

УДК 577.21

**ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СВОБОДНО-ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В КАЧЕСТВЕБИОМАРКЕРА ВОЗДЕЙСТВИЯ  
АСБЕСТА НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА**

**Райш Кристина Эдуардовна**

**[christine.ya26@gmail.com](mailto:christine.ya26@gmail.com)**

Студентка бакалавриата по направлению «Биология»-5В060700 Евразийского национального  
университета имени Л.Н. Гумилева  
Научный руководитель- О.В. Булгакова

**Введение**

Ранее многими исследованиями было показано изменение числа копий свободно-циркулирующей митохондриальной ДНК (сц мтДНК) в образцах крови людей, подвергшихся воздействию канцерогенных веществ [1-3]. Асбест, несмотря на то, что признан Международным агентством по изучению рака канцерогеном 1 категорией [4,5], по сей день используется в промышленности ввиду его устойчивости к физической,

химической, а также биологической деградации [4,6]. Исследованиями было показано, что воздействие асбеста приводит к манифесту таких заболеваний как злокачественная мезотелиома, асбестоз, рак легкого, гортани, а также к ряду других онкологий [4,7,8]. Именно поэтому поиск подходящего биомаркера его воздействия имеет особое практическое значение.

Ввиду наличия каталитически активной формы железа на поверхности асбестового волокна, он способен попадая в клетку приводить к увеличению числа активных форм кислорода (АФК) [9-11]. Их повышенный уровень в клетке является источником как двунитевых разрывов [12], так и трансверсий в генетическом материале клетки [10,13,14]. Так, манифест фиброза легкого был ассоциирован с полиморфизмами в гене трансформирующего ростового фактора бета-1 (*TGF-β1*) [15] и гене интерлейкина 6 (*IL-6*) [16]. Асбест также оказывает эпигенетическое влияние на геном путем гипометилирования в промоторных участках генов [12,17].

Помимо этого, асбест напрямую влияет на активацию PI3-киназа/Akt сигнального пути, который наиболее активен в раковых клетках и способствует их выживанию [18]. NF-κB сигнальный путь же активируется асбестом лишь косвенно через генерацию АФК [19]. Данный сигнальный путь приводит к индукции воспаления, ассоциированного с раком [19,20].

Выход самой мтДНК из клетки также может приводить к воспалительному процессу. Митохондриальная ДНК имеет прокариотическое происхождение, а потому является иммуногенной и способна вызывать «асептическое» воспаление [21]. Накопление АФК в клетке в присутствии асбеста способствует увеличению числа мутаций в митохондриальном геноме, который наиболее чувствителен к действию АФК ввиду недостаточной работы репарационной системы [22,23]. Поврежденные митохондрии распознаются белком p62, который запускает их убиквитин-зависимую аутофагию [20]. Оказываясь в цитозоли, мтДНК распознается как NLRP3 инфламмасомой, так и циклической GMP-AMP-синтетазой (cGAS), которые активируют воспалительные пути [21,24].

#### Материалы и методы

Для исследования была выбрана целевая группа, состоящая из 143 человек, работающих на предприятии АО «Костанайские минералы» (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика группы «Асбест»

Пол		Возраст		Статус курения						Стаж работы			
Мужской	Женский	<40	≥40	Не указан	Некурящие	1-5	6-10	>10	Бывшие курильщики	<5	5-9	10-19	≥20
	18	47	95	7	60	13	17	40	8	24	33	41	45

В контрольную группу вошли 62 здоровых человека Научного центра трансфизиологии (города Нур-Султан) (Таблица 2). Предварительно медицинским персоналом был проведен осмотр участников исследования на наличие легочных патологий и воспалительных процессов, протекающих как в острой, так и в хронической форме.

Таблица 2. Характеристика контрольной группы

Пол	Возраст	Статус курения
-----	---------	----------------

Мужской	Женский	<40	>40	Некурящие	1-5	6-10	>10	Бывшие курильщики
	26	15	47	37	9	7	7	2

В лаборатории цельная кровь была разделена на фракции центрифугированием 15 мин при 3000 об/мин. Из плазмы крови была выделена тотальная ДНК набором реагентов ПРОБА-НК (№ D07-2, «ДНК-Технология», Россия). Протокол выделения был модифицирован с целью получения более высокой концентрации ДНК в образцах.

Для подсчета числа копий сц мтДНК в выделенных образцах был выбран метод количественной ПЦР в режиме реального времени (Таблица 3).

Таблица 3. Состав реакционной смеси и программа проведения кПЦР в режиме реального времени

Состав реакционной смеси (25 мкл)		Программа проведения	
1ч Thermo Scientific Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix (2X)	10,5 мкл	90°C	10 минут
Прямой праймер (5'-CAGCCGCTATTAAAGGTTTCG-3')	50 пмоль	40 циклов	
Обратный праймер (5'-GGGCTCTGCCATCTTAACAA-3')	50 пмоль	95°C	15 секунд
Образец ДНК	100 нг	60°C	60 секунд

Длина ПЦР продукта составила 230 пар нуклеотидов. кПЦР проводилась в двукратной повторности с использованием амплификатора Quant Studio 3 (Thermo Fisher Scientific, США). Специфичность полученных результатов ПЦР определялась путем анализа кривой плавления.

Для статистической обработки данных использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., Ла-Холла, Калифорния, США).

#### Обсуждение результатов

При сравнительном анализе целевой группы с контрольной статистически значимой разницы между группами обнаружено не было ( $p = 0,6366$ ).

Минимальное, максимальное и среднеарифметическое значения, а также стандартное отклонение для контрольной группы указаны в таблице 4.

Таблица 4. Результаты для контрольной группы

Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее арифметическое	Стандартное отклонение
$6,02 \cdot 10^3$ копий/мл	$1,73 \cdot 10^7$ копий/мл	$\approx 7,22 \cdot 10^5$ копий/мл	$\approx 2,45 \cdot 10^6$ копий/мл

Результаты анализа для группы «Асбест» представлены таблицей 5.

Таблица 5. Результаты для целевой группы

Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее арифметическое	Стандартное отклонение

значение			
5,95*104 копий/мл	5,05*107 копий/мл	≈1,1* 106 копий/мл	≈6,03* 106 копий/мл

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния хризотилового асбеста на изменение уровня сц мтДНК в плазме крови.

Дальнейший анализ групп показал, что стаж работы не взаимосвязан с изменением числа копий сц мтДНК. Результаты сравнения контрольной группы с группами по стажу работы (см.таблицу 1) указаны в таблице 6.

Таблица 6. Р-уровень значимости для групп, разделенных по стажу работы, при сравнении с контрольной группой

Стаж <5 лет	Стаж 5-9 лет	Стаж 10-19 лет	Стаж ≥20 лет
0,5159	0,3407	0,44	0,6415

Зависимость уровня сц мтДНК от пола, возраста и стажа курения также обнаружена не была ( $p > 0,05$ ).

Отсутствие разницы между группами может быть обусловлено несколькими предполагаемыми механизмы.

Во-первых, реакция разных клеток на воздействие асбеста неоднозначна. С одной стороны происходит остановка клеточного цикла в момент перехода из G1 в S фазу, что наиболее характерно для фибробластов, после чего следует гибель клеток. С другой же стороны данный механизм не характерен для мезотелиальных клеток [25].

Во-вторых, при воздействии асбеста клетка накапливает мутации, наиболее примечательные из которых находятся не только в генах, ответственные за регуляцию клеточного цикла, но и в генах системы репарации. Так, мутации возникшие и в *RAD51*, и в *TP53* приводят к блокировке апоптоза, вследствие чего выход мтДНК во внеклеточное пространство не происходит [26].

Еще одним механизмом увеличения пула сц мтДНК является митофагия, однако её роль в асбест-индуцированных патологиях на сегодняшний день не раскрыта полностью [27].

Немаловажным фактом является и то, что среди всех видов асбеста хризотил-асбест является наименее канцерогенным. По некоторым данным манифест асбест-индуцированных заболеваний происходит лишь по прошествию около 40 лет после воздействия асбеста [28].

Таким образом, несмотря на достаточное количество исследований посвящённых асбест- индуцированному канцерогенезу, на сегодня все еще остается достаточное количество белых пятен в молекулярных аспектах воздействия асбеста на клетки организма.

#### Список использованных источников

1. L.T. Budnik, S. Kloth, X. Baur, A.M. Preisser, H. Schwarzenbach Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides // PLoS One. 2013;8(5):e64413.
2. E. Ebrahimi, M.H. Akhavan, R. Akrami, et al. Association between mitochondrial DNA content and opium exposure // J Biochem Mol Toxicol. 2020;34(10):e22559.
3. O. Bulgakova, A. Kussainova, A. Kakabayev, A. Aripova, G. Baikenova, A. Izzotti, R. Bersimbaev The level of free-circulating mtDNA in patients with radon-induced lung cancer // Environ Res. 2021 Oct 14:112215.
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts // IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100(Pt C):11-465.
5. S. Kumari, S. Sharma, D. Advani, A. Khosla, P. Kumar, R.K. Ambasta Unboxing the

- molecularmodalities of mutagens in cancer // *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Oct 5:1–49.
6. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Statement for Asbestos September 2001. Retrieved April 18, 2017.
  7. N. van Zandwijk, G. Reid, A.L. Frank Asbestos-related cancers: the 'Hidden Killer' remains a global threat // *Expert Rev Anticancer Ther.* 2020 Apr;20(4):271-278.
  8. M. Tomasetti, M. Amati, J. Neuzil, L. Santarelli Circulating epigenetic biomarkers in lung malignancies: From early diagnosis to therapy // *Lung Cancer.* 2017 May;107:65-72.
  9. E. Lorenzini, A. Ciarrocchi, F. Torricelli Molecular Fingerprints of Malignant Pleural Mesothelioma: Not Just a Matter of Genetic Alterations // *J Clin Med.* 2021 Jun 2;10(11):2470.
  10. S. Benedetti, B. Nuvoli, S. Catalani, R. Galati Reactive oxygen species a double-edged sword for mesothelioma // *Oncotarget.* 2015 Jul 10;6(19),16848-65.
  11. E. Digifico, S. Balinzo, C. Belgiovine The Dark Side of the Force: When the Immune System Is the Fuel of Tumor Onset // *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 27;22(3),1224.
  12. D. Öner, M. Ghosh, M. Moisse, R.C. Duca, R. Coorens, J.A.J. Vanoirbeek, D. Lambrechts, L. Godderis, P.H.M. Hoet Global and gene-specific DNA methylation effects of different asbestos fibres on human bronchial epithelial cells // *Environ Int.* 2018 Jun 115,301-311.
  13. D.M. Kang, J.I. Shin, J.B. Kim, K. Lee, J.H. Chung, H.W. Yang, K.N. Kim, Y.S. Han Detection of 8-oxoguanine and apurinic/aprimidinic sites using a fluorophore-labeled probe with cell-penetrating ability // *BMC Mol Cell Biol.* 2019 Nov 27;20(1):54.
  14. P. Andujar, J.C. Pairon, A. Renier, A. Descatha, I. Hysi, I. Abd-alsamad, M.A. Billon-Galland, H. Blons, B. Clin, C. Danel, D. Debrosse, F. Galateau-Sallé, B. Housset, P. Laurent-Puig, F. Le Pimpec-Barthes et al. Differential mutation profiles and similar intronic TP53 polymorphisms in asbestos-related lung cancer and pleural mesothelioma // *Mutagenesis.* 2013 May;28(3):323-31.
  15. S. Helmig, A. Belwe, J. Schneider Association of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms and asbestos-induced fibrosis and tumors // *J Invest Med.* 2009 Jun;57(5):655-61.
  16. S. Helmig, M. Grossmann, J. Wübbeling, J. Schneider Interleukin gene polymorphisms in pneumoconiosis // *Int J Mol Med.* 2012 Aug;30(2):401-8.
  17. E. Emerce, M. Ghosh, D. Öner, R.C. Duca, J. Vanoirbeek, B. Bekaert, P.H.M. Hoet, L. Godderis Carbon Nanotube- and Asbestos-Induced DNA and RNA Methylation Changes in Bronchial Epithelial Cells // *Chem Res Toxicol.* 2019 May 20;32(5):850-860.
  18. J.S. Clerkin, R. Naughton, C. Quiney, T.G. Cotter Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis // *Cancer Lett.* 2008 Jul 18;266(1):30-6.
  19. N.S. Aboeella, C. Brandle, T. Kim, Z.C. Ding, G. Zhou Oxidative Stress in the Tumor Microenvironment and Its Relevance to Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel).* 2021 Feb 27;13(5):986.
  20. T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.C. Sun NF- $\kappa$ B signaling in inflammation // *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023–.
  21. A. De Gaetano, K. Solodka, G. Zanini, et al. Molecular Mechanisms of mtDNA-Mediated Inflammation // *Cells.* 2021;10(11):2898.
  22. J. Afrifa, T. Zhao, J. Yu Circulating mitochondria DNA, a non-invasive cancer diagnostic biomarker candidate. // *Mitochondrion.* 2019 Jul;47:238-243.
  23. S.J. Kim, P. Cheresch, R.P. Jablonski, L. Rachek, A. Yeldandi, R. Piseaux-Aillon, M.J. Ciesielski, K. Ridge, C. Gottardi, A.P. Lam, A. Pardo, M. Selman, V. Natarajan, D.W. Kamp Mitochondrial 8-oxoguanine DNA glycosylase mitigates alveolar epithelial cell PINK1 deficiency, mitochondrial DNA damage, apoptosis, and lung fibrosis // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020 May 1;318(5):L1084-L1096.
  24. C. Fang, X. Wei, Y. Wei Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses // *Protein Cell.* 2016;7(1):11-16.
  25. P.B. Kopnin, I.V. Kravchenko, V.A. Furalyov, L.N. Pylev, B.P. Kopnin Cell type-specific effects of asbestos on intracellular ROS levels, DNA oxidation and G1 cell cycle checkpoint // *Oncogene.* 2004 Nov 18;23(54),8834-40.
  26. S. Klebe, A.J. Hocking, M. Soeberg, J. Leigh The Significance of Short Latency in

- Mesothelioma for Attribution of Causation: Report of a Case with Predisposing Germline Mutations and Review of the Literature // *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(24):13310.
27. G. Liu, P. Cheres, D.W. Kamp Molecular basis of asbestos-induced lung disease // *Annu Rev Pathol*. 2013;8:161-187.
28. A. Marinaccio, A. Binazzi, D.D. Marzio, et al. Pleural malignant mesothelioma epidemic: incidence, modalities of asbestos exposure and occupations involved from the Italian National Register // *Int J Cancer*. 2012;130(9):2146-2154.