

## СТЕПЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК И ПОЛИМОРФИЗМ rs652438 ГЕНА MMP-12 ПРИ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ В УСЛОВИЯХ ОКИДАТИВНОГО СТРЕССА

Текуцкая Е.Е.<sup>1,2</sup>, Гусарук Л.Р.<sup>1,2</sup>, Павлюченко И.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 3500400, РФ; e-mail: tekytska@mail.ru

<sup>2</sup> Кубанский государственный медицинский университет

ул. им. Митрофана Седина, 4, г. Краснодар, 350063, РФ; e-mail: gusaruk@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0496

**Аннотация.** В работе приводится сравнительный анализ степени окислительного повреждения ДНК при мультифакториальных заболеваниях (буллезном эпидермолизе (БЭ) и бронхиальной астме (БА)). Степень окислительных повреждений ДНК оценивали по уровню концентрации 8-оксогуанина (8-охоG) в сыворотке крови, определяемого методом иммуноферментного анализа с моноклональными антителами. Установлено, что концентрация модифицированного основания 8-охоG у больных БЭ в 2,1 раза выше по сравнению с контрольной группой. При БА этот показатель по сравнению с контролем меняется незначительно. Различная концентрация 8-охоG при БЭ и БА свидетельствует о выраженности структурных повреждений ДНК при БЭ и практически отсутствии окислительной модификации ДНК при БА, что может свидетельствовать о различных механизмах патофизиологических нарушений при данных нозологиях на клеточном уровне. Определено содержание 8-охоG в ДНК крови здоровых доноров и больных БЭ и БА после воздействия переменным магнитным полем (МП) напряженностью ( $550 \pm 30$ ) А/м в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro*. Показано, что после обработки МП наблюдается достоверное повышение уровней содержания 8-охоG в ДНК для обеих групп, сложным образом зависящее от частоты. Полученный эффект объясняется генерацией АФК при воздействии МП и нарушением процессов репарации ДНК. Проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов локуса rs652438 гена *mmp12* при БА. Показано наличие достоверных различий в частоте гетерозигот. В контрольной группе этот показатель в 2,3 больше, чем при БА. Частота аллеля G в группе здоровых доноров составила 0,15, у пациентов с БА-0,06. Значение показателя отношения шансов свидетельствует, что влияние минорного аллеля G носит протекторный характер, снижая риск развития БА для его обладателей.

**Ключевые слова:** буллезный эпидермолиз, бронхиальная астма, окислительное повреждение ДНК, 8-оксогуанин, полиморфизм гена MMP-12

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – Epidermolysis bullosa, клинически и генетически гетерогенная группа орфанных заболеваний, включающих около 30 генотипических и фенотипических форм. Все они характеризуются врожденной склонностью к образованию булл (пузырей) на коже и слизистых оболочках пищевода, кишечника, дыхательной, мочеполовой систем. Нарушение целостности кожи происходит даже в ответ на незначительное механическое воздействие [1]. Эрозивно-язвенные дефекты могут сохраняться на коже от одного месяца до нескольких лет, являясь предрасполагающим фактором к образованию плоскоклеточного рака кожи - основной причины преждевременной смерти больных [2]. Внекожные проявления и их осложнения в других эпителизованных органах делают БЭ мультисистемным заболеванием с высокой смертностью [3]. Бронхиальная астма (БА) является широко распространенным хроническим заболеванием, которым страдает 300 млн человек в мире. Основой патогенеза БА является затяжной воспалительный процесс, включающий морфологические и функциональные изменения бронхиального дерева, характеризующиеся существенным вкладом в их развитие наследственной компоненты [4]. Таким образом, БА и БЭ, относятся к мультифакториальным заболеваниям и, исходя из этого, возникают при взаимодействии неблагоприятных факторов наследственной и не наследственной природы, действие которых в итоге суммируется.

Известно, что высокорекреационные клеточные метаболиты, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, воздействие электромагнитным полем приводит к активации процессов свободно-радикального окисления и, как следствие, накоплению в клетках активных форм кислорода (АФК). Вызывая окислительную модификацию различных клеточных структур, они действуют, в том числе, на ее генетический материал, приводя к повреждению азотистых оснований ДНК, дестабилизируя геном. Наиболее распространенным продуктом такой окислительной модификации азотистых оснований является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-охоG). Причина этого в том, что именно гуанин имеет самый низкий из всех азотистых оснований окислительно-восстановительный потенциал [5].

В организме выработана многоуровневая система защиты и репарации генетического аппарата. Образуюсь при повреждении ДНК, 8-охоG устраняется или модифицируется за счет наличия мультифакторной системы антиоксидантной защиты и системы эксцизионной репарации. В результате функционирования фермента 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазы происходит последовательный гидролиз N-гликозидной связи с 3'конца от повреждения и связывание 8-охоG активным центром. Накапливаясь в биологических жидкостях, 8-охоG служит одним из лучших биомаркеров генотоксического оксидативного стресса при различных патофизиологических

состояниях и экзогенных воздействиях [6]. С образованием 8-охоГ в ДНК тесно связывают такие процессы в организме как канцерогенез, воспаление, старение, развитие ряда возрастных патологий. По данным ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) уровень эндогенного 8-охоГ в ДНК составляет  $\sim 1$  8-охоГ на  $10^6$ Г. При генотоксическом оксидативном стрессе этот показатель увеличивается в несколько раз.

При экзогенных воздействиях определенные клеточные процессы, и среди них генерация АФК, многими авторами считаются ответственными за влияние на структуру ДНК [6-8]. Низкоинтенсивные переменные МП не вызывают тепловые эффекты напрямую, эти поля могут воздействовать опосредованно, изменяя концентрацию или активность некоторых кинетически значимых молекул в водном растворе, в частности перекиси водорода.

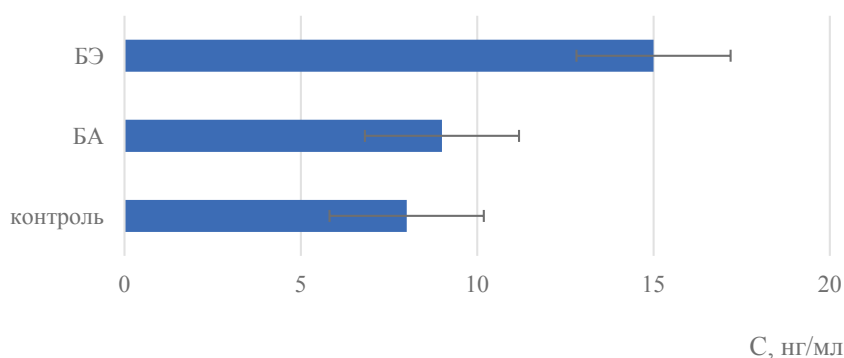
*MMP-12* – металлоэластаза, расщепляя растворимый и нерастворимый эластин, вызывает деградацию фибронектина, ламинина, витронектина, артериальное ремоделирование [9]. Ген, кодирующий этот фермент, является частью кластера генов *MMP*, локализован на 11 хромосоме (11q22.2-q22.3), содержит 10 экзонов и 9 интронов, экспрессируется преимущественно тканевыми макрофагами. Прослеживается тесная связь *MMP-12* с заболеваниями бронхолегочной системы и о значительная роль соответствующего энзима в реакциях легких на неблагоприятные факторы. Для гена *MMP-12* известно несколько полиморфных вариантов, при которых измененная структура гена приводит к изменению его функционала [10].

Цель настоящей работы заключалась в изучении ассоциации полиморфных вариантов rs652438 гена *MMP12* при БА и БЭ и оценка характера окислительного повреждения ДНК, как следствие патологического процесса и ответной реакции генома на индуцированный переменным МП окислительный стресс после воздействия МП *in vitro*.

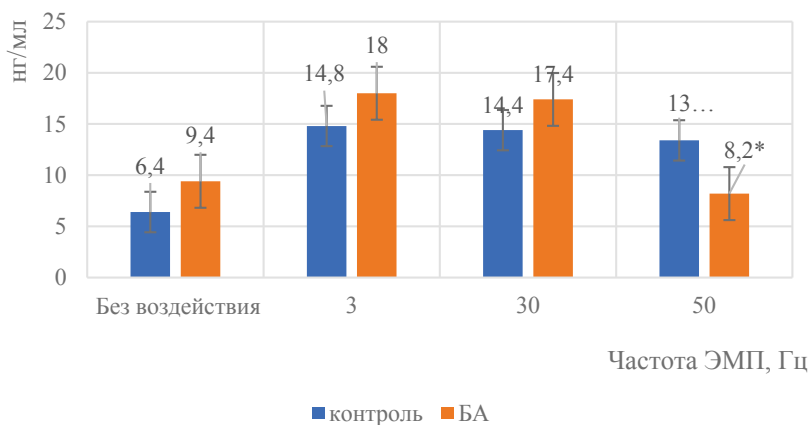
Степень окислительного повреждения ДНК оценивали по уровню концентрации 8-охоГ в сыворотке крови, содержание которого определяли методом иммуноферментного анализа с моноклональными антителами наборами реагентов DNA Damage, ELISA на микропланшетном ридере Thermo Fisher Scientific Multiskan. Выделение ДНК производили сорбционным методом, используя наборы реагентов «ДНК-Сорб В». Типирование полиморфного варианта rs652438 гена *MMP12* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе Rotor-Gene (Qiagen, Германия). Для определения устойчивости геномного материала к окислительной модификации в условиях оксидативной нагрузки образцы цельной крови в выборке из 8 больных БЭ (орфанная патология, ограниченное число больных и трудности с забором биоматериала для исследований) 20 больных БА и 20 условно здоровых доноров [11] обрабатывали переменным МП частотой 3, 30 и 50 Гц в соответствии с методикой, описанной ранее [12].

В группе больных БЭ уровень содержания 8-охоГ изменялся от 10,0 до 22,2 нг/мл и в среднем составлял  $14,8 \pm 2,1$  нг/мл, что в 2,1 раза выше, чем в контроле. Полученные результаты приведены на рисунке 1.

При БА уровень изучаемого метаболита составил в среднем по выборке  $9,4 \pm 1,7$  нг/мл, что сопоставимо с контролем. Это дает основание не рассматривать БА как фактор выраженного ОС, проявляющегося на субклеточном уровне и значимо влияющего на целостность наследственного аппарата. Почти двукратное увеличение концентрации 8-охоГ при БЭ свидетельствует о значительной степени нарушения структуры молекулы ДНК. Так как большая часть 8-охоГ образуется в результате воздействия АФК, наблюдаемая в данном случае дестабилизация генома происходит в результате наличия оксидативного генотоксического стресса, который формируется в результате активации реакций свободно-радикального окисления и недостаточности систем антиоксидантной защиты. Выработанная в организме система защиты, призвана восстановить повреждения, однако, имеющее место при БЭ накопление 8-охоГ, может служить триггером мутаций, которые способны ослабить процессы эксцизионной репарации, не позволяя обеспечить восстановление структуры ДНК. При воздействии низкоинтенсивным переменным МП частотой 3 Гц концентрация 8-охоГ достоверно увеличивалась при БЭ, достигая 14,8 нг/мл. Дальнейшее увеличение частоты до 30 Гц и 50 Гц не изменяло этот параметр, оставляя количество 8-охоГ на уровне 14,4 и 13,4 нг/мл соответственно, что говорит о максимальной модификационной подверженности к окислительной модификации в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты. При БА воздействие МП частотой 3 Гц достоверно увеличивало концентрацию изучаемого метаболита до 18,0 нг/мл. При 30 Гц показатель 8-охоГ оставался на уровне предыдущего значения – 17,4 нг/мл, а при 50 Гц снижался до 8,2 нг/мл.



**Рисунок 1.** Содержание 8-охоГ в сыворотке крови здоровых (контроль), больных БЭ и больных БА. ( $U = 1,5$ ;  $U$  критическое = 3 при  $p \leq 0,01$ ;  $U$  критическое = 7 при  $p \leq 0,05$ ). С-концентрация 8-охоГ



**Рисунок 2.** Концентрация 8-охоG (нг/мл) в сыворотке здоровых и больных БА в зависимости от частоты переменного МП

Для выявления степени подверженности к окислительной модификации генетического материала в условия фонового состояния системы про- /антиоксиданты у условно здоровых доноров и в условиях ОС у пациентов с БА проведены исследования с индукцией окислительного напряжения под воздействием электромагнитного поля *in vitro*. Характер влияния ЭМП на концентрацию 8-охоG в контрольных образцах крови и при БА представлен на рисунке 2.

Исходный уровень в контрольных образцах составляет 6,4 нг/мл. При воздействии поля интенсивностью 3 Гц концентрация 8-охоG, достоверно увеличивается, достигая 14,8 нг/мл ( $U_{эмп}=10$ ,  $U_{крит}=23$ ;  $p<0,05$ ). Дальнейшее изменение частоты до 30 Гц и 50 Гц не меняет этот параметр, оставляя количество 8-охоG на уровне 14,4 и 13,4 нг/мл соответственно, что говорит о максимальной модификационной подверженности к окислительной модификации в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты.

При БА исходный уровень изучаемого метаболита составил 9,4 нг/мл. Воздействие МП частотой 3 Гц достоверно увеличивает его концентрацию до 18,0 нг/мл ( $U_{эмп}=22,5$ ,  $U_{крит}=23$ ;  $p<0,05$ ). При 30 Гц показатель 8-охоG остается на уровне предыдущего значения – 17,4 нг/мл, а при 50 Гц снижается до 8,2 нг/мл ( $U_{эмп}=20,5$ ;  $U_{крит}=23$ ;  $p<0,05$ ). Индуцированный ЭМП ОС, проявляется практически одинаковой степенью окислительного повреждения генома, что подтверждает достоверное повышение концентрации 8-охоG в обеих группах.

Определены частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs652438 гена *MMP12* в контрольной группе и при БА. Выяснилось, что в контрольной группе условно здоровых доноров преобладающим является генотип AA – 68 человек, что составляет 73%. На долю генотипа AG – приходится 25% (23 человека), генотипа GG – 2% (2 человека). В группе больных БА так же преобладающим оказался генотип AA. Его носителями являются 75 человек, что составляет 88% от общего количества наблюдаемых больных. Гетерозиготный генотип AG имеют 9 человек – 11% и гомозиготный генотип по аллелю GG в данной группе выявлен у одного пациента, что составляет менее 1%. Сопоставление частот генотипов между двумя группами показало наличие достоверных различий для гетерозигот. В контрольной группе этот показатель в 2,3 больше, чем при БА ( $p<0,05$ ). Частоты генотипов AA и GG достоверно не отличаются.

При БА практически во всех случаях происходит ремоделирование дыхательных путей, деградация компонентов внеклеточного матрикса легочной ткани и ее повреждение. *MMP12*, являясь выделяемой макрофагами эластазой, расщепляет эластин, что приводит к потере эластичности бронхиального дерева при бронхо-легочной патологии. Одной из причин этого является высокая активность гена *MMP-12*, не контролируемая тканевыми ингибиторами металлопротеиназ. Протекторный эффект полиморфного варианта локуса rs652438 в отношении развития БА на наш взгляд обусловлен снижением экспрессивности гена *MMP12*, и как следствие, снижением степени деструкции бронхиального дерева. Подавление активности гена может происходить если между аллелями A и G наблюдается разница в способности респонсивных элементов промотора связываться с транскрипционным фактором. Очевидно, для аллеля G это взаимодействие является менее эффективным, чем для аллеля A. С другой стороны, вызванная данным полиморфизмом замена аспарагина на серин сопровождается изменением структуры кодируемого фермента, что тоже может приводить к ингибированию, снижению его активности и агрессивности.

Таким образом, повышение концентрации 8-охоG в биологических жидкостях наблюдаемых пациентов, являющегося молекулярным маркером генотоксического стресса, дает основание считать, что при БЭ происходит значительное окислительное повреждение структуры ДНК, нарушающее молекулярно-генетический статус организма. Возможно, это является одной из причин замедления процессов эксцизионной репарации. Выявление характера повреждения генетического материала клеток при БЭ может внести определенный вклад в дальнейшее понимание этиологии и патогенеза данной патологии. Напротив, при БА количество изучаемого метаболита не отличается от контроля, и это позволяет предположить, что репарационные механизмы при данной патологии, в отличие от БЭ в целом сохраняются, что, вероятно, объясняется наличием достаточных резервов

системы клеточной антиоксидантной защиты у данной категории больных. Установлено, что характер окислительного повреждения ДНК, вызванного действием МП, свидетельствует о более раннем по сравнению с контролем истощении адаптационных механизмов генома при БА. Показан протекторный эффект в отношении развития БА у носителей аллеля G в популяции Краснодарского края. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию этиологии и особенностей патофизиологических процессов при БА и БЭ в условиях индуцированного окислительного стресса.

#### Список литературы / References:

1. Shinkuma S. Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clinical, cosmetic and Investigational Dermatology*, 2015, vol. 8, pp. 275-284, doi: 10.2147/CCID.S54681.
2. Kiritsi D., Gacia M., Brander R., Has C., Meijer R., Esca mez M.J., Kohlhase J., van der Akker P., Scheffer H., Jonkman M.F., del Rio M., Bruckner-Tuderman L., Pasmooij A.M.G. Mechanisms of Natural Gene Therapy in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, vol. 134, pp. 2097-2104, doi: 10.1038/jid.2014.118.
3. Uitto J., Bruckner-Tuderman L., McGrath J.A., Riedl R., Robinson C. EB-2017-Progress in Epidermolysis Bullosa Research toward Treatment and Cure. *Journal of Investigative Dermatology*, 2018, vol. 138, pp. 1010-1016, doi: 10.1016/j.jid.
4. Kachkovska V.V., Kovchun A.V., Moyseyenko I.O., Dudchenko I.O., Prystupa L.N. Arg16Gly Polymorphism in the  $\beta$ 2-adrenoceptor gene in patients with bronchial asthma. *Wiadomosci Lekarskie*, 2021, vol. 74, no. 5, pp. 1200-1203.
5. Ba Xueqing, Aguilera-Aguirre L., Rashid Q.T.A.N., Basci A., Radak Z., Sur S., Hosoki K., Hegde M.L., Boldogh I. The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, vol. 15, no. 9, pp. 16975-16997, doi: 10.3390/ijms150916975.
6. Tekutskaya E.E., Baryshev M.G., Gusaruk L.R., Ilchenko G.P. Oxidative Damage to DNA under the Action of an Alternating Magnetic Field. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 564-568, doi: 10.1134/S0006350920040247.
7. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. Генерация активных форм кислорода под влиянием СВЧ-излучения и их генотоксическое действие. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2018, т. 52, № 1, с. 56-61. [Tekutskaya E.E., Baryshev M.G., Ilchenko G.P. Generation of reactive oxygen species under the influence of microwave radiation and their genotoxic effect. *Aerospace and Ecological Medicine*, 2018, vol. 52, no. 1, pp. 56-61, doi: 10.21687/0233-528X-2018-52-1-56-61. (In Russ.)]
8. Yokus B., Zulkuf M., Dasdag S. et al. Extremely low frequency magnetic fields cause oxidative DNA damage in rats. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2008, vol. 84, no. 10, pp. 789-795.
9. Шадрина А.С., Плиева Я.З., Кушлинский Д.Н., Филлипенко М.Л., Чанг В.Л., Кушлинский Н.Е. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матричных металлопротеиназ в норме и при патологии. *Альманах клинической медицины*, 2017, т. 45, № 4, с. 266-279. [Shadrina A.S., Plieva Ya.Z., Kushlinsky D.N., Fillipenko M.L., Chang V.L., Kushlinsky N.E. Classification, regulation of activity, genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in normal and pathological conditions. *Almanac of Clinical Medicine*, 2017, vol. 45, no. 4, pp. 266-279, doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-266-279. (In Russ.)]
10. Strelkova M.I., Senatorova G.S., Polyakov V.V. The role of polymorphisms of matrix metalloproteinases' polymorphisms 1 and 12 in the formation of wheezing syndrome among children with recurrent bronchitis. *Wiadomosci Lekarskie*, 2021, vol. 74, no. 7, pp. 1595-1599.
11. Павлюченко И.И., Гусарук Л.Р., Текуцкая Е.Е. База данных результатов исследования полиморфных вариантов генов и степени окислительных повреждений ДНК в популяции жителей отдельного региона. Свидетельство о регистрации базы данных 2022621020, 05.05.2022. Заявка № 2022620895 от 28.04.2022. [Pavlyuchenko I.I., Gusaruk L.R., Tekutskaya E.E. *Database of the results of the study of polymorphic variants of genes and the degree of oxidative damage to DNA in a population of residents of a particular region*. Database registration certificate 2022621020, 05/05/2022. Application No. 2022620895 dated 04.28.2022. (In Russ.)]
12. Текуцкая Е.Е., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Влияние переменного магнитного поля на хемилюминесценцию лимфоцитов периферической крови человека и производство ими провоспалительных цитокинов. *Биофизика*, 2022, т. 67, № 1, с. 113-120. [Tekutskaya E.E., Gusaruk L.R., Ilchenko G.P. Effect of an alternating magnetic field on the chemiluminescence of human peripheral blood lymphocytes and their production of pro-inflammatory cytokines. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 113-120, doi: 10.31857/s0006302922010112. (In Russ.)]

**THE DEGREE OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA AND MMP-12 GENE rs652438 POLYMORPHISM IN MULTIFACTORIAL DISEASES UNDER OXIDATIVE STRESS****Tekutskaya E.E.<sup>1,2</sup>, Gusaruk L.R.<sup>1,2</sup>, Pavlyuchenko I.I.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Kuban State University

Stavropolskaya st., 149, Krasnodar, 3500400, Russia; e-mail: tekytska@mail.ru

<sup>2</sup>Kuban State Medical University

Mitrofan Sedin st., 4, Krasnodar, 350063, Russia; e-mail: gusaruk@yandex.ru

Received 06.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0496

**Abstract.** The paper presents a comparative analysis of the degree of oxidative DNA damage in epidermolysis bullosa (EB) and bronchial asthma (BA). The degree of oxidative damage to DNA was assessed by the level of 8-oxoguanine (8-oxoG) concentration in blood serum, determined by enzyme immunoassay with monoclonal antibodies. It was found that the concentration of the modified base 8-oxoG in patients with BE is 2.1 times higher than in the control group. In BA, this indicator changes insignificantly compared to the control. Different concentrations of 8-oxoG in BE and BE indicate the severity of structural DNA damage in BE and the almost absence of oxidative DNA modification in AD, which may indicate different mechanisms of pathophysiological disorders in these nosologies at the cellular level. The content of 8-oxoG in the blood DNA of healthy donors and patients with BE and AD was determined after exposure to an alternating magnetic field (MF) of  $(550 \pm 30)$  A/m in the frequency range from 3 to 60 Hz in vitro. It was shown that, after MP treatment, there was a significant increase in the levels of 8-oxoG in DNA for both groups, which depended in a complex way on frequency. The effect obtained is explained by the generation of ROS under the influence of magnetic fields and the disruption of DNA repair processes. An analysis of the association of polymorphic variants of the rs652438 locus of the mmp12 gene in AD was carried out. The presence of significant differences in the frequency of heterozygotes was shown. In the control group, this figure is 2.3 more than in BA. The G allele frequency in the group of healthy donors was 0.15, in patients with AD - 0.06. The value of the odds ratio indicates that the influence of the minor allele G is protective in nature, reducing the risk of developing AD for its owners.

**Key words:** epidermolysis bullosa, bronchial asthma, oxidative DNA damage, 8-oxoguanine, MMP-12 gene polymorphism