10.0», статистического программного приложения Epi Info 7.2.2.2 и Программного модуля «Расчет доверительного интервала частоты и доли фактора в медицинских исследованиях» (Stud%). Вариационными параметрическими и непараметрическими методами статистики рассчитывали среднее арифметическое значение (M), среднее квадратическое отклонение (σ), стандартную ошибку среднего (m), относительные величины (частота, %) изучаемого показателя, статистическую величину полученных измерений – нормальность распределения по критерию эксцесса и равенства главных дисперсий (критерий Фишера), а вероятность ошибки (p) – по критерию Стьюдента (t).

Проведен анализ соответствия полученных частот генотипов ожидаемым значениям с учетом равновесия Харди-Вайнберга, далее сравнение распределения аллелей и генотипов между группами с использованием коррективы Бонферрони для множественных сравнений. При статистических расчетах использован критерий χ^2 (с поправкой Йейтса) и отношение шансов (OR – odds

ratio) с 95% доверительным интервалом (95% CI – confidence interval). Значимыми приняты показатели с уровнем достоверности $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение.

Возраст наблюдаемых женщин составил $27,2 \pm 0,9$ лет в основной группе и $25,7 \pm 0,7$ лет в контрольной группе ($p > 0,05$). Беременные в возрасте 31-35 лет практически в два раза чаще регистрировались в основной группе ($p > 0,05$), 36-40 лет – только в основной группе (Табл. 1). Анализ профессиональной принадлежности женщин показал, что наибольший контингент среди них составили служащие (47,9%) и рабочие (32,2%) в основной группе, служащие (39,1%) и безработные (домохозяйки) (28,2%) – в контрольной группе ($p > 0,05$). В основной группе в 2 раза реже отмечены показатели нормального индекса массы тела (ИМТ) ($p < 0,01$), а количество пациенток с ожирением легкой степени было значительно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). По количеству беременностей и репродуктивным исходам исследуемые группы существенно не отличались ($p > 0,05$). Вместе с тем, отмечается повышение частоты встречаемости преждевременных родов в 1-й ($p > 0,05$) и 2-й ($p > 0,001$) группах по сравнению с контрольной группой.

Соматические заболевания являются серьезным фактором риска и неблагоприятным фоном для развития осложнений беременности. Наиболее часто встречаемой соматической патологией явилась железодефицитная анемия различной степени тяжести среди женщин исследуемых групп. Частота ее была значительно высокой у женщин с развившейся преэклампсией по сравнению с контролем ($p > 0,001$). Заболевания мочевыделительной системы в анамнезе чаще регистрировались в основной группе, при этом данная патология встречалась почти у каждой пятой женщины 2-й группы и была значительно выше, чем в контрольной группе ($p > 0,001$). Следует

отметить, что в анамнезе женщин основной группы чаще отмечалось заболеваемость инфекционно-воспалительной патологией половых органов, но различия в сравнении с контрольными данными не были статистически значимыми ($p>0,05$).

Показатель артериального давления в

момент исследования составил $120,27 \pm 1,9/81,03 \pm 1,6$ мм рт. ст. в 1-й группе, $138,69 \pm 2,4/96,57 \pm 2,8$ мм рт. ст. – во 2-й группе и $113,06 \pm 1,7/80,46 \pm 1,3$ мм рт. ст. – в контрольной группе. Протеинурия выше 0,033 г/л присутствовала только во 2-й группе.

Таблица 1 (начало)

Основные клиничко-анамнестические данные женщин исследуемых групп

Beginning of Table 1

Basic clinical and anamnestic data of women in the study groups

Показатели	Основная группа				Контрольная группа (n=110)	
	1-группа (n=71)		2-группа (n=50)			
	абс	%	абс	%	абс	%
<i>Возраст (лет)</i>						
18-25	12	16,9	13	26,0	32	29,1
26-30	40	56,3	24	48,0	65	59,1
31-35	16	22,5	9	18,0	13	11,8
36-40	3	4,2	4	8,0	0	0,0
<i>Социальный статус</i>						
Служащие	33	46,5	25	50,0	43	39,1
Рабочие	23	32,4	15	30,0	29	26,4
Учащиеся	1	1,4	3	6,0	7	6,3
Домохозяйки	14	24,0	7	14,0	31	28,2
<i>Индекс массы тела при постановке на учет</i>						
18,5-25	17	23,9**	8	16,0***	49	44,6
25-30	32	45,1	29	58,0	59	53,6
30-35	22	31,0***	13	26,0***	2	1,8
<i>Количество беременностей</i>						
1	0	0,0	14	28,0	34	30,9
2	43	60,6	24	48,0	45	40,9
3 и более	28	39,4	12	24,0	31	28,2
<i>Количество родов</i>						
0	0	0,0	14	28,0	34	30,9
1	47	66,2	20	40,0	48	43,6
2 и более	24	33,8	16	32,0	28	25,5
<i>Аборты (самопроизвольный)</i>						
1	4	5,6	4	8,0	3	2,7
2 и более	1	1,4	2	4,0	0	0,0
<i>Аборты (артифициальный)</i>						
1	3	4,2	2	4,0	2	1,8
2 и более	0	0,0	1	2,0	1	0,9
Преждевременные роды	7	9,9*	6	12,0*	3	2,7
Оперативные роды	10	14,1	5	10,0	7	6,4
Перинатальная смертность	2	2,8	1	2,0	1	0,9
<i>Сопутствующие/перенесенные соматические заболевания</i>						
Железодефицитная анемия	52	73,2	46	92,0*	69	62,7
Заболевания сердечно-сосудистой системы (ревматизм, варикозная болезнь)	3	4,2	2	4,0	2	1,8
Заболевания органов пищеварения (гастрит, язвенная болезнь 12-перстной кишки, холецистит)	5	7,0	3	6,0	2	1,8
Заболевания мочевыделительной системы (цистит, пиелонефрит)	7	9,9	9	18,0*	1	0,9
Заболевания дыхательной системы (бронхит)	2	2,8	1	2,0	0	0,0
Заболевания ЛОР-органов (тонзиллит, синусит)	6	8,4	7	14,0	6	5,5

Таблица 1 (окончание)

Основные клинико-anamnestические данные женщин исследуемых групп

End of Table 1

Basic clinical and anamnestic data of women in the study groups

Показатели	Основная группа				Контрольная группа (n=110)	
	1-группа (n=71)		2-группа (n=50)			
	абс	%	абс	%	абс	%
Заболевания эндокринной системы (эутиреоидный зоб)	8	11,3	3	6,0	5	4,5
ОРВИ во время беременности	4	5,6	2	4,0	4	3,6
Сопутствующие/перенесенные гинекологические заболевания						
ВЗОМТ	3	4,2	2	4,0	2	1,8
Неспецифический вульвовагинит	9	12,7	8	16,0	8	7,3
Фоновые и предраковые заболевания шейки матки	3	4,2	1	2,0	0	0,0
ИППП в анамнезе (трихомониаз, генитальный герпес)	5	7,0	2	4,0	3	2,7
Доброкачественные новообразования половых органов (миома матки, киста яичника)	1	1,4	0	0,0	0	0,0
Доброкачественные заболевания молочных желез	0	0,0	1	2,0	2	1,8

Примечание: * – различия достоверны относительно контрольной группы (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$).
Note: * – differences are reliable with respect to the control group (* – $p<0.05$; ** – $p<0.01$; *** – $p<0.001$).

Исследования показали статистически значимое снижение количества гемоглобина и числа эритроцитов и тенденцию к снижению

цветового показателя у женщин основной группы ($p<0,01$) (Табл. 2). Такие изменения свидетельствуют о развитии анемии у беременных.

Таблица 2

Гематологические и гемостазиологические показатели у женщин исследуемых групп

Table 2

Hematological and hemostasis parameters in women of the studied groups

Показатели	Основная группа		Контрольная группа (n=110)
	1-группа (n=71)	2-группа (n=50)	
Гемоглобин, г/л	99,45±1,96***	93,62±1,02***	112,5±1,42
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,15±0,07**	2,99±0,03***	3,92±0,06
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,96±0,13**	7,38±0,10***	5,58±0,12
Цветовой показатель	0,93±0,01**	0,90±0,02**	0,99±0,02
СОЭ, мм/ч	17,4±0,93***	22,2±0,87***	10,38±0,66
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	200,61±3,1***	189,7±1,4***	286,38±11,6
Гематокрит, %	37,9±5,78	29,6±0,31*	38,0±0,33
АЧТВ, сек	23,61±0,69***	20,53±0,57***	36,62±0,25
ПТИ, %	98,62±1,27***	102,31±1,24***	93,48±0,54
МНО	0,95±0,01**	0,98±0,02***	0,86±0,03
Фибриноген, г/л	5,16±0,12***	6,13±0,14***	2,98±0,03
D-димер	1305,4±50,5***	1763,9±21,8***	613,6±30,7

Примечание: * – различия достоверны относительно контрольной группы (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$).
Note: * – differences are reliable with respect to the control group (* – $p<0.05$; ** – $p<0.01$; *** – $p<0.001$).

Особенно выраженные изменения наблюдались у беременных 2-й группы. Увеличение числа лейкоцитов и повышение СОЭ у женщин основной группы указывает на присутствие

воспалительного компонента при развитии преэклампсии. Выявлено снижение числа тромбоцитарных клеток, укорочение АЧТВ, повышение ПТИ, МНО, содержания фибриногена и увеличение показателя D-

димера. Полученные результаты показали наличие отчетливого гиперкоагуляционного сдвига плазменного гемостаза у беременных с риском преэклампсии и развившейся преэклампсией. Определение уровня D-димера в плазме крови может быть использовано для прогнозирования риска осложнений беременности при преэклампсии, так как его изменения свидетельствуют о развитии стаза в системе микроциркуляции мать-плацента-плод.

Изучено частотное распределение

аллелей и генотипов полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена *IL-1 β* , rs1800629 (G-308A) гена *TNF α* и rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* в группах беременных женщин с риском развития преэклампсии, осложненной преэклампсией и физиологическим течением беременности. Доля мутантного аллеля С гена *IL-1 β* (T-31C) была выше в основной группе, тогда как в контрольной группе была высокой доля аллеля Т. И в основной, и в контрольной группах чаще выявлялся генотип Т/С гена *IL-1 β* (T-31C) (Рис. 1).

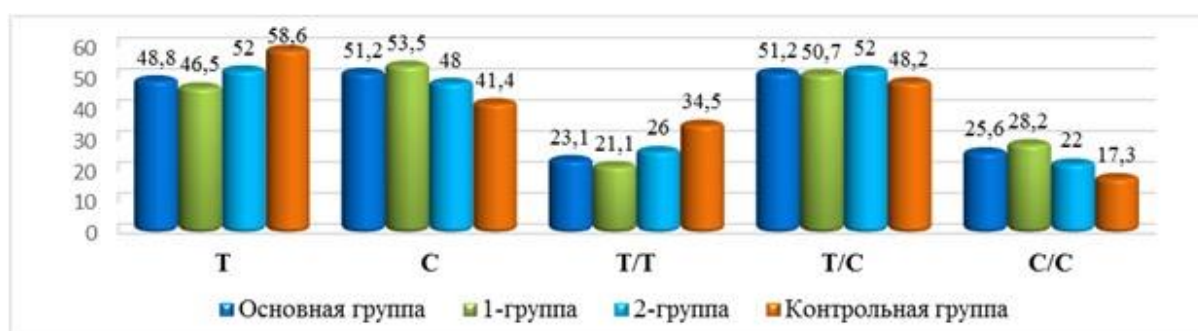


Рис. 1. Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена *IL-1 β* (%)

Fig. 1. Frequency of occurrence of alleles and genotypes of polymorphism rs1143627 (T-31C) of the *IL-1 β* gene (%)

Анализ распределения аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма в исследуемых группах выявил следующие особенности (Табл. 3). Наблюдалась значительная статистическая разница в частоте встречаемости аллелей между беременными женщинами с риском преэклампсии и здоровыми беременными. Аллель С достоверно чаще встречался в основной (51,2%; $\chi^2=4,5$; $p=0,05$; OR=1,5; 95% CI: 1,03-2,15) и 1-й группах (53,5%; $\chi^2=5,1$; $p=0,02$; OR=1,6; 95% CI: 1,07-2,49) по сравнению с контролем (41,4%). Аллель Т достоверно чаще встречался в контрольной группе (58,6% против 48,8% в основной группе; $\chi^2=4,5$; $p=0,05$; OR=0,7; 95% CI: 0,46-0,97).

Несмотря на преобладание гетерозиготного генотипа Т/С и мутантного генотипа С/С в основной группе (51,2% и 25,6%; в 1-й группе – 50,7% и 28,2%; во 2-й группе – 52,0% и 22,0%) относительно контрольной выборки (48,2% и 17,3% соответственно), выявленные различия не были статистически значимыми ($p>0,05$). Вместе с тем, шансы развития преэклампсии при носительстве генотипа С/С возрастали в основной группе (OR от 1,4 до 1,9) ($p>0,05$). Различия в частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена *IL-1 β* между 1-й и 2-й группами не были статистически значимыми ($p>0,05$).

Таблица 3

Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена *IL-1 β* между группами

Table 3

Comparative analysis of the distribution of alleles and genotypes of polymorphism rs1143627 (T-31C) of the *IL-1 β* gene between groups

Аллели/генотипы	Основная группа (n=121)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
T	118	48,8	129	58,6	4,5	0,05	0,7	0,46 - 0,97
C	124	51,2	91	41,4			1,5	1,03 - 2,15
T/T	28	23,1	38	34,5	3,7	0,10	0,6	0,32 - 1,01
T/C	62	51,2	53	48,2	0,2	0,70	1,1	0,67 - 1,89
C/C	31	25,6	19	17,3	2,4	0,20	1,6	0,87 - 3,12
Аллели/генотипы	1-группа (n=71)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
T	66	46,5	129	58,6	5,1	0,02	0,6	0,40 - 0,94
C	76	53,5	91	41,4			1,6	1,07 - 2,49
T/T	15	21,1	38	34,5	3,8	0,10	0,5	0,26 - 1,01
T/C	36	50,7	53	48,2	0,1	0,80	1,1	0,61 - 2,01
C/C	20	28,2	19	17,3	3,0	0,10	1,9	0,92 - 3,82
Аллели/генотипы	2-группа (n=50)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
T	52	52,0	129	58,6	1,2	0,30	0,8	0,48 - 1,23
C	48	48,0	91	41,4			1,3	0,81 - 2,10
T/T	13	26,0	38	34,5	1,2	0,30	0,7	0,32 - 1,40
T/C	26	52,0	53	48,2	0,2	0,70	1,2	0,60 - 2,27
C/C	11	22,0	19	17,3	0,5	0,50	1,4	0,59 - 3,10
Аллели/генотипы	1-группа (n=71)		2-группа (n=50)		χ^2	p	OR	95% CI
T	66	46,5	52	52,0	0,7	0,40	0,8	0,48 - 1,34
C	76	53,5	48	48,0			1,2	0,75 - 2,08
T/T	15	21,1	13	26,0	0,4	0,60	0,8	0,33 - 1,78
T/C	36	50,7	26	52,0	0,0	0,90	0,9	0,46 - 1,96
C/C	20	28,2	11	22,0	0,6	0,50	1,4	0,60 - 3,23

Распределение генотипов локуса rs1800629 (G-308A) гена *TNF α* в группах соответственно уравнению Харди-Вайнберга показало, что генотип A/A полностью отсутствовал среди лиц узбекской национальности. При изучении распределения аллелей гена *TNF α* установлено, что дикий аллель G

практически доминировал и в основной (90,5%), и в контрольной группах (94,1%). Доля мутантного аллеля A была крайне низкой во всех исследуемых группах. Генотип G/G несколько чаще выявлялся в контрольной группе, а генотип G/A в основной (Рис. 2).

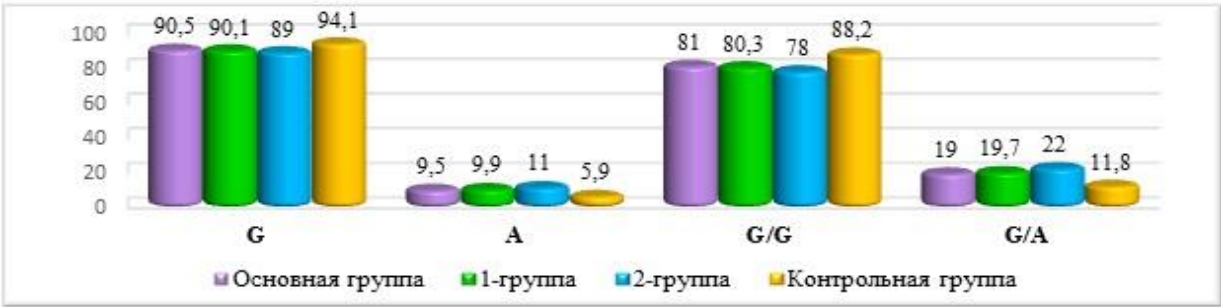


Рис. 2. Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена *TNF α* (%)

Fig. 2. Frequency of occurrence of alleles and genotypes of polymorphism rs1800629 (G-308A) of the *TNF α* gene (%)

Статистический анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена *TNFA* в исследуемых группах не выявил достоверных отличий между группами (Табл. 4). При этом отношение шансов для гетерозиготного генотипа G/A возросло

практически в 2 раза (OR=1,8-2,1; $p>0,05$) в основной (и 1-й и 2-й группах) группе, указывая на его возможную роль как генетического предиктора развития преэклампсии у лиц узбекской национальности.

Таблица 4

Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена *TNFA* между группами

Table 4

Comparative analysis of the distribution of alleles and genotypes of polymorphism rs1800629 (G-308A) of the *TNFA* gene between groups

Аллели/генотипы	Основная группа (n=121)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
G	219	90,5	207	94,1	2,1	0,20	0,6	0,30 - 1,20
A	23	9,5	13	5,9			1,7	0,83 - 3,37
G/G	98	81,0	97	88,2	2,3	0,20	0,6	0,28 - 1,18
G/A	23	19,0	13	11,8	2,3	0,20	1,8	0,84 - 3,63
Аллели/генотипы	1-группа (n=71)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
G	128	90,1	207	94,1	2,0	0,20	0,6	0,26 - 1,25
A	14	9,9	13	5,9			1,7	0,80 - 3,79
G/G	57	80,3	97	88,2	2,1	0,20	0,5	0,24 - 1,23
G/A	14	19,7	13	11,8	2,1	0,20	1,8	0,81 - 4,14
Аллели/генотипы	2-группа (n=50)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
G	89	89,0	207	94,1	2,6	0,20	0,5	0,22 - 1,16
A	11	11,0	13	5,9			2,0	0,86 - 4,50
G/G	39	78,0	97	88,2	2,8	0,10	0,5	0,20 - 1,14
G/A	11	22,0	13	11,8	2,8	0,10	2,1	0,88 - 5,04
Аллели/генотипы	1-группа (n=71)		2-группа (n=50)		χ^2	p	OR	95% CI
G	128	90,1	89	89,0	0,1	0,80	1,1	0,49 - 2,60
A	14	9,9	11	11,0			0,9	0,38 - 2,04
G/G	57	80,3	39	78,0	0,1	0,80	1,1	0,47 - 2,79
G/A	14	19,7	11	22,0	0,1	0,80	0,9	0,36 - 2,12

Наиболее распространенным аллелем и генотипом полиморфизма rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* в основной (1-й и 2-й группах) группе стали низкофункциональный аллель A и его гомозиготный вариант

A/A. В контрольной группе в более чем два раза чаще выявлялся полиморфный аллель G (75,9% против 31,8% в основной группе) и генотип G/G (57,3% против 12,4% в основной группе) (Рис. 3).

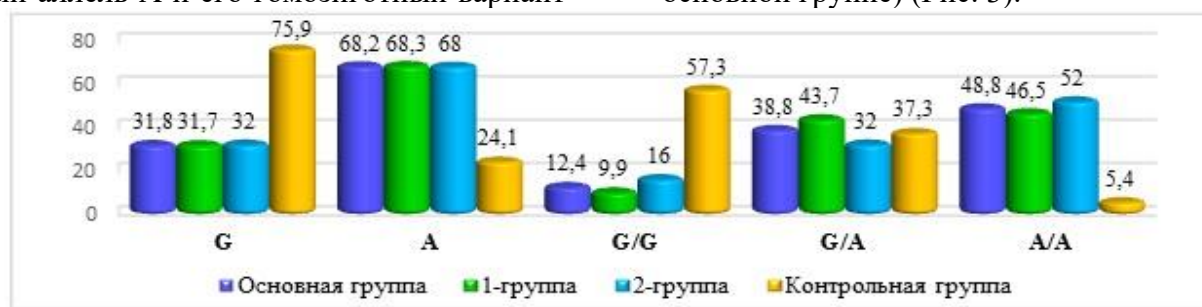


Рис. 3. Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* (%)

Fig. 3. Frequency of occurrence of alleles and genotypes of polymorphism rs1800896 (A-1082G) of the *IL-10* gene (%)

Сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма в исследуемых группах выявил ряд существенных различий (Табл. 5). Аллель А достоверно преобладал в основной (68,2%; $\chi^2=89,9$; $p=0,01$; OR=6,8; 95% CI: 4,55-10,02), 1-й (68,3%; $\chi^2=69,5$; $p=0,01$; OR=6,8; 95% CI: 4,33-10,66) и 2-й группах (68,0%; $\chi^2=56,4$; $p=0,01$; OR=6,7; 95% CI: 4,08-11,01) по сравнению с контролем (24,1%). А частота встречаемости аллеля G была статистически значимо высокой в контрольной выборке (75,9%; $\chi^2=89,9$; $p=0,01$; OR=0,1; 95% CI: 0,10-0,22), чем в основной (1-й и 2-й) группе.

Шансы развития преэклампсии многократно повышаются при носительстве генотипа A/A для основной (48,8%; $\chi^2=53,4$; $p=0,01$; OR=16,5; 95% CI: 7,78-34,97), 1-й (46,5%; $\chi^2=43,0$; $p=0,01$; OR=15,1; 95% CI: 6,69-33,87) и 2-й (52,0%; $\chi^2=46,5$; $p=0,01$; OR=18,8; 95% CI: 8,09-43,61) групп. Для контрольной выборки характерным являлась значимо высокая встречаемость генотипа G/G (57,3%; $\chi^2=51,9$; $p=0,01$; OR=0,1; 95% CI: 0,06-0,19), что указывает на его возможно протективную роль в отношении развития преэклампсии.

Таблица 5

Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма rs1800896 (A-1082G) гена IL-10 между группами

Table 5

Comparative analysis of the distribution of alleles and genotypes of polymorphism rs1800896 (A-1082G) of the IL-10 gene between groups

Аллели/генотипы	Основная группа (n=121)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
G	77	31,8	167	75,9	89,9	0,01	0,1	0,10 - 0,22
A	165	68,2	53	24,1			6,8	4,55 - 10,02
G/G	15	12,4	63	57,3	51,9	0,01	0,1	0,06 - 0,19
G/A	47	38,8	41	37,3	0,1	0,90	1,1	0,63 - 1,82
A/A	59	48,8	6	5,5	53,4	0,01	16,5	7,78 - 34,97
Аллели/генотипы	1-группа (n=71)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
G	45	31,7	167	75,9	69,5	0,01	0,1	0,09 - 0,23
A	97	68,3	53	24,1			6,8	4,33 - 10,66
G/G	7	9,9	63	57,3	40,9	0,01	0,1	0,04 - 0,18
G/A	31	43,7	41	37,3	0,7	0,40	1,3	0,71 - 2,39
A/A	33	46,5	6	5,5	43,0	0,01	15,1	6,69 - 33,87
Аллели/генотипы	2-группа (n=50)		Контроль (n=110)		χ^2	p	OR	95% CI
G	32	32,0	167	75,9	56,4	0,01	0,1	0,09 - 0,25
A	68	68,0	53	24,1			6,7	4,08 - 11,01
G/G	8	16,0	63	57,3	23,7	0,01	0,1	0,06 - 0,31
G/A	16	32,0	41	37,3	0,4	0,60	0,8	0,39 - 1,61
A/A	26	52,0	6	5,5	46,5	0,01	18,8	8,09 - 43,61
Аллели/генотипы	1-группа (n=71)		2-группа (n=50)		χ^2	p	OR	95% CI
G	45	31,7	32	32,0	0,0	0,97	1,0	0,57 - 1,71
A	97	68,3	68	68,0			1,0	0,59 - 1,76
G/G	7	9,9	8	16,0	1,0	0,40	0,6	0,20 - 1,69
G/A	31	43,7	16	32,0	1,7	0,20	1,6	0,77 - 3,50
A/A	33	46,5	26	52,0	0,4	0,60	0,8	0,39 - 1,65

Таким образом, полученные нами данные показывают, что аллель С полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена IL-1 β , аллель А и гомозиготный генотип А/А полиморфизма rs1800896 (A-1082G) гена

IL-10 достоверно связаны с повышением риска развития преэклампсии во время беременности.

Анализ ассоциаций между полиморфизмами генов цитокинов IL-1 β ,

TNFα и *IL-10* и содержанием соответствующих цитокинов в крови выявил значимые различия в уровне экспрессии гена в зависимости от наличия генотипов в исследуемых группах (Табл. 6). Как видно из представленных данных, концентрация *IL-1β* в крови была значительно высокой у носителей генотипа *C/C* полиморфизма *rs1143627* (*T-31C*) гена *IL-1β*, как в 1-й, так и 2-й группах, при этом различия более резко проявились во 2-й группе ($p < 0,001$). Содержание *TNFα* в крови было наиболее высоким у женщин с генотипом *G/A* полиморфизма *rs1800629* (*G-308A*) гена *TNFα* в группе с развившейся преэклампсией ($p < 0,001$). Несмотря на

активацию провоспалительного звена иммунитета у женщин основной группы нами выявлено снижение продукции противовоспалительного цитокина *IL-10* с заметным проявлением у женщин с генотипом *A/A* соответствующего гена ($p < 0,05$). Такой выраженный дисбаланс *Th1/Th2* уровня цитокинов может приводить к системной воспалительной реакции, что во время беременности может провоцировать эндотелиальную дисфункцию с последующим нарастанием гемодинамических нарушений в системе маточно-плацентарно-плодового кровообращения.

Таблица 6

Концентрация цитокинов в крови женщин в зависимости от генотипов соответствующих полиморфизмов

Table 6

The concentration of cytokines in the blood of women, depending on the genotypes of the corresponding polymorphisms

Генотипы/Концентрация цитокина	1-группа	2-группа	Контроль
Полиморфизм <i>rs1143627</i> (<i>T-31C</i>) гена <i>IL-1β</i>			
T/T	6,18±1,95	14,46±2,28***^	3,25±0,41
T/C	10,39±2,16*	19,08±1,44***^^	4,31±0,37
C/C	13,52±2,68*	23,37±1,45***^^	6,42±0,84
Полиморфизм <i>rs1800629</i> (<i>G-308A</i>) гена <i>TNFα</i>			
G/G	8,22±1,51*	14,47±1,36***^^	4,52±0,19
G/A	15,87±2,43***	26,13±2,54***^	6,18±0,83
Полиморфизм <i>rs1800896</i> (<i>A-1082G</i>) гена <i>IL-10</i>			
G/G	17,26±1,29	14,73±0,96*	17,61±0,58
G/A	14,47±2,15	12,41±1,39	17,37±3,14
A/A	11,36±1,28*	10,68±1,04**	14,32±0,35

Примечание: * – различия достоверны относительно контрольной группы (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$); ^ – различия достоверны относительно 1-й группы (^ – $p < 0,05$; ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$).

Note: * – differences are reliable with respect to the control group (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$); ^ – differences are reliable relative to group 1 (^ – $p < 0,05$; ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$).

В последние годы все больше данных свидетельствуют о том, что генетические факторы способствуют развитию гипертензивных нарушений во время беременности. Несколько исследований выявили, что полиморфизмы отдельных нуклеотидов, в том числе полиморфизмы генов цитокинов участвуют в патогенезе преэклампсии [20, 21, 25].

Одним из наиболее распространенных полиморфизмов гена *IL-1β* в различных популяциях является

полиморфизм *rs1143627* (*T-31C*) гена *IL-1β*, расположенный в промоторе гена и представляющий замену цитозина (C) на тимин (T) в позиции -31 нуклеотида, и который, как сообщается, имеет регуляторную функцию и связан с дифференциальной экспрессией и активностью *IL-1β*, что следовательно, может влиять на важные биологические и клинические процессы, которые модулируют восприимчивость к различным заболеваниям [26]. Выявлена

ассоциация полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена *IL-1β* с высоким риском преэклампсии у женщин китайской популяции, при этом риск формирования гипертензии во время беременности повышался почти в 2 раза при носительстве генотипа C/C [22]. Исследование El Azizu NM, et al (2017) не выявило статистически значимой связи полиморфизма *IL-1β* (T-31C) с риском развития преэклампсии [25]. Вместе с тем, другие авторы выявили значительную связь между полиморфизмом гена *IL-1β* (T-31C) и снижением риска гестационных нарушений при присутствии генотипов T/C или T/T против C/C [27]. Значительные ассоциации наблюдались между преэклампсией и полиморфизмами rs16944 (C-511T) и rs1143634 (C3954T) гена *IL-1β* [28].

В представленном нами исследовании мы не выявили связь генотипов данного полиморфизма с риском развития преэклампсии, однако у носителей аллеля С риск ее развития был достоверно высоким, что позволяет обозначить его как предиктор преэклампсии. Анализ уровня экспрессии гена по содержанию его конечного продукта-белка выявил достоверное повышение уровня *IL-1β* в крови у женщин основной группы ($p<0,05$), что позволяет подтверждать позицию аллеля С, как высокопродуктивного неблагоприятного аллеля при развитии гипертензивных нарушений во время беременности. Важно подчеркнуть, что более значительное повышение уровня *IL-1β* было отмечено во 2-й группе независимо от наличия того или иного генотипа соответствующего полиморфизма ($p<0,001$). При этом максимальное содержание *IL-1β* было характерным для носителей гомозиготного генотипа по аллелю С.

Ген, кодирующий TNFα, расположен в области класса III главного комплекса гистосовместимости на хромосоме 6 и редкий аллель –308A гена TNFα связан с увеличением содержания периферического белка цитокина [23]. TNFα является мощным паракринным и эндокринным

медиатором воспалительных и иммунных функций. Физиологически действие TNFα направлена на регулирование воспалительного процесса, однако несоответствующая его продукция может способствовать чрезмерному проявлению воспалительной реакции с переходом на патологический уровень.

Хотя, в нашем исследовании мы не установили связь полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена *TNFα* с риском развития преэклампсии, в ряде работ было показано, что полиморфизм в позиции -308 G/A повышает риск гипертензивных нарушений [29, 30]. В исследованиях Zubor P, et al (2014), аллель А чаще встречался в случаях преэклампсии увеличивая риск заболевания (OR=2,73), а уровни TNFα в крови матери показали тенденцию к росту с генотипом мутантного аллеля [31]. В работе Khodadadi A, et al (2022) содержание TNFα у женщин с преэклампсией было значительно выше, чем у здоровых беременных ($p<0,001$), хотя авторы не наблюдали никакой корреляции между полиморфизмом *TNFα* (G-308A) с частотой преэклампсии [23]. Метаанализ Wang L, et al (2018), изучавший на основе 22 исследований потенциальное влияние полиморфизма гена *TNFα* (G-308A) на преэклампсию показал, что значимая связь между данным полиморфизмом и восприимчивостью к преэклампсии существовала в аллельной модели А против G (OR=1,37, 95%CI: 1,06-1,77) [20]. Вместе с тем, нами выявлено достоверное повышение содержания TNFα в крови при наличии генотипа G/A у пациенток основной группы, что подтверждает негативную ассоциацию аллеля А с гипертензивными расстройствами.

Замена нуклеотидной последовательности в гене *IL-10* проявляется в 1082 положении промотора появлением гуанина (G) вместо аденина (A). Аллель А rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* является низкофункциональным и определяет снижение продукции белковой молекулы цитокина *IL-10* [24]. Результаты ряда исследований показали связь

полиморфизма гена *IL-10* (A-1082G) с повышенным риском преэклампсии. Метаанализ 21 исследования случай-контроль показал, что полиморфизм гена *IL-10* (A-1082G) был значительно связан с повышенным риском преэклампсии в рамках рецессивной модели (A/A против A/G+G/G: OR=1,19, 95% CI=1,018-1,394, $p=0,029$) [21]. Метаанализ Nath MC, et al (2020), выявил значительные различия в уровнях *IL-10* между случаями с преэклампсией и нормотензивной беременностями. Эти результаты подтверждают роль сниженного уровня *IL-10* в патофизиологии преэклампсии, что обусловлено носительством низкопродуктивных генотипов промоторного гена *IL-10* [32]. Риск развития преэклампсии по результатам наших исследований значительно повышался при присутствии генотипа A/A (OR=16,5, 95% CI=7,78-34,97, $p=0,01$). Также содержание *IL-10* в крови у носителей генотипа A/A было достоверно ниже в 1- и 2-группах относительно контрольных значений ($p<0,05$). Как известно, роль противовоспалительного цитокина *IL-10* заключается в сдерживании провоспалительных стимулов, что представляется весьма важным для обеспечения физиологического иммунокомпромиссного фона во время беременности. Чрезмерная активация провоспалительного звена цитокинов с неадекватным ответом противовоспалительного компонента, опосредованный полиморфизмом генов цитокинов, возможно играет одну из ключевых ролей в развитие эндотелиальной дисфункции, гипертензивных расстройств и последующих полиорганных нарушениях.

Заключение. Полиморфизмы генов цитокинов и обусловленная ими продукция цитокинов играют ключевую роль в развитии преэклампсии. Аллель С полиморфизма rs1143627 (T-31C) гена *IL-1β*, аллель А и гомозиготный генотип A/A полиморфизма rs1800896 (A-1082G) гена *IL-10* связаны с повышением риска

развития преэклампсии и могут быть использованы в качестве генетических предикторов заболевания. Повышенная экспрессия генов провоспалительных цитокинов наряду со снижением уровня противовоспалительного звена цитокинов отражает нарушение Th1/Th2 баланса, что провоцирует формирование системной воспалительной реакции, эндотелиальной дисфункции и развитие преэклампсии во время беременности.

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. Khan B, Yar RA, Khakwani AK, et al. Preeclampsia Incidence and Its Maternal and Neonatal Outcomes With Associated Risk Factors. *Cureus*. 2022;14(11):e31143. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.31143>
2. Кулида ЛВ, Рокотянская ЕА, Панова ИА, и др. Морфологические и иммуногистохимические параметры хронической плацентарной недостаточности при преэклампсии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020;28(4):449-461. DOI: <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020284449-461>
3. Falco ML, Sivanathan J, Laoreti A, et al. Placental histopathology associated with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2017;50(3):295-301. DOI: <https://doi.org/10.1002/uog.17494>
4. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(1):13-22. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414838>

5. Caillon H, Tardif C, Dumontet E, et al. Evaluation of sFlt-1/PlGF Ratio for Predicting and Improving Clinical Management of Pre-eclampsia: Experience in a Specialized Perinatal Care Center. *Annals of Laboratory Medicine*. 2018;38(2):95-101. DOI: <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.95>
6. Possomato-Vieira JS, Khalil RA. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Advances in Pharmacology*. 2016;77:361-431. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.008>
7. Horvat Mercnik M, Schlieffsteiner C, Sanchez-Duffhues G, et al. TGF β signalling: a nexus between inflammation, placental health and preeclampsia throughout pregnancy. *Human Reproduction Update*. 2024;30(4):442-471. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmae007>
8. Сидорова ИС, Никитина НА. Обоснование современной концепции развития преэклампсии. *Акушерство и гинекология*. 2019;4:26-33. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.4.26-33>
9. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell and Tissue Research*. 2022;387(3):391-398. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>
10. Ridder A, Giorgione V, Khalil A, et al. Preeclampsia: The Relationship between Uterine Artery Blood Flow and Trophoblast Function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13):3263. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20133263>
11. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, et al. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(5):1496. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19051496>
12. Afrose D, Chen H, Ranasinghe A, et al. The diagnostic potential of oxidative stress biomarkers for preeclampsia: systematic review and meta-analysis. *Biology of Sex Differences*. 2022;13(1):26. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13293-022-00436-0>
13. Jayaram A, Deer E, Amaral LM, et al. The role of tumor necrosis factor in triggering activation of natural killer cell, multi-organ mitochondrial dysfunction and hypertension during pregnancy. *Pregnancy Hypertension*. 2021;24:65-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.02.006>
14. Deer E, Herrock O, Campbell N, et al. The role of immune cells and mediators in preeclampsia. *Nature Reviews Nephrology*. 2023;19(4):257-270. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00670-0>
15. Han X, Ghaemi MS, Ando K, et al. Differential Dynamics of the Maternal Immune System in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1305. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01305>
16. Hu J, Guo Q, Liu C, et al. Immune cell profiling of preeclamptic pregnant and postpartum women by single-cell RNA sequencing. *International Reviews of Immunology*. 2024;43(1):1-12. DOI: <https://doi.org/10.1080/08830185.2022.2144291>
17. Shi Y, Han B, Li X, et al. Correlation between Interleukin-10 Effects on Th1/Th2 Immune Balance and Pregnancy Induced Hypertension. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2024;54(4):483-488.
18. Aggarwal R, Jain AK, Mittal P, et al. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(4):e22834. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.22834>
19. El Shahaway AA, Abd Elhady RR, Abdelrhman AA, et al. Role of maternal serum interleukin 17 in preeclampsia: diagnosis and prognosis. *Journal of Inflammation Research*. 2019;12:175-180. DOI: <https://doi.org/10.2147/JIR.S206800>
20. Wang L, Qu G, Wu W, et al. Association between tumor necrosis factor- α -308G/A gene polymorphism and susceptibility to pre-eclampsia: An updated meta-analysis. *Cytokine*. 2018;111:278-286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.002>
21. Veisian M, Tabatabaei RS, Javaheri A, et al. Association of Interleukin-10 -1082G > A Polymorphism with Susceptibility to Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on 21 Studies. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2020;39(6):518-532. DOI: <https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1683919>
22. Wang X, Jiang F, Liang Y, et al. Interleukin-1b-31C/T and -511T/C Polymorphisms Were Associated with Preeclampsia in Chinese Han Population. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e106919. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106919>
23. Khodadadi A, Ghadiri A, Ghafourian M, et al. The TNF- α -308G/A Gene Polymorphism and Serum TNF- α Levels in Women With Preeclampsia. *Journal of Family and Reproductive Health*. 2022;16(3):205-211. DOI: <https://doi.org/10.18502/jfrh.v16i3.10582>

24. Tarique M, Naz H, Saini C, et al. Association of IL-10 Gene Polymorphism With IL-10 Secretion by CD4 and T Regulatory Cells in Human Leprosy. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1974. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01974>

25. El Azizy HM, Hassan S, Salem H, Diao N. Interleukin-1 β -gene polymorphisms in preeclamptic Egyptian women. *Middle East Fertility Society Journal*. 2017;22(4):285-289. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.05.001>

26. Топчиева ЛВ, Курбатова ИВ, Малышева ИЕ, и др. Аллельный полиморфизм генов, вовлеченных в продукцию IL-1 β , и предрасположенность людей к развитию артериальной гипертензии. Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(1):53-70. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-4>

27. Harati-Sadegh M, Sargazi S, Taheri H, et al. Relationship between common interleukin 1-beta gene polymorphisms and the risk of gestational disorders: An updated meta-analysis. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2021;35:25. DOI: <https://doi.org/10.47176/mjiri.35.25>

28. Hamid HM, Abdalla SE, Sidig M, et al. Association of VEGFA and IL1 β gene polymorphisms with preeclampsia in Sudanese women. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2020;8(3):e1119. DOI: <https://doi.org/10.1002/mgg3.1119>

29. Hossen MS, Aziz MA, Barek MA, et al. Investigation of the linkage between TNF- α rs1800629 polymorphism and preeclampsia risk: A meta-analysis. *Cytokine*. 2024;175:156499. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156499>

30. Lin CW, Chen CH, Wu MH, et al. Polymorphisms within the Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Is Associated with Preeclampsia in Taiwanese Han Populations. *Biomedicines*. 2023;11(3):862. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030862>

31. Zubor P, Dokus K, Zigo I, et al. TNF α G308A gene polymorphism has an impact on renal function, microvascular permeability, organ involvement and severity of preeclampsia. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2014;78(3):150-61. DOI: <https://doi.org/10.1159/000364865>

32. Nath MC, Cubro H, McCormick DJ, et al. Preeclamptic women have decreased circulating IL-10 (Interleukin-10) values at the time of preeclampsia diagnosis: systematic review and

meta-analysis. *Hypertension*. 2020;76(6):1817-1827. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15870>

References

1. Khan B, Yar RA, Khakwani AK, et al. Preeclampsia Incidence and Its Maternal and Neonatal Outcomes With Associated Risk Factors. *Cureus*. 2022;14(11):e31143. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.31143>

2. Kulida LV, Rokotyanskaya EA, Panova IA, et al. Morphological and immunohistochemical parameters of chronic placental insufficiency in preeclampsia. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2020;28(4):449-461. Russian. DOI: <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020284449-461>

3. Falco ML, Sivanathan J, Laoreti A, et al. Placental histopathology associated with preeclampsia: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2017;50(3):295-301. DOI: <https://doi.org/10.1002/uog.17494>

4. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(1):13-22. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414838>

5. Caillon H, Tardif C, Dumontet E, et al. Evaluation of sFlt-1/PlGF Ratio for Predicting and Improving Clinical Management of Pre-eclampsia: Experience in a Specialized Perinatal Care Center. *Annals of Laboratory Medicine*. 2018;38(2):95-101. DOI: <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.95>

6. Possomato-Vieira JS, Khalil RA. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Advances in Pharmacology*. 2016;77:361-431. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.008>

7. Horvat Mercnik M, Schlieffsteiner C, Sanchez-Duffhues G, et al. TGF β signalling: a nexus between inflammation, placental health and preeclampsia throughout pregnancy. *Human Reproduction Update*. 2024;30(4):442-471. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmae007>

8. Sidorova IS, Nikitina NA. Validation of the modern concept of the development of preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*. 2019;4:26-33. Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.4.26-33>

9. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell and Tissue Research*. 2022;387(3):391-398. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>
10. Ridder A, Giorgione V, Khalil A, et al. Preeclampsia: The Relationship between Uterine Artery Blood Flow and Trophoblast Function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13):3263. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20133263>
11. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, et al. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(5):1496. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19051496>
12. Afrose D, Chen H, Ranasinghe A, et al. The diagnostic potential of oxidative stress biomarkers for preeclampsia: systematic review and meta-analysis. *Biology of Sex Differences*. 2022;13(1):26. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13293-022-00436-0>
13. Jayaram A, Deer E, Amaral LM, et al. The role of tumor necrosis factor in triggering activation of natural killer cell, multi-organ mitochondrial dysfunction and hypertension during pregnancy. *Pregnancy Hypertension*. 2021;24:65-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.02.006>
14. Deer E, Herrock O, Campbell N, et al. The role of immune cells and mediators in preeclampsia. *Nature Reviews Nephrology*. 2023;19(4):257-270. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00670-0>
15. Han X, Ghaemi MS, Ando K, et al. Differential Dynamics of the Maternal Immune System in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1305. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01305>
16. Hu J, Guo Q, Liu C, et al. Immune cell profiling of preeclamptic pregnant and postpartum women by single-cell RNA sequencing. *International Reviews of Immunology*. 2024;43(1):1-12. DOI: <https://doi.org/10.1080/08830185.2022.2144291>
17. Shi Y, Han B, Li X, et al. Correlation between Interleukin-10 Effects on Th1/Th2 Immune Balance and Pregnancy Induced Hypertension. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2024;54(4):483-488.
18. Aggarwal R, Jain AK, Mittal P, et al. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(4):e22834. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.22834>
19. El Shahaway AA, Abd Elhady RR, Abdelrhman AA, et al. Role of maternal serum interleukin 17 in preeclampsia: diagnosis and prognosis. *Journal of Inflammation Research*. 2019;12:175-180. DOI: <https://doi.org/10.2147/JIR.S206800>
20. Wang L, Qu G, Wu W, et al. Association between tumor necrosis factor- α -308G/A gene polymorphism and susceptibility to pre-eclampsia: An updated meta-analysis. *Cytokine*. 2018;111:278-286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.002>
21. Veisian M, Tabatabaei RS, Javaheri A, et al. Association of Interleukin-10 -1082G > A Polymorphism with Susceptibility to Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on 21 Studies. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2020;39(6):518-532. DOI: <https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1683919>
22. Wang X, Jiang F, Liang Y, et al. Interleukin-1b-31C/T and -511T/C Polymorphisms Were Associated with Preeclampsia in Chinese Han Population. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e106919. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106919>
23. Khodadadi A, Ghadiri A, Ghafourian M, et al. The TNF- α -308G/A Gene Polymorphism and Serum TNF- α Levels in Women With Preeclampsia. *Journal of Family and Reproductive Health*. 2022;16(3):205-211. DOI: <https://doi.org/10.18502/jfrh.v16i3.10582>
24. Tarique M, Naz H, Saini C, et al. Association of IL-10 Gene Polymorphism With IL-10 Secretion by CD4 and T Regulatory Cells in Human Leprosy. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1974. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01974>
25. El Azizy HM, Hassan S, Salem H, Diao N. Interleukin-1 β -gene polymorphisms in preeclamptic Egyptian women. *Middle East Fertility Society Journal*. 2017;22(4):285-289. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.05.001>
26. Topchieva LV, Kurbatova IV, Malysheva IE, et al. Allelic polymorphism of genes involved in IL-1 β production and predisposition of people to the development of arterial hypertension. *Research Results in Biomedicine*. 2023;9(1):53-70. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-4>
27. Harati-Sadegh M, Sargazi S, Taheri H, et al. Relationship between common interleukin 1-beta gene polymorphisms and the risk of gestational disorders: An updated meta-analysis. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*.

2021;35:25.

DOI:

<https://doi.org/10.47176/mjiri.35.25>

28.Hamid HM, Abdalla SE, Sidig M, et al. Association of VEGFA and IL1 β gene polymorphisms with preeclampsia in Sudanese women. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2020;8(3):e1119. DOI: <https://doi.org/10.1002/mgg3.1119>

29.Hossen MS, Aziz MA, Barek MA, et al. Investigation of the linkage between TNF- α rs1800629 polymorphism and preeclampsia risk: A meta-analysis. *Cytokine*. 2024;175:156499. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156499>

30.Lin CW, Chen CH, Wu MH, et al. Polymorphisms within the Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Is Associated with Preeclampsia in Taiwanese Han Populations. *Biomedicines*. 2023;11(3):862. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030862>

31.Zubor P, Dokus K, Zigo I, et al. TNF α G308A gene polymorphism has an impact on renal function, microvascular permeability, organ involvement and severity of preeclampsia. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2014;78(3):150-61. DOI: <https://doi.org/10.1159/000364865>

32.Nath MC, Cubro H, McCormick DJ, et al. Preeclamptic women have decreased circulating IL-10 (Interleukin-10) values at the time of preeclampsia diagnosis: systematic review and meta-analysis. *Hypertension*. 2020;76(6):1817-1827. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15870>

Статья поступила в редакцию 17 января 2025 г.
Поступила после доработки 20 февраля 2025 г.
Принята к печати 12 марта 2025 г.

Received 17 January 2025

Revised 20 February 2025

Accepted 12 March 2025

Информация об авторах

Фарход Кахрамонович Ахмедов, доктор медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии, Бухарский государственный медицинский институт имени Абу Али ибн Сино, г. Бухара, Республика Узбекистан, E-mail: axmedov.farhod@bsmi.uz, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0104-4980>.

Махфуза Мубиновна Рахматуллаева, доктор медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии, Бухарский государственный медицинский институт имени Абу Али ибн Сино, г. Бухара, Республика Узбекистан, E-mail: rahmatullayeva.mahfuza@bsmi.uz, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1987-6136>.

Олтиной Абдуганиевна Якубова, доктор медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии, Андижанский государственный медицинский институт, г. Андижан, Республика Узбекистан, E-mail: oltinoy62@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1316-1359>.

Information about the authors

Farkhod K. Akhmedov, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynaecology, Bukhara State Medical Institute, Bukhara, Uzbekistan, E-mail: axmedov.farhod@bsmi.uz, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0104-4980>.

Makhfuza M. Rakhmatullaeva, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynaecology, Bukhara State Medical Institute, Bukhara, Uzbekistan, E-mail: rahmatullayeva.mahfuza@bsmi.uz, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1987-6136>.

Oltinoy A. Yakubova, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynaecology, Andijan State Medical Institute, Andijan, Uzbekistan, E-mail: oltinoy62@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1316-1359>.



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

УДК 616-001:617.75+159.9.072

Возрастная жизнеспособность в критические периоды жизни пациентов при зрительном дефиците и травмах

М.А. Неудахин¹ , Н.М. Агарков² , А.С.О. Ибиев³ , Е.Н. Коровин⁴ ,
А.С. Лысенко⁵ , М.Л. Курзин¹ , И.Ю. Шарапов¹

¹ 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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Юго-Западный государственный университет»,

ул. 50 лет Октября, д. 94, г. Курск, 305040, Российская Федерация

³ Общество с ограниченной ответственностью «Лахта Клиника»,
ул. Дибуновская, д. 50, г. Санкт-Петербург, 197183, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный технический университет»,
ул. 20-летия Октября, д. 84, г. Воронеж, 394006, Российская Федерация

⁵ Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Курская городская больница №1 им. Н.С. Короткова»,

ул. Садовая, д. 40, г. Курск, 305004, Российская Федерация

Автор для переписки: Н.М. Агарков (vitalaxen@mail.ru)

Резюме

Актуальность: Нарушение зрения и травмы у пациентов встречаются часто в группах старшего возраста и по мере старения их распространённость будет увеличиваться. При этом зрительный дефицит и травмы могут способствовать снижению возрастной жизнеспособности, но последняя среди указанных выше категорий пожилых пациентов изучается редко. **Цель исследования:** Исследование возрастной жизнеспособности в критические периоды жизни пациентов при зрительном дефиците и травмах. **Материалы и методы:** Сформированы две клинические группы: основная в количестве 215 человек и контрольная в количестве 208 человек. В обеих группах изучена возрастная жизнеспособность по тесту А.В. Махнача. При оценке влияния зрительного дефицита и травм на возрастную жизнеспособность использовался метод относительного риска по общепринятой методике. **Результаты:** Среди пациентов основной группы по сравнению с контрольной группой установлено снижение следующих шкал жизнеспособности: внутренний локус контроля до $31,8 \pm 2,2$ баллов против $55,2 \pm 2,5$ баллов ($p=0,0023$), настойчивость – до $35,6 \pm 1,9$ против $69,7 \pm 2,8$ баллов ($p=0,0018$), самоэффективность – до $49,8 \pm 2,0$ против $80,6 \pm 3,1$ баллов ($p=0,0009$), совладение и адаптация – до $29,4 \pm 1,7$ против $50,7 \pm 2,2$ баллов ($p=0,0024$) соответственно. Интегральный индекс жизнеспособности в основной группе составлял $274,1 \pm 3,9$ баллов, тогда как в контрольной – $396,8 \pm 4,4$ баллов ($p<0,001$). Относительный риск оказался наибольшим (2,769) для шкалы настойчивость с достоверным доверительным

интервалом ($p=0,00021$). Несколько ниже величина относительного риска установлена для шкал совладение и адаптация – 2,457, внутренний локус контроля – 2,395 и самооффективность – 2,214 с достоверной значимостью во всех случаях. **Заключение:** Предлагается определение возрастной жизнеспособности у пациентов с нарушением зрения и травмами для проведения среди них мероприятий по улучшению жизнестойкости.

Ключевые слова: возрастная жизнеспособность; зрительный дефицит; травмы; критические периоды жизни; пожилые; жизнестойкость

Для цитирования: Неудахин МА, Агарков НМ, Ибиев АСО, и др. Возрастная жизнеспособность в критические периоды жизни пациентов при зрительном дефиците и травмах. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025;11(4):727-741. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-1-0

Age-related resilience in critical periods of life of patients with visual deficits and injuries

Mikhail A. Neudakhin¹ , Nikolay M. Agarkov² , Aslanbek S.O. Ibiev³ ,
Evgeny N. Korovin⁴ , Anastasia S. Lysenko⁵ , Maxim L. Kurzin¹ ,
Ilya Y. Sharapov¹ 

¹ Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution,
1 Rasskazovskoe Hgw., Tambov, 392000, Russia

² Southwest State University,
94 50 Let Oktyabrya St., Kursk, 305040, Russia

³ Lahta Clinic,
50 Dibunovskaya St., Saint Petersburg, 197183, Russia

⁴ Voronezh State Technical University,
84 20-letiya Oktyabrya St., Voronezh, 394006, Russia

⁵ Korotkov Kursk City Hospital No. 1,
40 Sadovaya St., Kursk, 305004, Russia

Corresponding author: Nikolay M. Agarkov (vitalaxen@mail.ru)

Abstract

Background: Visual impairment and injuries in patients are common in older groups and their prevalence will increase as they age. At the same time, visual deficits and injuries can contribute to a decrease in age-related resilience, but the latter is rarely studied among the above categories of elderly patients. **The aim of the study:** To study age-related resilience in critical periods of life of patients with visual deficits and injuries. **Materials and methods:** Two clinical groups were formed: the main group of 215 people and the control group of 208 people. Age-related resilience was studied in both groups according to the A.V. Makhnach test. In assessing the impact of visual deficits and trauma on age-related resilience, the relative risk method was used according to a generally accepted methodology. **Results:** Among patients in the main group, compared with the control group, a decrease in the following resilience scales was found: internal locus of control to 31.8 ± 2.2 points versus 55.2 ± 2.5 points ($p=0.0023$), perseverance to 35.6 ± 1.9 versus 69.7 ± 2.8 points ($p=0.0018$), self-efficacy to 49.8 ± 2.0 points versus 80.6 ± 3.1 points ($p=0.0009$), copulation and adaptation – up to 29.4 ± 1.7 versus 50.7 ± 2.2 points ($p=0.0024$), respectively. The integral resilience index in the main group was 274.1 ± 3.9 points, while in the control group it was 396.8 ± 4.4 points ($p<0.001$). The

relative risk was highest (2,769) for the persistence scale with a reliable confidence interval ($p=0.00021$). The relative risk value is slightly lower for the coping and adaptation scales – 2.457, the internal locus of control – 2.395 and self-efficacy – 2.214 with significant significance in all cases.

Conclusion: It is proposed to determine age-related resilience in patients with visual impairment and injuries in order to carry out measures to improve resilience among them.

Keywords: age-related resilience; visual deficit; injuries; critical periods of life; elderly; resilience

For citation: Neudakhin MA, Agakov NM, Ibiev ASO, et al. Age-related resilience in critical periods of life of patients with visual deficits and injuries. Research Results in Biomedicine. 2025;11(4):727-741. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2025-11-4-1-0

Введение. Возрастная жизнеспособность (жизнестойкость) представляет один из интенсивно развивающихся концептов современной геронтологии [1, 2, 3]. Изучение жизнестойкости особенно актуально в связи с продолжающимся старением населения в различных государствах – как индустриальных, так и развивающихся. За последние годы был достигнут заметный прогресс в снижении смертности и расширении глобальной продолжительности жизни. Тем не менее, этот переход привел к распространению нелетальных заболеваний и проблем, кульминацией которых является глобальное старение населения [4, 5]. Кроме того, с увеличением ожидаемой продолжительности жизни наблюдается одновременное увеличение хронических заболеваний и инвалидности, так что по крайней мере одно хроническое заболевание наблюдается у 84,1% пожилых людей [6]. Хронические и изнурительные заболевания могут вызывать различные психологические проблемы, что приводит к высокой заболеваемости психическими расстройствами после физических заболеваний [7]. Учитывая возросшие психические расстройства и важность проблем старения, облегчить беспокойство и проблемы этой группы населения можно рассматривать как социальную необходимость. Одной из областей, вызывающих беспокойство у исследователей, является удовлетворенность пожилых людей жизнью. Удовлетворенность жизнью или воспринимаемое качество жизни – это

сложная конструкция, которая передает позитивное отношение человека к миру, в котором он живет, и состоит из ощущения удовольствия, на достижение которого человек тратит много времени [4].

В настоящее время в связи с увеличением продолжительности жизни и увеличением потребности в развитии специализированных видов медицинских, социальных, психологических, духовных услуг людям старших возрастных групп происходит переосмысление старения как этапа жизни человека [8, 9]. В последнее время все большее количество специалистов в области геронтологии и гериатрии рекомендуют добавлять возрастную жизнеспособность (resilience). Возрастная жизнеспособность – это сочетание всех физических и психических возможностей человека, отражающих возможности биопсихосоциальной адаптации человека к стрессам позднего возраста, которое складывается из нескольких доменов, а именно, когнитивного, двигательного, психологического, сенсорного и телесного [10, 11, 12].

Жизнестойкость пожилого населения зависит не только от указанных выше факторов, но и от адаптационных возможностей организма, уровня образования, соматического, гериатрического и психологического статуса [13, 14, 15]. Что касается демографических факторов, общий показатель Connor-Davidson Resilience Scale (CD-RISC) незначительно положительно коррелировал с возрастом. Это противоречит результатам

исследования, в котором приняли участие женщины того же возраста, проживающие в сообществах. Исследование показало, что общий балл CD-RISC слабо и отрицательно коррелировал с хронологическим возрастом. Однако корреляция возраста как с фактором упорства, так и с фактором адаптивного преодоления трудностей согласуется с исследованиями, которые показывают, что и упорство, и адаптивное преодоление трудностей усиливаются с возрастом. Хотя образование не было связано с общим показателем CD-RISC, оно имело небольшую положительную связь с фактором «активное преодоление трудностей». Это имеет смысл, если рассматривать процесс получения образования как источник контролируемого стресса, с которым наиболее эффективно справляются те, у кого высокий уровень самоэффективности в активном преодолении трудностей. Образование также имеет небольшую отрицательную связь с фактором «духовность». Следует отметить, что общая оценка CD-RISC имела небольшую, но значимую отрицательную связь со шкалой MMSE, что указывает на то, что в среднем люди с более высоким уровнем когнитивных функций были менее устойчивыми [16].

Однако, несмотря на проводимые исследования многие аспекты жизнестойкости рассматриваются чаще в концептуальном аспекте, проводится операционализация жизнестойкости и её критериев (параметров), предлагаются

различные биомаркеры жизнестойкости для различных соматических заболеваний и травм. Жизнестойкость редко анализируется среди пациентов пожилого и старшего возраста в различные критические периоды их жизни: выход на пенсию, получение травм с переломами различной локализации, черепно-мозговой травмы, выявление тяжёлых и опасных для жизни заболеваний – новообразований, инсульт, инфаркт миокарда. Жизнестойкость остаётся практически неизученной в указанные критические точки старения человека среди пациентов с нарушением зрения и травмами.

Цель исследования. Исследование возрастной жизнеспособности в критические периоды жизни пациентов при зрительном дефиците и травмах.

Материалы и методы исследования. При проведении исследования сформированы две клинические группы: основная группа (215 человек) и контрольная группа (208 человек). Основная группа представлена пациентами пожилого возраста с нарушением зрения и травмами, приведшими к потере зрения, переломам. Контролем служили пациенты аналогичного возраста без нарушения зрения и вышеперечисленных травм – с хронической патологией в стадии компенсации. Проведённая рандомизация позволила сформировать близкие по основным критериям группы пациентов (Табл. 1).

Таблица 1

Сопоставимость основной и контрольной групп по ведущим критериям (P±SD) на 100 человек

Table 1

Comparability of the main and control groups according to the leading criteria (P±SD) per 100 people

Критерий	Контрольная группа	Основная группа	p
Сердечно-сосудистая патология	59,1±2,7	63,7±2,4	>0,05
Заболевания центральной нервной системы	13,5±1,2	12,1±0,8	>0,05
Заболевания периферической нервной системы	34,6±1,8	38,1±2,0	>0,05
Заболевания желудочно-кишечного тракта	11,5±0,9	14,0±1,3	>0,05
Заболевания органов дыхания	9,1±1,0	8,4±0,7	>0,05
Заболевания мочеполовой системы	9,6±1,1	12,1±0,9	>0,05

По сопутствующей соматической патологии пациенты сравниваемых групп не имели статистически значимых различий.

Обследование пациентов основной и контрольной групп проводилось в условиях специализированного стационара. При обследовании и включении пациентов в указанные группы обязательно соблюдались принципы «Надлежащей клинической практики» (Good Clinical Practice) с получением письменного информированного согласия на участие в исследовании. Оценка возрастной жизнеспособности проведена по тесту А.В. Махнача [17]. При этом выделялись следующие шкалы жизнестойкости:

- внутренний локус контроля,
- настойчивость,
- самооффективность,
- семейные и социальные взаимосвязи,
- религиозная вера, духовная жизнь.

Максимальное количество баллов, которые может набрать по этому тесту обследованный пациент составляет 480, а минимальное – 120 [17]. Дифференциация пациентов обеих групп по степени возрастной жизнестойкости нами не проводилась. Определялись средние

значения баллов по каждой шкале и интегральный показатель жизнестойкости.

Для оценки степени влияния анализируемых состояний в снижение жизнестойкости проводилось определение относительного риска общепринятым методом [18].

При обработке данных использовалась статистическая программа «Statistica 16.0». Для сравнения достоверности различий использовался критерий X^2 , а различие принималось значимым при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В двух сформированных с учётом цели исследования группах выявлены различные параметры жизнестойкости, которые определялись по большинству анализируемых шкал (Табл. 2). Оказалось, что среди пациентов, имевших зрительный дефицит и перенёсших травму в результате синдрома падений жизнестойкость наиболее существенно ниже по такому локусу как настойчивость, величина которой в 1,96 раз ниже относительно представителей контрольной группы. Это указывает на большую уязвимость пациентов основной группы, получивших переломы при травматизации, и пациентов со зрительным дефицитом.

Таблица 2

Параметры возрастной жизнестойкости у пациентов со зрительным дефицитом и травмами ($M \pm m$, баллы)

Table 2

Age-related resilience parameters in patients with visual deficits and injuries ($M \pm m$, points)

Показатель жизнестойкости	Основная группа	Контрольная группа	p
Внутренний локус контроля	31,8 $\pm$ 2,2	55,2 $\pm$ 2,5	0,0023
Настойчивость	35,6 $\pm$ 1,9	69,7 $\pm$ 2,8	0,0018
Самооффективность	49,8 $\pm$ 2,0	80,6 $\pm$ 3,1	0,0009
Семейные и социальные взаимосвязи	71,2 $\pm$ 2,9	78,9 $\pm$ 3,4	0,0385
Совладение и адаптация	29,4 $\pm$ 1,7	50,7 $\pm$ 2,2	0,0024
Религиозная вера, духовная жизнь	56,3 $\pm$ 2,0	61,7 $\pm$ 2,5	0,0496

Среди представителей основной группы существенно (в 1,74 раза) ниже жизнестойкость по внутреннему локусу контроля со статистически значимым различием в сравнении с участниками контрольной группы. Среди последних достоверно выше оказались параметры

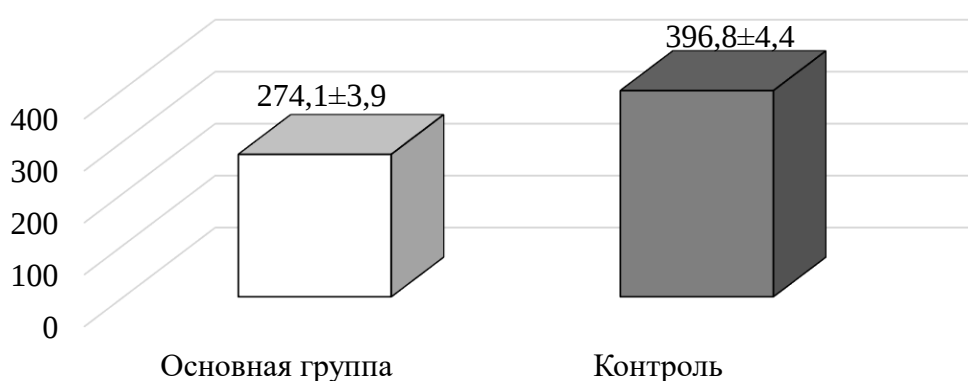
жизнестойкости по шкале самооффективности в 1,62 раза с достоверным различием к основной группе. Между рассматриваемыми клиническими группами существенными и статистически значимыми оказались различия по шкале совладение и адаптация

– в 1,71 раза, когда величина жизнестойкости у лиц основной группы была сниженной.

Вместе с тем, несмотря на влияние анализируемых травматических и стрессовых воздействий, у пациентов основной группы сохранилась жизнестойкость по локусам семейные и социальные взаимосвязи, а также – по локусу религиозная вера, духовная жизнь, что указывает на меньшую уязвимость пациентов основной группы с травмами и

нарушением зрения вследствие офтальмологических заболеваний и травм глаза.

В целом, ухудшение жизнестойкости у пациентов основной группы в сравнении с контролем оказалось существенным со статистически значимым различием (Рисунок). Жизнестойкость пациентов основной группы существенно (в 1,45 раза) ниже, чем у пациентов аналогичного возраста, включённых в контрольную группу.



Примечание: ось абсцисс – сравниваемые группы, ось ординат – величина интегрального показателя жизнестойкости.

Рис. Интегральный параметр жизнестойкости у пациентов основной и контрольной группы (M ± m, баллы)

Note: the abscissa axis represents the groups being compared, and the ordinate axis represents the value of the integral index of resilience

Fig. Integral parameter of resilience in patients of the main and control groups (M ± m, points)

Таким образом, интегральный уровень жизнестойкости пациентов основной группы существенно ниже, что обусловлено негативным воздействием перенесённых травм, зрительным дефицитом вследствие травм глаза и офтальмологических заболеваний.

Степень влияния перенесённых травм, развития зрительного дефицита вследствие травм глаза и офтальмологических заболеваний на ухудшение возрастной жизнеспособности пациентов, оценённая посредством расчёта

величин относительного риска показала, что риск снижения жизнестойкости среди пациентов основной группы в большей степени может произойти по шкале настойчивости – в среднем в 2,77 раз с достоверным 95% доверительным интервалом (Табл. 3). Высокий риск ухудшения жизнестойкости у пациентов основной группы наблюдается также по шкалам совладение и адаптация, внутренний локус контроля, настойчивость и самоэффективность с приблизительно равным изменением.

Таблица 3

**Величины относительного риска для пациентов основной группы
в аспекте снижения жизнестойкости**

Table 3

Relative risk values for patients in the main group in terms of reduced resilience

Показатель жизнестойкости	Величина относительного риска	Доверительный 95% интервал	p
Внутренний локус контроля	2,395	2,106-2,849	0,0012
Настойчивость	2,769	2,518-3,198	0,0021
Самозффективность	2,214	2,006-2,792	0,0033
Семейные и социальные взаимосвязи	0,908	0,718-1,185	0,4809
Совладение и адаптация	2,457	2,224-2,893	0,0026
Религиозная вера, духовная жизнь	0,876	0,621-1,235	0,327

Величины относительного риска для названных шкал жизнестойкости статистически значимы и во всех случаях имеют достоверные доверительные границы. Однако влияние рассматриваемых негативных жизненных событий в критические периоды старения не имеет существенной ассоциации с такими локусами жизнестойкости как религиозная вера, духовная жизнь, семейные и социальные взаимосвязи. Вместе с тем можно говорить о существенном влиянии перенесённых травм и зрительного дефицита на уровень жизнестойкости, отражающей адаптационный потенциал пациентов, поскольку возрастная жизнеспособность, по мнению Ильницкого А.Н., Процаева К.Н. [11] характеризует функциональные резервы человека. Особенно это актуально для лиц старшего возраста, отягощённых функциональными дефицитами, полипрагмазией и полиморбидностью [19]. Пожилые люди часто сталкиваются с множеством жизненных проблем – выход на пенсию, смерть близкого родственника, различные травмы, травмы физического характера (переломы, ушибы и другие) и психологические травмы, социальная изоляция [20].

Жизнестойкость в широком смысле определяется как способность адаптироваться и преуспевать перед лицом невзгод. Первоначально концептуализированная как стабильная черта характера, жизнестойкость в

настоящее время признается как многомерная динамическая способность, на которую влияют как внутренние ресурсы, так и ресурсы окружающей среды [21].

Жизнестойкость, зависящая от адаптационных возможностей человека, помогает людям облегчить негативные эмоции и улучшить качество жизни [22]. Понимая теорию положительных эмоций "расширяй и укрепляй", можно осознать, что положительные эмоции (такие как счастье и интерес) расширяют мысли и действия людей, преодолевают физиологические эффекты негативных эмоций, повышают жизнестойкость и приводят к повышению эмоционального благополучия, тем самым улучшая качество жизни человека [23]. Кроме того, систематическая модель саморефлексии для повышения жизнестойкости показывает, что те, кто пережил трудности или даже травму, будут обладать большей жизнестойкостью, чем те, кто этого не испытывал. Следовательно, когда пациенты с глаукомой сталкиваются с такими неприятными симптомами, как нарушение зрения, головные боли и отек глаз, эти неприятные симптомы могут стимулировать повышение сопротивляемости, что может повысить приверженность пациентов лечению, тем самым улучшая их качество жизни. Кроме того, большинство исследований показали, что у людей с высоким уровнем жизнестойкости в целом было более

высокое качество жизни [24]. Показано, что качество жизни онкологических пациентов с более высоким уровнем жизнестойкости было значительно лучше, чем у пациентов с более низким уровнем жизнестойкости. В другом исследовании также сообщалось, что пациенты с артериальной гипертензией улучшили свое качество жизни, активно и стратегически сосредоточившись на повышении своей сопротивляемости [25]. Хотя связь между жизнестойкостью и качеством жизни изучалась при многих клинических состояниях, недостаточно исследований, касающихся жизнестойкости и качества жизни среди пациентов с глаукомой.

Проведённая нами оценка жизнестойкости по тесту, предложенному А.В. Махначом, показала снижение жизнестойкости как по интегральной величине, так и по большинству шкал данного теста, что соответствует ранее выполненным исследованиям [11, 26, 27]. В частности, показано по тесту А.В. Махнача снижение возрастной жизнеспособности у пациентов с артериальной гипертензией за счёт снижения самоэффективности, настойчивости, совладение и адаптации, а также внутреннего локуса контроля [11, 26]. При этом соматический статус пациентов с артериальной гипертензией и снижением возрастной жизнеспособности характеризовался следующим. Самыми распространёнными сопутствующими заболеваниями были неврологические, которые включали в себя мышечно-тонический синдром на фоне остеохондроза позвоночника, дисциркуляторные энцефалопатии и другие заболевания, на втором месте по распространённости были эндокринные заболевания, среди них сахарный диабет 2 типа, диффузный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит и другие, на третьем месте по распространённости были заболевания желудочно-кишечного тракта, среди них хронический гастрит, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, синдром раздражённого кишечника и другие.

Возрастную жизнеспособность в отдельных публикациях [2] предлагается рассматривать не с позиций антогонизма синдрома старческой астении, а определение уровня жизнестойкости недостаточно разработано и нуждается в объективизации [27].

Объективизация возрастной жизнеспособности у пациентов с катарактой и глаукомой, обуславливающих формирование зрительного дефицита, проведена по параметрам аллостатической нагрузки [27]. Показано, что возрастная жизнеспособность у пациентов пожилого возраста при сенсорных дефицитах, вызванных сочетанной закрытоугольной глаукомой и корковой катарактой, соответствует низкому уровню, определенному по физическому, психологическому и когнитивному компонентам.

Ведущими маркерами возрастной жизнеспособности у пациентов пожилого возраста с сенсорными дефицитами являются: низкий уровень в крови альбуминов до $49,7 \pm 0,8\%$, повышение гликированного гемоглобина до $5,9 \pm 0,3\%$, С-реактивного белка до $12,4 \pm 0,3$ мг/л, общего холестерина до $6,5 \pm 0,5$ ммоль/л, триглицеридов до $2,4 \pm 0,3$ ммоль/л, систолического артериального давления до $149,4 \pm 2,2$ мм рт. ст. и диастолического артериального давления до $95,8 \pm 2,0$ мм рт. ст. Корреляционные связи между вышеперечисленными маркерами и физическим, психологическим компонентами возрастной жизнеспособности по субшкале «Противодействие стрессу» представлены преимущественно обратными ассоциациями, а по субшкале «Перенапряжение» - достоверно чаще прямыми соотношениями [15]. Однако из семи известных исследовательских факторных анализов, которые проводились с различными группами населения с момента разработки CD-RISC, каждый из них сообщил о разной факторной структуре, и результаты одного исследования показывают, что факторная

структура может отличаться в зависимости от этнической группы.

Распределение отдельных элементов в соответствии с фактором, на который они оказывали наибольшее влияние, выявила конструкторы, связанные с выдержкой, активной самооффективностью в преодолении трудностей, адаптивной самооффективностью в преодолении трудностей и духовностью. Эти результаты согласуются с совпадением теоретических концептуализаций жизнестойкости и совладения. В то время как преодоление относится к когнитивным и поведенческим стратегиям, используемым для управления стрессором, жизнестойкость означает благоприятные результаты перед лицом неблагоприятных обстоятельств. Этот фактор согласуется с исследованиями, показывающими, что чувство цели связано с улучшением психического здоровья [15].

Активное или “ориентированное на проблему” совладение (усилия воздействовать на источник стресса) было связано с жизнестойкостью [26]. Однако исследования показывают, что, хотя активный подход является адаптивным к контролируемым факторам стресса, такие усилия становятся неадаптивными в контексте неконтролируемого стресса. В этих случаях усилия по адаптации или “приспособлению” к источнику стресса (например, посредством когнитивной переоценки или принятия) связаны с улучшением самочувствия. Исследования показывают, что люди, способные гибко применять активное или адаптивное совладение в зависимости от стрессора, имеют более благоприятные результаты в области психического здоровья [1].

Однако считается, что поскольку пожилые люди сталкиваются с трудностями, отличными от условий жизни населения в целом, шкала Коннора-Дэвидсона, и другие шкалы жизнестойкости не кажутся полностью подходящими для измерения их жизнестойкости. Эти шкалы жизнестойкости, которые в основном фокусируются на оценке внутренних

факторов жизнестойкости, имеют ограничения в отношении учета внешних факторов, таких как социальная поддержка со стороны семьи и общества. Кроме того, шкалам не хватает способности оценивать определенные факторы жизнестойкости, такие как смысл и цель в жизни, которые важны для развития жизнестойкости у пожилых людей [14]. Учитывая, что дезадаптация пожилых людей часто вызвана более чем одним неблагоприятным опытом, жизнестойкость пожилых людей сложна и разнообразна на разных уровнях. Шкала жизнестойкости пожилых людей должна включать оценку индивидуальных факторов защиты, социальную поддержку со стороны семьи, духовную поддержку и другие факторы внешней среды.

Травматические события могут привести к выработке избегающего стиля совладения или повысить вероятность использования избегающих стратегий совладения. Например, показано, что люди с историей жестокого обращения в детстве, насилия со стороны интимного партнера или сексуального насилия со стороны взрослых с большей вероятностью продемонстрируют избегающий стиль совладения за счет использования стратегий, которые считаются менее адаптивными (например, употребление психоактивных веществ) [28]. Поскольку предыдущие данные свидетельствуют о том, что воздействие травмы, последующий дистресс и избегающее преодоление взаимосвязаны, возможно, что люди, которые психологически устойчивы после воздействия травмы, могут продемонстрировать больший подход к преодолению. Появившийся во время пандемии данные также показали, что обучение навыкам преодоления трудностей может укрепить психологическое здоровье перед лицом стресса, связанного с COVID-19 [29].

Жизнестойкость у пациентов с катарактой и глаукомой оказалась по величине аллостатического индекса сниженной, чем у пациентов без данных офтальмологических заболеваний и была

ассоциирована с таким функциональным дефицитом как риск синдрома падений, синдром падений [27]. Частота последнего среди пациентов с умеренной жизнестойкостью составила $22,6 \pm 3,9$ против $41,3 \pm 4,5$ случаев на 100 пациентов с низкой жизнестойкостью. При обследовании пациентов с глаукомой, осложнённой катарактой, выявлена более низкая жизнестойкость ($30,65 \pm 5,73$ баллов), чем у больных ревматоидным артритом ($41,51 \pm 7,07$ баллов) ($p < 0,07$) [22]. Как видно из представленных результатов первичная глаукома существенно снижает жизнестойкость пациентов пожилого возраста, чем такое серьёзное соматическое заболевание как ревматоидный артрит. Это важно для понимания отечественными геронтологами и офтальмологами, что зрительный дефицит представляет значимый и весомый фактор снижения возрастной жизнеспособности и воспринимать это как объективный факт и недооценивать нельзя, и не игнорировать влияние офтальмологических заболеваний на более выраженное снижение жизнестойкости при нарушениях зрения и ухудшение в целом геометрического статуса при возрастной патологии органа зрения. В связи с этим, исследование жизнестойкости у пациентов с нарушением зрения необходимо рекомендовать офтальмологам и геронтологам без реверса в соматическую патологию.

Прогрессирование офтальмологических заболеваний и, в частности глаукомы, может оказать негативное влияние на психическое здоровье, и которое усугубляет течение глаукомы и ухудшает результаты её лечения [22]. Поэтому у трети таких пациентов необходимо проводить психологическое консультирование и реализовывать мероприятия по повышению жизнестойкости. Однако основным ограничением этого исследования является отсутствие контрольной группы. Кроме того, число испытуемых было небольшим, и исходы включали только ремиссии или частичные ремиссии глаукомы. Наконец,

испытуемые должны были быть способны понимать анкету. Таким образом, круг пациентов с глаукомой, охваченных в этом исследовании, был узким. Тем не менее считается, что эти результаты могут предложить новые идеи и направления исследований для улучшения качества жизни пациентов с глаукомой. В другом исследовании [30] при использовании шкалы Коннора-Дэвидсона-25, также как и нами при применении теста А.В. Махнача у пациентов с нарушением зрения вследствие травм глаза и других травм выявлена общая закономерность – снижение жизнестойкости – до $61,75 \pm 9,35$ баллов при максимально возможных 100 баллах. Однако ограничением этого исследования [30] по сравнению с нашим является отсутствие контрольной группы.

Заключение. Зрительный дефицит и травмы в пожилом возрасте способствуют снижению интегрального показателя возрастной жизнеспособности в 1,45 раза за счёт ухудшения таких позиций, как внутренний локус контроля, настойчивость, самоэффективность, совладение и адаптация. При этом риск снижения жизнестойкости среди обследованных пациентов ассоциирован с понижением настойчивости, совладения и адаптации, внутренним локусом и самоэффективностью в пределах 2,214-2,769 с достоверными доверительными интервалами. Установленное снижение возрастной жизнеспособности у пациентов с нарушением зрения и травмами свидетельствует о важности её определения офтальмологами, геронтологами и гериатрами на различных этапах взаимодействия с пациентами – до начала лечения, в реабилитационном периоде, после лечения и при геронтопрофилактике с целью обоснования мероприятий по улучшению возрастной жизнеспособности.

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. Ильницкий АН, Кравченко ЕС, Прощаев КИ. Возрастная жизнеспособность как новый концепт геронтологии и гериатрии. Институт психологии Российской академии наук. Организационная психология и психология труда. 2021;6(4):63-86. DOI: https://doi.org/10.38098/ipran.opwp_2021_21_4_003
2. Рубинский АВ, Шишкевич АН, Прощаев КИ, и др. Анализ возрастной жизнеспособности по вариабельности сердечного ритма у пожилых пациентов пульмонологического профиля. Клиническая геронтология. 2022;28(5-6):43-54. DOI: <https://doi.org/10.26347/1607-2499202205-06043-054>
3. Фабрикантов ОЛ, Копылов АЕ, Агарков НМ, и др. Возрастная жизнеспособность пациентов с офтальмопатологией в зависимости от диссоциации возраста. Офтальмология. 2024;21(4):838-843. DOI: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-4-838-843>
4. Shabani M, Taheri-Kharamah Z, Saghaipour A, et al. Resilience and spirituality mediate anxiety and life satisfaction in chronically ill older adults. BMC Psychology. 2023;11(1):256. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40359-023-01279-z>
5. Qiu Y, Cong Z, Wang X, et al. Potential factors associated with resilience among older adults in rural China: a multilevel analysis. BMC Geriatrics. 2023;23(1):844. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12877-023-04575-w>
6. Ćwirlej-Sozańska A, Wilmonska-Pietruszyńska A, Sozański B, et al. Analysis of chronic illnesses and disability in a community-based sample of elderly people in South-Eastern Poland. Medical Science Monitor. 2018;24:1387. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.904845>
7. Jiang C, Zhu F, Qin T. Relationships between chronic diseases and depression among middle-aged and elderly people in China: a prospective study from CHARLS. Current Medical Science. 2020;40(5):858-870. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2270-5>
8. Валиахметов РМ, Ломанова АК, Абылкаликов СИ. Сравнительный анализ демографической динамики в контексте развития человеческого потенциала в Башкортостане и Татарстане (1959-2021 гг.). Новые исследования Тувы. 2024;4:360-376. DOI: <https://doi.org/10.25178/nit.2024.4.23>
9. Рязанцев СВ, Ростовская ТК, Давлетшина ЛА. Актуальные проблемы демографии и подготовки демографов в Туве. Новые исследования Тувы. 2022;4:146-168. DOI: <https://doi.org/10.25178/nit.2022.4.12>
10. Белоусова ОН, Медзиновский ЮФ, Лихтинова АН, и др. Индивидуальная жизнеспособность в исследовании факторов долголетия. Научные результаты биомедицинских исследований. 2019;5(4):129-138. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-10>
11. Ильницкий АН, Прощаев КИ, Матейовска-Кубешова Х, и др. Возрастная жизнеспособность в геронтологии и гериатрии (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2019;5(4):102-116. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-8>
12. Mahmoud NN., Rothenberger D. From Burnout to Well-Being: A Focus on Resilience. Clinics in Colon and Rectal Surgery. 2019;32(6):415-423. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1692710>
13. Cesari M, Sumi Y, Han ZA, et al. Implementing care for healthy ageing. BMJ Global Health. 2022;7(2):e007778. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-007778>
14. Rezaeipandari H, Mohammadpoorasl A, Morowatisharifabad MA, et al. Psychometric properties of the Persian version of abridged Connor-Davidson Resilience Scale 10 (CD-RISC-10) among older adults. BMC Psychiatry. 2022;22(1):493. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12888-022-04138-0>
15. Laird KT, Lavretsky H, Paholpak P, et al. Clinical correlates of resilience factors in geriatric depression. International Psychogeriatrics. 2019;31(2):193-202. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1041610217002873>
16. Lassiter JM, Saleh L, Starks T, et al. Race, Ethnicity, Religious Affiliation, and Education Are Associated With Gay and Bisexual Men's Religious and Spiritual Participation and Beliefs: Results From the One Thousand Strong Cohort. Cultural Diversity and Ethnic Minority Psychology. 2017;23(4):468-476. DOI: <https://doi.org/10.1037/cdp0000143>

17. Махнач АВ. Жизнеспособность человека и семьи: социально-психологическая парадигма. М.: Издательство «Институт психологии РАН»; 2016.

18. Агарков НМ, Фабрикантов ОЛ, Николашин СИ, и др. Общественное здоровье и организация здравоохранения. Учебник. Сер. Специалитет. М.: ОО «Издательство «КноРус»; 2019.

19. Воронина ЕА. Доменный принцип создания и реализации программ геронтологической профилактики. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2021;3:117-126. DOI: <https://doi.org/10.24412/2312-2935-2021-3-117-126>

20. Li YT, Ow YS. Development of resilience scale for older adults. Aging and Mental Health. 2022;26(1):159-168. DOI: <https://doi.org/10.1080/13607863.2020.1861212>

21. Zhang S, Yang W, Li X, et al. Clinical and genetic characterization of a large cohort of patients with Wilson's disease in China. Translational Neurodegeneration. 2022;11(1):13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00287-0>

22. Peng Q, Qu B, Sznajder KK, et al. Exploring the Association Between Resilience and Quality of Life Among Glaucoma Patients: Sleep Disturbance as a Mediating Factor. Frontiers in Medicine. 2022;9:842864. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.842864>

23. Sisto A, Vicinanza F, Campanozzi LL, et al. Towards a Transversal Definition of Psychological Resilience: A Literature Review. Medicina. 2019;55(11):745. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina55110745>

24. Crane MF, Searle BJ, Kangas M, et al. How resilience is strengthened by exposure to stressors: the systematic self-reflection model of resilience strengthening. Anxiety, Stress and Coping. 2019;32(1):1-17. DOI: <https://doi.org/10.1080/10615806.2018.1506640>

25. Harms CA, Cohen L, Pooley JA, et al. Quality of life and psychological distress in cancer survivors: The role of psycho-social resources for resilience. Psycho-Oncology. 2019;28(2):271-277. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.4934>

26. Бадердинова ЛВ, Блохина НВ, Демин АВ, и др. Возрастная жизнеспособность и выход на пенсию (обзор литературы). Успехи геронтологии. 2023;36(3):292-301. DOI: <https://doi.org/10.34922/AE.2023.36.3.002>

27. Фабрикантов ОЛ, Агарков НМ, Лев ИВ, и др. Аллостатическая нагрузка как способ

объективизации возрастной жизнеспособности пациентов с офтальмопатологией. Научные результаты биомедицинских исследований. 2021;7(4):451-460. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-10>

28. Park CL, Finkelstein-Fox L, Russell BS, et al. Psychological resilience early in the COVID-19 pandemic: Stressors, resources, and coping strategies in a national sample of Americans. American Psychologist. 2021;76(5):715-728. DOI: <https://doi.org/10.1037/amp0000813>

29. Khalaf OO, Khalil MA, Abdelmaksoud R. Coping with depression and anxiety in Egyptian physicians during COVID-19 pandemic. Middle East Current Psychiatry. 2020;27:63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43045-020-00070-9>

30. Wang Y, Zhao Y, Xie S, et al. Resilience Mediates the Relationship Between Social Support and Quality of Life in Patients With Primary Glaucoma. Frontiers in Psychiatry. 2019;10:22. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00022>

References

1. Ilitskiy AN, Kravchenko ES, Proshchaev KI. Resilience as a new concept of gerontology and geriatrics. Institute of Psychology of the Russian Academy of Sciences. Organizational Psychology and Psychology of Labor. 2021;6(4):63-86. Russian. DOI: https://doi.org/10.38098/ipran.opwp_2021_21_4_003

2. Rubinskiy AV, Shishkevich AN, Prashchaev KI, et al. Analysis of heart rate variability as an age resilience index in pulmonological elderly patients. Clinical gerontology. 2022;28(5-6):43-54. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26347/1607-2499202205-06043-054>

3. Fabrikantov OL, Kopylov AE, Agarkov NM, et al. Age-Related Viability of Patients with Ophthalmopathology Depending on Age Dissociation. Ophthalmology in Russia. 2024;21(4):838-843. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-4-838-843>

4. Shabani M, Taheri-Kharamah Z, Saghaipour A, et al. Resilience and spirituality mediate anxiety and life satisfaction in chronically ill older adults. BMC Psychology. 2023;11(1):256. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40359-023-01279-z>

5. Qiu Y, Cong Z, Wang X, et al. Potential factors associated with resilience among older adults in rural China: a multilevel analysis. BMC

- Geriatrics. 2023;23(1):844. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12877-023-04575-w>
6. Ćwirlej-Sozańska A, Wilmowska-Pietruszyńska A, Sozański B, et al. Analysis of chronic illnesses and disability in a community-based sample of elderly people in South-Eastern Poland. *Medical Science Monitor*. 2018;24:1387. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.904845>
7. Jiang C, Zhu F, Qin T. Relationships between chronic diseases and depression among middle-aged and elderly people in China: a prospective study from CHARLS. *Current Medical Science*. 2020;40(5):858-870. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2270-5>
8. Valiakhmetov RM, Lomanova AK, Abylkalikov SI. Comparative analysis of demographic dynamics in the context of human development in Bashkortostan and Tatarstan (1959-2021). *New Research of Tuva*. 2024;4:360-376. Russian. DOI: <https://doi.org/10.25178/nit.2024.4.23>
9. Ryazantsev SV, Rostovskaya TK, Davletshina LA. Current issues of demography and training of demographers in Tuva. *New Research of Tuva*. 2022;4:146-168. Russian. DOI: <https://doi.org/10.25178/nit.2022.4.12>
10. Belousova ON, Medzinovsky YuF, Likhtinova AN, et al. Individual resilience in the study of longevity factors. *Research Results in Biomedicine*. 2019;5(4):129-138. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-10>
11. Ilnitski AN, Prashchayeu KI, Matejovska-Kubesova H, et al. Resilience in gerontology and geriatrics (review). *Research Results in Biomedicine*. 2019;5(4):102-116. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-8>
12. Mahmoud NN, Rothenberger D. From Burnout to Well-Being: A Focus on Resilience. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2019;32(6):415-423. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1692710>
13. Cesari M, Sumi Y, Han ZA, et al. Implementing care for healthy ageing. *BMJ Global Health*. 2022;7(2):e007778. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-007778>
14. Rezaeipandari H, Mohammadpoorasl A, Morowatisharifabad MA, et al. Psychometric properties of the Persian version of abridged Connor-Davidson Resilience Scale 10 (CD-RISC-10) among older adults. *BMC Psychiatry*. 2022;22(1):493. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12888-022-04138-0>
15. Laird KT, Lavretsky H, Paholpak P, et al. Clinical correlates of resilience factors in geriatric depression. *International Psychogeriatrics*. 2019;31(2):193-202. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1041610217002873>
16. Lassiter JM, Saleh L, Starks T, et al. Race, Ethnicity, Religious Affiliation, and Education Are Associated With Gay and Bisexual Men's Religious and Spiritual Participation and Beliefs: Results From the One Thousand Strong Cohort. *Cultural Diversity and Ethnic Minority Psychology*. 2017;23(4):468-476. DOI: <https://doi.org/10.1037/cdp0000143>
17. Makhnach AV. The viability of man and family: a socio-psychological paradigm. Moscow: Institute of Psychology of the Russian Academy of Sciences; 2016. Russian.
18. Agarkov NM, Fabrikantov OL, Nikolashin SI, et al. Public health and healthcare organization. Textbook. Ser. Specialty. Moscow: KnoRus Publishing House; 2019. Russian.
19. Voronina EA. Domain principle of creating and implementing gerontological prevention programs. *Current problems of health care and medical statistics*. 2021;3:117-126. Russian. DOI: <https://doi.org/10.24412/2312-2935-2021-3-117-126>
20. Li YT, Ow YS. Development of resilience scale for older adults. *Aging and Mental Health*. 2022;26(1):159-168. DOI: <https://doi.org/10.1080/13607863.2020.1861212>
21. Zhang S, Yang W, Li X, et al. Clinical and genetic characterization of a large cohort of patients with Wilson's disease in China. *Translational Neurodegeneration*. 2022;11(1):13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00287-0>
22. Peng Q, Qu B, Sznajder KK, et al. Exploring the Association Between Resilience and Quality of Life Among Glaucoma Patients: Sleep Disturbance as a Mediating Factor. *Frontiers in Medicine*. 2022;9:842864. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.842864>
23. Sisto A, Vicinanza F, Campanozzi LL, et al. Towards a Transversal Definition of Psychological Resilience: A Literature Review. *Medicina*. 2019;55(11):745. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina55110745>
24. Crane MF, Searle BJ, Kangas M, et al. How resilience is strengthened by exposure to stressors: the systematic self-reflection model of resilience strengthening. *Anxiety, Stress and Coping*. 2019;32(1):1-17. DOI: <https://doi.org/10.1080/10615806.2018.1506640>

25. Harms CA, Cohen L, Pooley JA, et al. Quality of life and psychological distress in cancer survivors: The role of psycho-social resources for resilience. *Psycho-Oncology*. 2019;28(2):271-277. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.4934>

26. Baderdinova LV, Blokhina NV, Demin AV, et al. Older age vitality and retirement (literature review). *Advances in Gerontology*. 2023;36(3):292-301. Russian. DOI: <https://doi.org/10.34922/AE.2023.36.3.002>

27. Fabrikantov OL, Agarkov NM, Lev IV, et al. Allostatic load as a method of objectification of age-related viability of patients with ophthalmopathology. *Research Results in Biomedicine*. 2021;7(4):451-460. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-10>

28. Park CL, Finkelstein-Fox L, Russell BS, et al. Psychological resilience early in the COVID-19 pandemic: Stressors, resources, and coping strategies in a national sample of Americans. *American Psychologist*. 2021;76(5):715-728. DOI: <https://doi.org/10.1037/amp0000813>

29. Khalaf OO, Khalil MA, Abdelmaksoud R. Coping with depression and anxiety in Egyptian physicians during COVID-19 pandemic. *Middle East Current Psychiatry*. 2020;27:63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43045-020-00070-9>

30. Wang Y, Zhao Y, Xie S, et al. Resilience Mediates the Relationship Between Social Support and Quality of Life in Patients With Primary Glaucoma. *Frontiers in Psychiatry*. 2019;10:22. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00022>

Статья поступила в редакцию 24 февраля 2025 г.

Поступила после доработки 6 апреля 2025 г.

Принята к печати 16 апреля 2025 г.

Received 24 February 2025

Revised 6 April 2025

Accepted 16 April 2025

Информация об авторах

Михаил Александрович Неудахин, врач-офтальмолог I офтальмологического отделения, Тамбовский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», г. Тамбов, Российская Федерация, E-mail: [mntk@mntk-](mailto:mntk@mntk-tambov.ru)

[tambov.ru](mailto:mntk@mntk-tambov.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3583-3486>.

Николай Михайлович Агарков, доктор медицинских наук, профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: vitalaxen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4821-3692>.

Асланбек Сабинович Оглы Ибиев, врач травматолог-ортопед, врач УЗИ ООО «Лахта Клиника», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, E-mail: info@lahtaclinic.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6625-4394>.

Евгений Николаевич Коровин, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой системного анализа и управления в медицинских системах ФГБОУ ВО «Воронежский государственный технический университет», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: korovin@saums.vorstu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9984-987X>.

Анастасия Сергеевна Лысенко, врач-невролог ОБУЗ «Курская городская поликлиника №1 им. Н.С. Короткова», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: anastasiya-lysenko-96@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-9205-0122>.

Максим Леонидович Курзин, врач-офтальмолог I офтальмологического отделения, Тамбовский филиал 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, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8788-0300>.

Илья Юрьевич Шарапов, врач-офтальмолог I офтальмологического отделения, Тамбовский филиал 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, ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9926-9617>.

Information about the authors

Mikhail A. Neudakhin, Ophthalmologist at the 1st Ophthalmological Department, Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution (Tambov Branch), Tambov, Russia, E-mail:

mntk@mntk-tambov.ru, ORCID:
<https://orcid.org/0000-0003-3583-3486>.

Nikolay M. Agarkov, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Biomedical Engineering, Southwest State University, Kursk, Russia, E-mail: vitalaxen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4821-3692>.

Aslanbek S.O. Ibiev, Traumatologist-orthopedist, Ultrasound Doctor, Lahta Clinic, Saint Petersburg, Russia, E-mail: info@lahtaclinic.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6625-4394>.

Evgeny N. Korovin, Doct. Sci. (Technical Sciences), Professor, Head of the Department of Systems Analysis and Management in Medical Systems, Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia, E-mail: korovin@saums.vorstu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9984-987X>.

Anastasia S. Lysenko, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Biomedical Engineering, Korotkov Kursk City Hospital No. 1, Kursk, Russia, E-mail: anastasiya-lysenko-96@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-9205-0122>.

Maxim L. Kurzin, Ophthalmologist at the 1st Ophthalmological Department, Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution (Tambov Branch), Tambov, Russia, E-mail: mntk@mntk-tambov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8788-0300>.

Ilya Y. Sharapov, Ophthalmologist at the 1st Ophthalmological Department, Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution (Tambov Branch), Tambov, Russia, E-mail: mntk@mntk-tambov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9926-9617>.