

**ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И
МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ФИБРОЗОМ
И ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ HCV ИНФЕКЦИИ**

Алейник В. А. ^{1, 2},

Жураева М. А. ¹,

Абдулазизхожиев Б. Р. ¹,

Бабич С. М. ¹,

Пошахужаев Н. Х. ¹

¹ Андижанский государственный медицинский институт.

² Андижанский института иммунологии и геномики человека АН РУз.

**CHANGES IN IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND LEUCOCYTE
DNA METHYLATION IN PATIENTS WITH LIVER FIBROSIS AND
CIRRHOSIS RELATED TO CHRONIC HCV INFECTION**

Aleynik V. A. ^{a, b},

Juraeva M. A. ^a,

Abdulazizxojiyev B. R. ^a,

Babich S. M. ^a,

Poshaxodgayev N. X. ^a

^a Andijan State Medical Institute, Andijan, Republic of Uzbekistan.

^b Institute of Immunology and Human Genomics.

Резюме

В работе изучалось изменение иммунологических показателей и метилирования ДНК лейкоцитов у больных с фиброзом и циррозом печени при хронической ВГС инфекции. Изменения в метилировании и последующая модуляция генной экспрессии могут играть роль в патогенезе инфекции, вызванной вирусом гепатита С. В клетках, подверженных заражению, активация вирусом гепатита С ассоциируется с увеличением активности ДНК-метилтрансфераз, что указывает на сдвиг в профиле метилирования.

Целью исследования было изучение изменений иммунологических показателей и метилирования ДНК лейкоцитов у больных с фиброзом и циррозом печени при хронической ВГС инфекции. В исследовании приняли участие 120 человек, разделённых на пять групп. У всех участников исследования в сыворотке крови определяли уровень провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) и противовоспалительного интерлейкина-10 (ИЛ-10), также оценивали уровни аларминов, а именно концентрацию белка HMGB1 и интерлейкина-1 α (ИЛ-1 α), а также интерлейкина-33 (ИЛ-33) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест-систем. Метилирование ДНК в лейкоцитах оценивалось по концентрации 5-метил-2'-дезоксцитидина, образующегося в результате метилирования цитозина в положении C5. На ранней стадии (пост-ВГС) умеренное повышение в составе лизатов лейкоцитов активности DNMT1 и уровня 5-mdC отражает компенсаторный механизм, направленный на подавление провоспалительных генов. В период хронической ВГС инфекции без фиброза максимальные значения DNMT1 указывают на активное подавление вирусной репликации и воспаления через гиперметилирование. При хронической ВГС инфекции и фиброзе (F1,2) снижение DNMT1 и 5-mdC свидетельствует об истощении эпигенетической регуляции, что способствует активации

Introduction. The work studied the change in immunological parameters and

leukocyte DNA methylation in patients with liver fibrosis and cirrhosis during chronic HCV infection. Changes in methylation and subsequent modulation of gene expression may play a role in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. In cells susceptible to infection, hepatitis C virus activation is associated with increased DNA methyltransferase activity that suggests a shift in methylation profile.

The aim of the study: to study the change in immunological parameters and leukocyte DNA methylation in patients with liver fibrosis and cirrhosis during chronic HCV infection.

The study involved 120 subjects divided into five groups. All study participants were examined for serum level of proinflammatory cytokines, including interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10), as well as alarmins such as HMGB1 protein, interleukin-1 α (IL-1 α), and interleukin-33 (IL-33) analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using standard test kits. Leukocyte DNA methylation was assessed by the concentration of 5-methyl-2'-deoxycytidine formed due to methylation of cytosine at position C5.

At the early stage (post-HCV), a moderately increased DNMT1 activity and 5-mdC levels in leukocyte lysates mirror a compensatory mechanism aimed at suppressing proinflammatory genes. During chronic HCV infection without fibrosis, maximum DNMT1 values point at active suppression of viral replication and inflammation through hypermethylation. In chronic HCV infection and fibrosis (F1,2), a decrease in DNMT1 and 5-mdC evidence about exhausted epigenetic regulation, which contributes to profibrotic gene activation. At the stage of liver cirrhosis (F4), coupled to HCV infection, a significant decrease in DNMT1 and 5-mdC confirms deep epigenetic dysfunction associated with irreversible liver damage. In this case, inflammatory imbalance and fibrogenesis are manifested as progressively increased serum proinflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-33) upon transition from chronic infection to cirrhosis, forming a vicious circle of inflammation and fibrosis.

The progression of HCV disease from the post-infection stage to cirrhosis is characterized by a gradual depletion of epigenetic regulatory mechanisms (DNMT1/5-mdC), which leads to elevated proinflammatory status and activation of fibrogenesis. Study of DNA methylation markers in leukocytes together/in parallel with cytokine profile allowed to identify deeper immune mechanisms of HCV development from post-infection to cirrhosis. Levels of DNMT1 and 5-mdC in leukocytes can serve as potential markers of HCV infection stage and risk of fibrotic complications.

Keywords: chronic BFC, liver fibrosis, liver cirrhosis, cytokines, DNA methyltransferase 1, 5-methyl-2'-deoxycytidine, alarmins, epigenetic DNA methylation.

1 Введение

Появляется всё больше свидетельств того, что острые вирусные инфекции, наряду с временными транскриптомными реакциями, инициируют эпигенетическое ремоделирование как часть иммунного ответа, включая метилирование ДНК и модификации гистонов, которые могут сохраняться даже после устранения вируса. Существует весомая база данных, основанная на эпигенетических исследованиях, указывающая на то, что вирус способен вызывать высокоспецифические изменения в геноме хозяина через взаимодействие с вирусными антигенами [12. 17]. Изменения в метилировании и последующая модуляция генной экспрессии могут играть роль в патогенезе инфекции, вызванной вирусом гепатита С. В клетках, подверженных заражению, активация вирусом гепатита С ассоциируется с увеличением активности ДНК-метилтрансфераз, что указывает на сдвиг в метилировочном профиле. Метилирование ДНК может оказывать влияние на противовирусный иммунный ответ организма [21]. Вирус гепатита С обладает ограниченной способностью к интеграции в геном гепатоцитов, но реализует свою активность посредством многоступенчатого процесса, ведущего к хроническому воспалению печени и развитию фиброза [7]. Вопрос предотвращения перехода гепатита С в цирроз остаётся актуальным. Это требует более глубокого понимания молекулярных особенностей цирроза, вызванного ВГС, с целью повышения эффективности лечения [11]. В зависимости от локализации участков метилирования в геномной области, оно может выполнять функцию либо репрессора, либо активатора генной экспрессии [4]. В настоящее время появляются всё новые данные об эпигенетической регуляции хронических печёночных заболеваний. Осознание значимости ДНК-метилирования открывает возможности для улучшенного подхода к лечению фиброза и цирроза [19]. Гибель клеток может провоцировать высвобождение молекулярных паттернов, способствующих активации инфламмасом, дальнейшему клеточному разрушению и органной

недостаточности. Маркеры клеточной гибели, связанные с повреждением (DAMP), ранее показали клиническую ценность в диагностике, оценке тяжести и прогнозировании разнообразных острых и хронических печёночных заболеваний, включая хронические формы гепатита С [15]. Алармины представляют собой эндогенные, постоянно экспрессируемые белки/пептиды с иммуностимулирующими свойствами. Они высвобождаются в ткани при дегрануляции, повреждении или гибели клеток, а также в ответ на иммунные стимулы [6]. Рецепторы TLR обладают двойной способностью запускать как клеточную защиту, так и клеточную гибель [1]. Алармины активируют внутриклеточные сигнальные каскады, ведущие к продукции цитокинов и запуску воспалительной реакции [5]. Помимо этого, алармины, являясь внутренними факторами, играют роль в различных клеточных функциях в нормальных условиях, но при гибели клетки они попадают во внеклеточное пространство и могут провоцировать стерильное воспаление [8]. Большинство хронических печёночных заболеваний, таких как вирусный гепатит С или неалкогольный стеатогепатит, способствуют формированию печёночного фиброза с образованием рубцовой ткани [10]. В дальнейшем более детальное понимание молекулярных путей, отвечающих за регрессию печёночного фиброза, может стать основой для разработки новых методов профилактики и терапии фиброза и цирроза печени [18].

Цель исследования: изучить изменение иммунологических показателей и метилирования ДНК лейкоцитов у больных с фиброзом и циррозом печени при хронической ВГС инфекции.

2 Материал и методы

Исследование было одобрено этическим комитетом при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан. В исследовании приняли участие 120 человек, разделённых на пять групп. Все больные были проинформированы о предстоящем исследовании и получены от них

письменные согласия на участие в нем. В первую группу вошли 40 здоровых добровольцев. Вторая группа (n = 27) включала пациентов с признаками перенесённой ВГС-инфекции (постинфекционный статус), подтверждёнными наличием соответствующих серологических маркеров. В третью группу были включены 15 пациентов с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени, в четвертую группу вошли 16 пациентов с хронической ВГС-инфекцией с фиброзом печени (стадия F1,2 по данным эластографии), а пятую группу составили 22 пациента с хроническим гепатитом С и подтверждённым циррозом печени (стадия F4 по данным эластографии). У всех участников исследования проводился анализ сыворотки крови на уровень провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) и противовоспалительного интерлейкина-10 (ИЛ-10) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Для оценки уровня аларминов, участвующих в процессах стерильного воспаления, измерялись концентрации белка HMGB1 и интерлейкина-1 α (ИЛ-1 α) с применением ИФА-наборов компании «CusabioBiotech» (США), а также интерлейкина-33 (IL-33) с использованием тест-системы производства «CloudCloneCorp» (США). Показатели мочевой кислоты определяли биохимическим методом с применением диагностических наборов фирмы «HUMAN» (Германия). Метилирование ДНК в лейкоцитах оценивалось по концентрации 5-метил-2'-дезоксцитидина, образующегося в результате метилирования цитозина в положении C5. Для анализа использовали супернатант отмытых лизированных лейкоцитов, выделенных методом градиентной центрифугации с применением среды Фиколл-Верографин. Концентрация 5-метил-2'-дезоксцитидина определялась методом ИФА с использованием стандартного набора от BCM Diagnostics (США). Активность ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1) также измеряли методом ИФА в

86 супернатантелизированных лейкоцитах с использованием набора
87 производства компании «HUMAN» (Германия).

88 Статистическая обработка результатов проводилась при помощи IBM
89 SPSS Statistics 26.0 и Microsoft Office Excel 2010. Результаты исследований
90 подвергали статистической обработке методом вариационной статистики с
91 вычислением средних арифметических и их ошибок ($M \pm m$). Нормальность
92 распределения исследуемых параметров проверяли методом Колмогорова–
93 Смирнова с поправкой Большева. Статистическая значимость различий
94 независимых выборок с нормальным распределением оценивалась с
95 помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

96 3 Результаты

97 В ходе проведенных исследований было установлено, что у пациентов с
98 пост-ВГС-инфекцией показатель ФНО-α в сыворотке крови (табл.) был в 3,3
99 раза выше по сравнению с группой здоровых ($p < 0,001$). В группе больных с
100 хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени уровень ФНО-α был в 8,1
101 раза выше, чем у здоровых, и в 2,5 раза превышал показатель группы с пост-
102 инфекцией ($p < 0,001$). У пациентов с хроническим гепатитом С и фиброзом
103 печени (F1,2) величина ФНО-α была в 12,4 раза выше здоровых, а также в 3,8
104 раза превышала уровень в группе пост-ВГС ($p < 0,001$) и в 1,5 раза – уровень у
105 больных с хронической инфекцией без фиброза ($p < 0,01$). Наибольшее
106 повышение концентрации ФНО-α наблюдалось у пациентов с циррозом
107 печени (F4), показатель в 24 раза превышал величину у здоровых и в 7,3 раза –
108 уровень в группе пост-ВГС ($p < 0,001$). Также наблюдалось преобладание
109 данного показателя в 2,9 раза по сравнению с больными с хронической ВГС –
110 инфекцией без фиброза и в 1,9 раза – у пациентов, имеющих фиброз печени (p
111 $< 0,01$).

112 Подобная тенденция изменений была отмечена и для показателей ИЛ-1β
113 (табл.) в сыворотке крови. У пациентов с пост-ВГС-инфекцией уровень ИЛ-1β

увеличивался в 4 раза ($p < 0,001$) в сравнении со здоровыми. У больных с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени уровень ИЛ-1 β превышал в 10 раз показатель здоровых и в 2,5 раза был больше по сравнению с группой пост-ВГС ($p < 0,001$). У пациентов с фиброзом печени (F1,2) величина ИЛ-1 β была в 16,1 раза выше, чем у здоровых, и в 4 раза превышала уровень в группе пост-инфекции ($p < 0,001$). У пациентов с циррозом печени (F4) данный маркер превышал величину у здоровых в 30 раз и в 7,4 раза – показатель в группе пост-ВГС ($p < 0,001$), а также в 3 раза выше, чем у больных без фиброза печени, и в 1,8 раза выше чем у пациентов с фиброзом печени ($p < 0,01$).

Что касается противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (табл.), в группе с пост-ВГС-инфекцией его концентрация снижалась в 1,5 раза. ($p < 0,05$) относительно группы здоровых лиц. При хронической ВГС-инфекции у больных без фиброза печени уровень ИЛ-10 был в 2,9 раза ниже, чем у здоровых, и в 1,9 раза меньше по сравнению с группой пост-ВГС-инфекции ($p < 0,001$). У пациентов с фиброзом печени (F1,2) показатель ИЛ-10 был в 5,5 раза ниже, чем у здоровых, и в 3,7 раза меньше по сравнению с группой пост-инфекции ($p < 0,001$). У больных с циррозом печени (F4) уровень ИЛ-10 был минимальным – в 14,4 раза ниже, чем у здоровых, и в 7,3 раза ниже, чем у больных пост-ВГС ($p < 0,001$). Этот показатель также был в 5 раз меньше, чем у пациентов без фиброза печени, и в 2,6 разачем у пациентов с фиброзом печени ($p < 0,001$).

Активность DNMT1 (табл.) у пациентов с пост-ВГС-инфекцией была в 1,7 раза ($p < 0,01$) выше показателя группы здоровых. У больных с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени величина DNMT1 было выше в 2,8 раза относительно здоровых лиц и в 1,7 раза больше, чем в группе пост-инфекции ($p < 0,001$). В то же время, у больных с хронической ВГС-инфекцией и фиброзом печени (F1,2) показатель DNMT1 был в 1,5 раза выше относительно здоровых лиц ($p < 0,001$), а также несущественно больше в 1,2 раза по сравнению с группой пост-инфекции ($p > 0,05$) и в 1,9 раза ниже, чем у

143 больных с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени ($p < 0,05$). У
144 пациентов с циррозом печени (F4) на фоне ВГС-инфекции концентрация
145 DNMT1 незначительно превышала уровень у здоровых лиц - в 1,3 раза
146 ($p > 0,05$), а также был ниже в 1,2 раза по сравнению с группой пост-
147 ВГС ($p > 0,05$). Также показатель был в 2,1 раза меньше ($p < 0,001$), чем
148 у больных с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени и в 1,4 раза
149 меньше ($p < 0,05$), чем у больных с хронической ВГС-инфекцией и фиброзом
150 печени (F1,2).

151 Уровень 5-mdC (табл.) в составе лизатов лейкоцитов у больных пост-
152 ВГС-инфекцией увеличивался в 1,7 раза ($p < 0,01$) в сравнении со здоровыми.
153 При хронической ВГС-инфекции у больных без фиброза печени величина 5-
154 mdC была выше в 2,6 раза ($p < 0,001$) относительно здоровых лиц и в 1,5 раза
155 ($p < 0,05$) больше, чем в группе пост-инфекции. В то же время, у больных с
156 хронической ВГС-инфекцией и фиброзом печени (F1,2) показатель 5-mdC был
157 в 1,8 раза больше относительно здоровых лиц ($p < 0,001$), а также
158 несущественно больше в 1,1 раза по сравнению с группой пост-инфекции (p
159 $> 0,05$) и в 1,4 раза меньше, чем у больных с хронической ВГС-инфекцией без
160 фиброза печени ($p < 0,05$). У пациентов с циррозом печени (F4) на фоне ВГС-
161 инфекции концентрация 5-mdC незначительно превышала уровень у здоровых
162 лиц - в 1,3 раза ($p > 0,05$), а также была в 1,3 раза ниже по сравнению с группой
163 пост-ВГС-инфекции ($p > 0,05$). Также уровень был в 1,9 раза меньше у больных
164 с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени и в 1,4 раза ниже у
165 больных с хронической ВГС-инфекцией и фиброзом печени (F1,2).

166 Концентрация HMGB1 (табл.) в сыворотке крови при пост-ВГС-
167 инфекции была выше в 1,5 раза ($p < 0,05$) в сравнении со здоровыми лицами. У
168 пациентов с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени уровень
169 HMGB1 был в 1,8 раза ($p < 0,001$) больше относительно здоровых лиц и
170 несущественно выше по сравнению с группой пост-ВГС (в 1,1 раза, $p > 0,05$). В
171 группе больных с хронической ВГС-инфекцией и фиброзом печени (F1,2)

концентрация HMGB1 была в 2,5 раза больше, чем у здоровых лиц ($p < 0,001$), а также выше в 1,6 раза по сравнению с группой пост-инфекции ($p < 0,01$) и в 1,4 раза больше, чем у больных с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени ($p < 0,05$). Наибольшие изменения концентрации HMGB1 были выявлены у пациентов с циррозом печени (F4) на фоне ВГС-инфекции, где уровень этого показателя был в 3,6 раза больше, чем у здоровых лиц ($p < 0,001$), в 2,3 раза больше по сравнению с группой пост-ВГС ($p < 0,05$), в 2,1 раза выше, чем у больных хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени и в 1,4 раза больше, чем у больных хронической ВГС-инфекцией и фиброзом печени ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно).

У больных пост-ВГС-инфекцией ИЛ-1 α (табл.) был в **1,6 раза** ($p < 0,01$) выше относительно здоровых. При хронической ВГС без фиброза уровень достиг в **2,0 раза** больших цифр, чем у здоровых ($p < 0,001$). У пациентов с фиброзом (F1,2) показатель был в **2,9 раза** выше, чем у здоровых ($p < 0,001$), в **1,9 раза** выше группы пост-ВГС, $p < 0,01$, в **1,5 раза** - хронической ВГС инфекции без фиброза ($p < 0,05$). При циррозе (F4) концентрация ИЛ-1 α была в **4,0 раза** выше относительно здоровых, $p < 0,001$, в **2,6 раза** - группы пост-ВГС-инфекции, $p < 0,001$, в **2,0 раза** - хронической ВГС без фиброза, $p < 0,001$, и в **1,4 раза** - группы F1,2, $p < 0,001$.

Показатель ИЛ-33 (табл.) в группе пост-ВГС-инфекции отмечен выше в **1,8 раза** ($p < 0,001$) относительно здоровых лиц. При хронической ВГС без фиброза ИЛ-33 был в **2,3 раза** выше контроля ($p < 0,001$). У пациентов с фиброзом (F1,2) значение показателя было в **3,4 раза** выше контроля ($p < 0,001$), в **1,9 раза** выше группы пост-ВГС-инфекции ($p < 0,001$), в **1,5 раза** - хронической ВГС без фиброза ($p < 0,05$). При циррозе (F4) концентрация ИЛ-33 была в **4,0 раза** выше контроля, в **2,6 раза** - группы пост-ВГС-инфекции, в **2,0 раза** - хронической ВГС без фиброза ($p < 0,001$), в **1,4 раза** - группы F1,2 ($p < 0,05$).

В группе пост-ВГС-инфекции наблюдалось незначительное увеличение уровня мочевой кислоты в 1,3 раза ($p > 0,05$) в сравнении со здоровыми. При хроническом ВГС без фиброза уровень стал в **1,4 раза** выше здоровых ($p < 0,05$), в 1,1 раза ($p > 0,05$) больше группы пост-инфекции. У пациентов с фиброзом (F1,2) уровень мочевой кислоты был выше контроля в **1,6 раза** ($p < 0,05$). При циррозе (F4) концентрация мочевой кислоты была в **1,8 раза** выше здоровых ($p < 0,001$) и в **1,5 раза** выше группы пост-ВГС-инфекции ($p < 0,05$). Также в **1,3 раза** ($p > 0,05$) больше больных с хронической ВГС-инфекцией без фиброза печени и в **1,2 раза** ($p > 0,05$) выше больных хронической ВГС-инфекцией с фиброзом печени (F1,2).

4 Обсуждение

Результаты проведённого исследования демонстрируют динамическую изменчивость активности ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1) и уровня 5-метилдезоксцитидина (5-mdC) в лейкоцитах пациентов на различных стадиях вирусного гепатита С (ВГС). Эти эпигенетические маркеры тесно связаны с клиническим течением заболевания и степенью фибротических изменений в печени, отражая характерные изменения молекулярной регуляции воспалительных и фибротических процессов. У пациентов, перенёвших ВГС-инфекцию, но не проявляющих признаков хронического воспаления, в лизатах лейкоцитов отмечается умеренное повышение активности DNMT1 и содержания 5-mdC по сравнению со здоровыми лицами. Это может свидетельствовать о компенсаторной эпигенетической реакции организма, направленной на подавление остаточной провоспалительной активности путём гиперметилирования генов воспаления. Такая регуляция может ограничивать вирусную репликацию и снижать остаточное воспаление. Эти наблюдения согласуются с данными, указывающими на то, что гиперметилирование ДНК в определённых участках может приводить к изменённой экспрессии генов, вовлечённых в патологические процессы, включая дисрегуляцию макрофагов [9]. При переходе заболевания в

хроническую форму эффективность данного механизма ослабевает, что позволяет заболеванию прогрессировать. На стадии хронической ВГС-инфекции без признаков фиброза наблюдаются максимальные значения активности DNMT1 и уровня 5-mdC. Это, вероятно, отражает активную эпигенетическую защитную стратегию клеток, направленную на контроль вирусной нагрузки и воспалительной реакции путём подавления экспрессии генов, участвующих в провоспалительных и иммунных каскадах, включая цитокины. Однако такая гиперметилирующая активность может одновременно нарушать нормальное функционирование иммунной системы, способствуя развитию иммунной дисфункции. Эти выводы подтверждаются исследованиями, где показано, что уровни метилирования ДНК в периферических лейкоцитах коррелируют с вирусной нагрузкой и характером иммуновоспалительного ответа [3]. На стадии хронической ВГС-инфекции с развивающимся фиброзом (F1–F2) отмечается снижение как активности DNMT1, так и содержания 5-mdC по сравнению с фазой хронического воспаления без фиброза. Это может указывать на истощение эпигенетических регуляторных механизмов организма на фоне усиливающегося повреждения тканей. Снижение метилирования способствует активации генов, вовлечённых в воспалительные и фибротические процессы, включая коллагены и TGF- β . На этом этапе существенную роль начинают играть оксидативный стресс, повреждение ДНК и повышение уровня HMGB1 – сигнальной молекулы, высвобождающейся при гибели клеток. Известно, что HMGB1 может угнетать активность DNMT1 через активацию Toll-подобных рецепторов, усиливая эпигенетическую дисрегуляцию. Эти данные согласуются с наблюдениями, согласно которым гипометилирование мононуклеарных клеток периферической крови коррелирует с повышением активности патологического процесса [14]. На стадии цирроза печени (F4) в условиях персистирующей ВГС-инфекции активность DNMT1 и уровень 5-mdC в лейкоцитах снижаются до значений,

258 близких к контрольным. Это может свидетельствовать о глубокой
259 эпигенетической дисрегуляции, обусловленной массивным повреждением
260 гепатоцитов, высоким уровнем оксидативного стресса и накоплением
261 провоспалительных медиаторов (ФНО- α , ИЛ-1 β , HMGB1). На этом этапе
262 гипометилирование может способствовать неконтрольной экспрессии генов,
263 участвующих в воспалении и фиброзе, нарушая репаративные процессы и
264 усиливая апоптоз гепатоцитов. Эти данные подтверждаются исследованиями,
265 где установлено, что хронические заболевания печени сопровождаются
266 изменениями в метилировании ДНК моноклеарных клеток периферической
267 крови, ассоциированными с прогрессированием фиброза [13].

268 Анализ взаимосвязи между изменениями метилирования ДНК в
269 лейкоцитах и уровнем воспалительных маркеров в крови показывает, что
270 концентрация провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-1 α , ИЛ-33)
271 возрастает по мере усугубления фиброза, достигая максимума при циррозе.
272 Это формирует порочный круг, в котором воспаление усиливает фиброгенез,
273 а фиброз поддерживает воспалительный процесс. Эти выводы подкрепляются
274 данными, согласно которым многие интерлейкины, включая ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-
275 17, ИЛ-18, ИЛ-33 и ИЛ-36, обладают выраженными профиброзными
276 свойствами. Они усиливают инфильтрацию моноцитов и макрофагов в ткань
277 печени, способствуют активации провоспалительных каскадов и стимулируют
278 пролиферацию звездчатых клеток печени [20]. На фоне цирроза резко
279 снижается уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10, что ещё больше
280 нарушает баланс в сторону провоспалительного ответа. HMGB1,
281 выступающий маркером некровоспаления, значительно возрастает при
282 циррозе, дополнительно подавляя активность DNMT1 и способствуя
283 гипометилированию через активацию Toll-подобных рецепторов. Эти
284 наблюдения согласуются с результатами исследований, демонстрирующих
285 повышение уровня HMGB1 в плазме и снижение ИЛ-10 у пациентов с
286 циррозом печени [16]. Также установлено, что при циррозе в моноклеарных

клетках периферической крови снижается уровень метилирования ДНК [2]. Таким образом, уровни DNMT1 и 5-mdC в лейкоцитах могут служить потенциальными индикаторами стадии ВГС-инфекции и риска фибротических осложнений. Воздействие на активность DNMT1 или коррекция уровня метилирования, например, с использованием ингибиторов ДНК-метилтрансфераз, может рассматриваться как перспективная стратегия замедления фиброзного процесса, особенно на его ранних стадиях. Необходимы дополнительные исследования для установления причинно-следственных связей между метилированием и экспрессией конкретных генов. Особое внимание должно быть уделено изучению того, отражают ли эпигенетические изменения в лейкоцитах аналогичные процессы в гепатоцитах. Метилирование ДНК в лейкоцитах при ВГС-инфекции демонстрирует этапную динамику: от компенсаторной гиперметилирующей реакции на начальных стадиях до выраженного эпигенетического истощения при циррозе. Это подчёркивает ключевую роль эпигенетических механизмов в патогенезе ВГС-ассоциированных осложнений и открывает перспективы для разработки новых диагностических и терапевтических подходов, направленных на коррекцию эпигенетических нарушений.

5 Выводы

Прогрессирование ВГС от стадии пост-инфекции к циррозу характеризуется **постепенным истощением эпигенетических регуляторных механизмов (DNMT1/5-mdC)**, что ведет к **нарастанию провоспалительного статуса и активации фиброгенеза**.

Изучение маркеров метилирования ДНК в лейкоцитах совместно/параллельно с цитокинами позволило выявить более глубокие иммунные механизмы развития ВГС от пост-инфекции до цирроза.

Уровни DNMT1 и 5-mdC в лейкоцитах могут служить потенциальными маркерами стадии ВГС-инфекции и риска фибротических осложнений.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Показатели больных с фиброзом и циррозом печени при хронической ВГС инфекции.

Table 1. Parameters of patients with liver fibrosis and cirrhosis in chronic HCV infection.

Сывороточные маркеры Serum markers	Здоровые Healthy	ВГС пост-инфекция HCV post-infection	Хроническая ВГС инфекция Chronic HCV infection	ВГС цирроз HCV cirrhosis
Про воспалительные и противовоспалительные интерлейкины крови About inflammatory and anti-inflammatory interleukins of blood				
ФНО- α пг/мл TNF- α pg/ml	3 9 $\pm$ 0,5	12,8 $\pm$ 1,4* (0)	31,5 $\pm$ 3,2* ⁰ (0) 48,2 $\pm$ 4,6* ^{0x} (1,2)	93,5 $\pm$ 9,7* ⁰⁺ (4)
ИЛ-1 β пг/мл IL -1 β pg/ml	2 4 $\pm$ 0,3	9,7 $\pm$ 1,1* (0)	24,1 $\pm$ 2,5* ⁰ (0) 38,6 $\pm$ 3,9* ^{0x} (1,2)	71,4 $\pm$ 7,5* ⁰⁺ (4)
ИЛ-10 пг/мл	7 2 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,5* (0)	2,5 $\pm$ 0,3* ⁰ (0)	0,5 $\pm$ 0,06* ⁰⁺ (4)

IL -10 pg/ml			1,3±0,2* ox(1,2)	
Метилирование ДНК в составе лизатов лейкоцитов DNA methylation in leukocyte lysates				
ДНК-метилтрансфераза1 нМ/мл DNA-methyltransferase1 nM/ml	2 3,6±2,9	39,5± 4,3* (0)	65,8±6,8 *o (0)	31,7±3, 2+ (4)
			45,3±4,6 *x (1,2)	
5-метил-2'-дезоксидезокси-цитидина нг/мл 5-methyl-2'-deoxy-cytidine ng/ml	6 6±7,4	114±1 2,6* (0)	171±16, 9*o (0)	88±9,1+ (4)
			122±12, 3*x (1,2)	
Алармины крови BloodAlarms				
HMGB1нг/мл HMGB1pg/ml	7 9 ± 8,1	122 ± 11,8* (0)	139± 14,1*(0)	286± 28,9*o+ (4)
			198± 19,6*ox(1,2)	

ИЛ-1α пг/мл IL-1α pg/ml	6 $2 \pm 6,5$	96± 9,2* (0)	123± 12,4*(0)	245± 23,8* ^{o+} (4)
			179± 18,1* ^{ox} (1,2)	
ИЛ-33 пг/мл IL-33 pg/ml	3 $6,4 \pm 3,8$	64,2± 5,9* (0)	82±8,5* ^o (0)	168±17, 1* ^{o+} (4)
			121±12,3* ^{ox} (1,2)	
Мочевая кислота мкмоль/л Uric acid m mol/l	2 $91 \pm 30,8$	364±3 5,8 (0)	398±40, 4*(0)	536±53, 8* ^o (4)
			465±46, 8*(1,2)	

*- достоверно отличающиеся величины к показателям здоровых лиц.

^o - достоверно отличающиеся величины к показателям пост-ВГС-инфекции.

⁺ - достоверно отличающиеся величины к показателям хронической ВГС инфекции.

^x- достоверно отличающиеся величины с фиброзом к показателям без фиброза.

(0)- показатели хронической ВГС инфекции без фиброза.

(1,2) – показатели хронической ВГС инфекции с фиброзом (стадия F1,2 по данным эластографии).

(4) – показатели ВГС инфекции с циррозом (стадия F4 по данным эластографии).

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Жураева М.А. - д.м.н., профессор кафедры подготовки семейных врачей Андijanского государственного медицинского института, г. Андijan, Республика Узбекистан;

адрес: Узбекистан, улица Эргозиева 7;

телефон: +998975010800;

e-mail: mohigul_azimovna@mail.ru

Juraeva M.A. - Doctor of Medicine, Professor, Department of Training of Family Doctors, Andijan State Medical Institute, Andijan, Republic of Uzbekistan;

address: Uzbekistan, Ergozieva Street 7;

telephone: +998975010800;

e-mail: mohigul_azimovna@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Абдулазизхожиев Б.Р.-PhD, ассистент кафедры эндокринологии с курсом гематологии, Андijanского государственного медицинского института, Узбекистан;

Abdulazizkhodzhev B.R.- PhD, Assistant, Department of Endocrinology with Hematology Course, Andijan State Medical Institute, Uzbekistan;

Алейник В.А.- д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии Андijanского государственного медицинского института, г. Андijan, Республика Узбекистан; директор Андijanского филиала Института иммунологии и геномики человека, Академии наук Республика Узбекистан, г. Андijan;

Aleinik V.A.- Doctor of Medicine, Professor, Department of Normal Physiology, Andijan State Medical Institute, Andijan, Republic of Uzbekistan;

Director of the Andijan Branch of the Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Andijan;

Бабич С. М.- к.м.н., доцент, зав. кафедрой социальной гигиены и управления здравоохранением, г. Андижан, Республика Узбекистан;

Babich S.M.- PhD, Associate Professor, Head of the Department of Social Hygiene and Health Management, Andijan, Republic of Uzbekistan.

Пошахужаев Н.Х., соискатель кафедры подготовки врачей общей практики;

Poshaxojayev N.X.- applicant for the department of training general practitioners, ASMI.

Блок 3. Метаданные статьи

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И
МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ЛЕЙКОЦОВ У БОЛЬНЫХ С ФИБРОЗОМ И
ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ HCV ИНФЕКЦИИ

CHANGES IN IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND DNA
METHYLATION OF LEUCOCYTES IN PATIENTS WITH LIVER FIBROSIS
AND CIRRHOSIS IN CHRONIC HCV INFECTION

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ВГС ИНФЕКЦИИ ПЕЧЕНИ
DNAMETHYLATIONOFLEUKOCYTESINHCVINFECTIONOFTHELIVER

Ключевые слова: хронический ВГС, фиброз печени, цирроз печени, цитокины, ДНК метилтрансфераза 1, 5-метил-2'-дезоксцитидин, алармины, эпигенетическое метилирование ДНК.

Keywords: chronic ВГС, liver fibrosis, liver cirrhosis, cytokines, DNA methyltransferase 1, 5-methyl-2'-deoxycytidine, alarmins, epigenetic DNA methylation.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 12,

количество таблиц – 1.

количество рисунков – 0.

16.06.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или DOI
1	Barreto G., Manninen M., K. Eklund K. Osteoarthritis and toll-like receptors: when innate immunity meets chondrocyte apoptosis //Biology. – 2020. – Т. 9. – №. 4. – С. 65.	Barreto G, Manninen M, K Eklund K. Osteoarthritis and Toll-Like Receptors: When Innate Immunity Meets Chondrocyte Apoptosis. Biology (Basel). 2020 Mar 30;9(4):65.	doi: 10.3390/biology9040065. PMID: 32235418; PMCID: PMC7235883.
2	Chen, N., Luo, P., Tang, Y., Liu, P., Wang, J., Fan, Y., ... & Wang, K. Accelerators of chronic hepatitis B fibrosis cirrhosis	Chen N, Luo P, Tang Y, Liu P, Wang J, Fan Y, Han L, Wang K. Accelerators of chronic hepatitis B fibrosis cirrhosis CCND1 gene	doi: 10.1038/s41598-025-93778-9. PMID: 40148411; PMCID: PMC11950333.

	CCND1 gene expression and promoter hypomethylation //Scientific Reports. – 2025. – Т. 15. – №. 1. – С. 10630.	expression and promoter hypomethylation. Sci Rep. 2025 Mar 27;15(1):10630.	
3	Corley, M. J., Pang, A. P., Dody, K., Mudd, P. A., Patterson, B. K., Seethamraju, H., ... & Ndhlovu, L. C. Genome-wide DNA methylation profiling of peripheral blood reveals an epigenetic signature associated with severe COVID-19 //Journal of leukocyte biology. – 2021. – Т. 110. – №. 1. – С. 21-26.	Corley MJ, Pang APS, Dody K, Mudd PA, Patterson BK, Seethamraju H, Bram Y, Peluso MJ, Torres L, Iyer NS, Premeaux TA, Yeung ST, Chandar V, Borczuk A, Schwartz RE, Henrich TJ, Deeks SG, Sacha JB, Ndhlovu LC. Genome-wide DNA methylation profiling of peripheral blood reveals an epigenetic signature associated with severe COVID-19. J Leukoc Biol. 2021 Jul;110(1):21-26.: PMC8013321.	doi: 10.1002/JLB.5HI0720-466R. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33464637; PMCID
4	Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P., & Nag Chaudhuri, R. DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of	Dhar GA, Saha S, Mitra P, Nag Chaudhuri R. DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. Nucleus (Calcutta). 2021;64(3):259-270.	doi: 10.1007/s13237-021-00367-y. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34421129; PMCID: PMC8366481.

	our health //The Nucleus. – 2021. – Т. 64. – №. 3. – С. 259-270.		
5	Gauvreau, G. M., Bergeron, C., Boulet, L. P., Cockcroft, D. W., Côté, A., Davis, B. E., ... & Sehmi, R. Sounding the alarmins—the role of alarmin cytokines in asthma //Allergy. – 2023. – Т. 78. – №. 2. – С. 402-417.	Gauvreau GM, Bergeron C, Boulet LP, Cockcroft DW, Côté A, Davis BE, Leigh R, Myers I, O'Byrne PM, Sehmi R. Sounding the alarmins-The role of alarmin cytokines in asthma. Allergy. 2023 Feb;78(2):402-417..	doi: 10.1111/all.15609. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36463491; PMCID: PMC10108333
6	Giovannetti, A., Straface, E., Rosato, E., Casciaro, M., Pioggia, G., & Gangemi, S. Role of alarmins in the pathogenesis of systemic sclerosis //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 14. – С. 4985.	Giovannetti, A., Straface, E., Rosato, E., Casciaro, M., Pioggia, G., & Gangemi, S. Role of alarmins in the pathogenesis of systemic sclerosis //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 14. – С. 4985.	This entry is adapted from the peer-reviewed paper 10.3390/ijms241512143

7	Goncharova, I. A., Zarubin, A. A., Babushkina, N. P., Koroleva, I. A., & Nazarenko, M. S. Changes in DNA methylation profile in liver tissue during progression of BГC-induced fibrosis to hepatocellular carcinoma //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2023. – T. 27. – №. 1. – C. 72.	Goncharova, I. A., Zarubin, A. A., Babushkina, N. P., Koroleva, I. A., & Nazarenko, M. S. Changes in DNA methylation profile in liver tissue during progression of BГC-induced fibrosis to hepatocellular carcinoma //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2023. – T. 27. – №. 1. – C. 72.	doi.org/10.3389/fcimb.2022.873253
8	Ignat, S. R., Dinescu, S., Hermenean, A., & Costache, M. Cellular interplay as a consequence of inflammatory signals leading to liver fibrosis development //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 2. – C. 461.	Ignat, Simona-Rebeca et al. “Cellular Interplay as a Consequence of Inflammatory Signals Leading to Liver Fibrosis Development.” <i>Cells</i> 9 (2020): n. pag.	DOI:10.3390/cells9020461
9.	Jiang, Y., Fu, J., Du, J., Luo, Z., Guo, L., Xu, J., & Liu, Y. DNA methylation alterations and their potential influence on macrophage in periodontitis //Oral	Jiang Y, Fu J, Du J, Luo Z, Guo L, Xu J, Liu Y. DNA methylation alterations and their potential influence on macrophage in	doi: 10.1111/odi.13654. Epub 2020 Nov 20. PMID: 32989880.

	Diseases. – 2022. – Т. 28. – №. 2. – С. 249-263.	periodontitis. Oral Dis. 2022 Mar;28(2):249-263.	
10	Kisseleva T., Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2021. – Т. 18. – №. 3. – С. 151-166.	Kisseleva, T., Brenner, D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. <i>NatRevGastroenterolHepatol</i> 18 , 151–166 (2021).	https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7
11	Kohli, A., Shaffer, A., Sherman, A., & Kottlil, S. Treatment of hepatitis C: a systematic review //Jama. – 2014. – Т. 312. – №. 6. – С. 631-640.	Kohli, Anita et al. “Treatment of hepatitis C: a systematic review.” <i>JAMA</i> 312 6 (2014): 631-40 .	DOI: 10.1001/jama.2014.7085 Corpus ID: 17413277
12	Lefkowitz, R. B., Miller, C. M., Martinez-Caballero, J. D., & Ramos, I. Epigenetic control of innate immunity: consequences of acute respiratory virus infection //Viruses. – 2024. – Т. 16. – №. 2. – С. 197.	Lefkowitz RB, Miller CM, Martinez-Caballero JD, Ramos I. Epigenetic Control of Innate Immunity: Consequences of Acute Respiratory Virus Infection. <i>Viruses</i> . 2024 Jan 27;16(2):197.	doi: 10.3390/v16020197. PMID: 38399974; PMCID: PMC10893272.

13	Li, K., Qin, L., Jiang, S., Li, A., Zhang, C., Liu, G., ... & Zhang, Y. The signature of HBV-related liver disease in peripheral blood mononuclear cell DNA methylation //Clinical Epigenetics. – 2020. – T. 12. – C. 1-13.	Li K, Qin L, Jiang S, Li A, Zhang C, Liu G, Sun J, Sun H, Zhao Y, Li N, Zhang Y. The signature of HBV-related liver disease in peripheral blood mononuclear cell DNA methylation. Clin Epigenetics. 2020 Jun 8;12(1):81.	doi: 10.1186/s13148-020-00847-z. PMID: 32513305; PMCID: PMC7278209.
14	Liebold I. et al. Peripheral blood mononuclear cells are hypomethylated in active rheumatoid arthritis and methylation correlates with disease activity //Rheumatology. – 2021. – T. 60. – №. 4. – C. 1984-1995.	Liebold I, Grützkau A, Göckeritz A, Gerl V, Lindquist R, Feist E, Zänker M, Häupl T, Poddubnyy D, Zernicke J, Smiljanovic B, Alexander T, Burmester GR, Gay S, Stuhlmüller B. Peripheral blood mononuclear cells are hypomethylated in active rheumatoid arthritis and methylation correlates with disease activity. Rheumatology (Oxford). 2021 Apr 6;60(4):1984-1995.	doi: 10.1093/rheumatology/keaa649. PMID: 33200208.

15	Macdonald, S., Andreola, F., Bachtiger, P., Amoros, A., Pavesi, M., Mookerjee, R., ... & Jalan, R. Cell death markers in patients with cirrhosis and acute decompensation //Hepatology. – 2018. – Т. 67. – №. 3. – С. 989.	Macdonald S, Andreola F, Bachtiger P, Amoros A, Pavesi M, Mookerjee R, Zheng YB, Gronbaek H, Gerbes AL, Sola E, Caraceni P, Moreau R, Gines P, Arroyo V, Jalan R. Cell death markers in patients with cirrhosis and acute decompensation. Hepatology. 2018 Mar;67(3):989-1002.	doi: 10.1002/hep.29581. Epub 2018 Jan 24. PMID: 29023872.
16	Ni, Y. A., Chen, H., Nie, H., Zheng, B., & Gong, Q. HMGB1: An overview of its roles in the pathogenesis of liver disease //Journal of leukocyte biology. – 2021. – Т. 110. – №. 5. – С. 987-998.	Ni YA, Chen H, Nie H, Zheng B, Gong Q. HMGB1: An overview of its roles in the pathogenesis of liver disease. J Leukoc Biol. 2021 Nov;110(5):987-998.	doi: 10.1002/JLB.3MR0121-277R. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33784425.
17	Torne A. S., Robertson E. S. Epigenetic mechanisms in latent Epstein-Barr virus infection and associated cancers //Cancers. – 2024. – Т. 16. – №. 5. – С. 991.	Torne AS, Robertson ES. Epigenetic Mechanisms in Latent Epstein-Barr Virus Infection and Associated Cancers. Cancers (Basel). 2024 Feb 29;16(5):991.	doi: 10.3390/cancers16050991. PMID: 38473352; PMCID: PMC10931536.

18	Wang F. D., Zhou J., Chen E. Q. Molecular mechanisms and potential new therapeutic drugs for liver fibrosis //Frontiers in pharmacology. – 2022. – T. 13. – C. 787748.	Wang FD, Zhou J, Chen EQ. Molecular Mechanisms and Potential New Therapeutic Drugs for Liver Fibrosis. Front Pharmacol. 2022 Feb 11;13:787748.	doi: 10.3389/fphar.2022.787748. PMID: 35222022; PMCID: PMC8874120.
19	Wilson C. L., Mann D. A., Borthwick L. A. Epigenetic reprogramming in liver fibrosis and cancer //Advanced Drug Delivery Reviews. – 2017. – T. 121. – C. 124	Wilson CL, Mann DA, Borthwick LA. Epigenetic reprogramming in liver fibrosis and cancer. Adv Drug Deliv Rev. 2017 Nov 1;121:124-132.	doi: 10.1016/j.addr.2017.10.011. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29079534; PMCID: PMC5716427.
20	Zhang, Z., Wang, J., Li, H., Niu, Q., Tao, Y., Zhao, X., ... & Dong, H. The role of the interleukin family in liver fibrosis //Frontiers in Immunology. – 2025. – T. 16. – C. 1497095.	Zhang Z, Wang J, Li H, Niu Q, Tao Y, Zhao X, Zeng Z, Dong H. The role of the interleukin family in liver fibrosis. Front Immunol. 2025 Feb 10;16:1497095.	doi: 10.3389/fimmu.2025.1497095 . PMID: 39995661; PMCID: PMC11847652.

21	Żychowska, J., Ćmil, M., Skórka, P., Olejnik-Wojciechowska, J., Plewa, P., Bakinowska, E., ... & Pawlik, A. The Role of Epigenetic Mechanisms in the Pathogenesis of Hepatitis C Infection // Biomolecules. – 2024. – T. 14. – №. 8. – C. 986.	Żychowska J, Ćmil M, Skórka P, Olejnik-Wojciechowska J, Plewa P, Bakinowska E, Kiełbowski K, Pawlik A. The Role of Epigenetic Mechanisms in the Pathogenesis of Hepatitis C Infection. Biomolecules. 2024 Aug 10;14(8):986.	doi: 10.3390/biom14080986. PMID: 39199374; PMCID: PMC11352264.