

## Двунитевые разрывы ДНК при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Авдеева А.С.<sup>1</sup>, Алексанкин А.П.<sup>1</sup>, Верижникова Ж.Г.<sup>1</sup>, Рыбакова В.В.<sup>1</sup>,  
 Диатроптов М.Е.<sup>1</sup>, Горбунова Ю.Н.<sup>1</sup>, Меснянкина А.А.<sup>1</sup>, Паранич Д.А.<sup>1</sup>,  
 Ли́ла А.М.<sup>1,2</sup>, Насонов Е.Л.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва;

<sup>2</sup>кафедра ревматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва; <sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва

<sup>1</sup>Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; <sup>2</sup>Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

<sup>3</sup>Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Цель исследования** — изучить у пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (ИВРЗ) частоту спонтанных фокусов двунитевых разрывов (ДР) ДНК, их взаимосвязь с активностью заболевания, уровнем маркеров воспаления и содержанием аутоантител.

**Материал и методы.** В анализ включено 40 пациентов с ИВРЗ, среди которых было 19 больных ревматоидным артритом (РА, в том числе 16 женщин, медиана длительности заболевания — 60 [20; 103] мес, DAS28 — 5,05 [4,06; 5,9]) и 21 больной системной красной волчанкой (СКВ, 19 женщин, медиана длительности заболевания — 96,0 [40,0; 158,0] мес, SLEDAI-2K — 8,0 [4,0; 12,0]). Контрольную группу составили 17 здоровых доноров, сопоставимых с больными по полу и возрасту.

ДР ДНК определялись как дискретные фокусы при иммунофлюоресцентном окрашивании культуры лимфоцитов антителами к  $\gamma$ H2AX и 53BP1 с последующим анализом на автоматизированной платформе AKLIDES (Medipan).

**Результаты и обсуждение.** Значимых различий числа спонтанных ДР ДНК у пациентов с РА и здоровых доноров не наблюдалось ( $p > 0,05$ ), у пациентов с СКВ выявлены меньшее число клеток с фокусом 53BP1 и меньший процент поврежденных клеток по данному фокусу, чем в контроле. Наблюдалась позитивная корреляция числа поврежденных по  $\gamma$ H2AX клеток с CDAI ( $r=0,45$ ,  $p=0,035$ ), числа клеток с разрывами по 53BP1 с уровнем IgM ревматоидного фактора ( $r=0,63$ ,  $p=0,005$ ) и СОЭ ( $r=0,53$ ,  $p=0,02$ ). В группе пациентов с СКВ была позитивная корреляция числа клеток с разрывами по фокусу  $\gamma$ H2AX с уровнем антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК;  $r=0,56$ ,  $p=0,007$ ), среднего числа разрывов в клетке по фокусу  $\gamma$ H2AX с уровнем анти-дсДНК ( $r=0,57$ ,  $p=0,004$ ).

**Заключение.** Число ДР ДНК может быть дополнительным показателем активности ИВРЗ. У пациентов с СКВ, видимо, имеет место нарушение процессов репарации ДНК, ассоциирующееся с высокой активностью заболевания.

**Ключевые слова:** иммуновоспалительные ревматические заболевания; двунитевые разрывы ДНК; фосфорилирование гистона H2AX; p53-связывающий белок I.

**Контакты:** Анастасия Сергеевна Авдеева; 9056249400@mail.ru

**Для ссылки:** Авдеева АС, Алексанкин АП, Верижникова ЖГ, Рыбакова ВВ, Диатроптов МЕ, Горбунова ЮН, Меснянкина АА, Паранич ДА, Ли́ла АМ, Насонов ЕЛ. Двунитевые разрывы ДНК при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях. Современная ревматология. 2023;17(4):13–18. DOI: 10.14412/1996-7012-2023-4-13-18

### DNA double-strand breaks in immunoinflammatory rheumatic diseases

Avdeeva A.S.<sup>1</sup>, Aleksankin A.P.<sup>1</sup>, Verizhnikova Zh.G.<sup>1</sup>, Rybakova V.V.<sup>1</sup>, Diatroptov M.E.<sup>1</sup>,  
 Gorbunova Yu.N.<sup>1</sup>, Mesnyankina A.A.<sup>1</sup>, Paranich D.A.<sup>1</sup>, Lila A.M.<sup>1,2</sup>, Nasonov E.L.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow; <sup>2</sup>Department of Rheumatology Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia, Moscow; <sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow

<sup>1</sup>34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; <sup>2</sup>2/1, Barrikadnaya Street, Build. 1, Moscow 125993, Russia; <sup>3</sup>8, Trubetskaya Street, Build. 2, Moscow 119991, Russia

**Objective:** To study the frequency of spontaneous foci of DNA double-strand breaks (DSBs) in patients with immune-inflammatory rheumatic diseases (IIRD), their relationship to disease activity, levels of inflammatory markers, and levels of autoantibodies.

**Material and methods.** The analysis included 40 patients with IIRD, including 19 patients with rheumatoid arthritis (RA, including 16 women, median disease duration 60 [20; 103] months, DAS28 was 5.05 [4.06; 5.9]) and 21 patients with systemic lupus erythematosus (SLE, 19 women,

median disease duration 96.0 [40.0; 158.0] months, SLEDAI-2K 8.0 [4.0; 12.0]). The control group consisted of 17 healthy donors matched for sex and age.

DNA DSBs were identified as discrete foci by immunofluorescence staining of lymphocyte cultures with antibodies against  $\gamma$ H2AX and 53BP1 and subsequently analysed using the automated AKLIDES automated platform (Medipan).

**Results and discussion.** There were no significant differences in the number of spontaneous DNA DSBs in patients with RA and healthy donors ( $p > 0.05$ ), a lower number of cells with the 53BP1 focus and a lower percentage of cells damaged in this focus were found in patients with SLE than in controls. There was a positive correlation between the number of  $\gamma$ H2AX damaged cells and CDAI ( $r = 0.45$ ,  $p = 0.035$ ), the number of cells with 53BP1 ruptures and the level of rheumatoid factor IgM ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.005$ ) and ESR ( $r = 0.53$ ,  $p = 0.02$ ). In the group of SLE patients, a positive correlation was observed between the number of cells with breaks in the  $\gamma$ H2AX focus and the level of antibodies against double-stranded DNA (anti-dsDNA;  $r = 0.56$ ,  $p = 0.007$ ), the average number of breaks in the cell in the  $\gamma$ H2AX focus with the level of anti-dsDNA ( $r = 0.57$ ,  $p = 0.004$ ).

**Conclusion.** The number of DNA DSBs may be an additional indicator of IIRD activity. In patients with SLE, DNA repair processes appear to be impaired, which is associated with the high activity of the disease.

**Keywords:** immunoinflammatory rheumatic diseases; DNA double strand breaks; phosphorylation of histone H2AX; p53 binding protein I.

**Contact:** Anastasia Sergeevna Avdeeva; 9056249400@mail.ru

**For reference:** Avdeeva AS, Aleksankin AP, Verizhnikova ZhG, Rybakova VV, Diatroptov ME, Gorbunova YuN, Mesnyankina AA, Paranich DA, Lila AM, Nasonov EL. DNA double-strand breaks in immunoinflammatory rheumatic diseases. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*. 2023;17(4):13–18. DOI: 10.14412/1996-7012-2023-4-13-18

Решающее значение для поддержания гомеостаза и биологических функций организмов имеют целостность и стабильность ДНК, а также четко налаженный механизм системы реагирования и репарации ДНК (РПП ДНК) после вызванных повреждений молекулярной структуры различного эндогенного или экзогенного происхождения.

Структурные повреждения ДНК, возникающие в клетках в результате неправильной репарации или ее отсутствия, приводят к образованию хромосомных aberrаций [1]. Число клеток, несущих хромосомные нарушения, повышается с возрастом, ассоциируется с развитием ряда заболеваний (сердечно-сосудистых, неврологических, онкологических) и старением [2, 3]. Неблагоприятные факторы внешней среды, в первую очередь ионизирующее излучение, приводят к повышению частоты хромосомных аномалий [4]. Роль эндогенных факторов, влияющих на геномную стабильность, изучена недостаточно. В ряде работ продемонстрирована тесная связь между воспалением, окислительным стрессом и нарушением целостности ДНК [5]. Стабильность генома зависит и от генетических факторов, что подтверждается наличием ряда синдромов, в основе которых лежат мутации в генах репарации ДНК [6, 7]. Однако, учитывая различную чувствительность клеток на фоне одинакового генотипа, можно говорить о наличии эпигенетических факторов, таких как метилирование, влияющих на частоту хромосомных нарушений [8, 9].

Помимо метилирования, наиболее изученным эпигенетическим механизмом поддержания стабильности генома является фосфорилирование гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX), приводящее к формированию фокусов белков репарации ДНК [10–12]. Они представляют собой комплексы, состоящие из самих белков репарации, двунитевых разрывов (ДР) и сигнальных молекул. Фосфорилирование  $\gamma$ H2AX наблюдается уже через несколько секунд после повреждающего воздействия и достигает максимума через 9–30 мин. Несмотря на быстроту и эффективность процессов репарации ДНК, остаточные фокусы репарации могут длительно сохраняться в поврежденных клетках, что является показателем эффективности процессов репарации. Фосфорилированная форма  $\gamma$ H2AX часто используется в качестве биомаркера клеточного ответа

на повреждение ДНК [13]. Однако следует отметить, что  $\gamma$ H2AX не только является маркером ДР ДНК, но и принимает участие в ряде процессов, в том числе в поддержании клеточного старения [14]. Помимо фосфорилирования  $\gamma$ H2AX, для эффективной репарации ДНК необходим ряд белков и в первую очередь р53-связывающий белок I (53BP1), являющийся ключевым сигнальным фактором репарации, который может активировать ряд других медиаторов и способствовать репарации ДР ДНК [15].

ДР ДНК можно определить как дискретный фокус при иммунофлюоресцентном окрашивании антителами к  $\gamma$ H2AX (анти- $\gamma$ H2AX) и 53BP1 (анти-53BP1) культуры лимфоцитов. [16] После успешного восстановления ДР ДНК молекулы  $\gamma$ H2AX дефосфорилируются [17].

Исследований, посвященных определению ДР ДНК при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (ИВРЗ), крайне мало. Остается неясным, приводит ли хроническое воспаление к увеличению накопления повреждений ДНК, или повышение их числа может способствовать усилению активности заболевания либо служить показателем дисрегуляции механизмов репарации [18]. Однако, поскольку накопление эндогенных повреждений ДНК имеет серьезные последствия для клеток, включая геномную нестабильность и усиление aberrантного иммунного ответа, изучение ДР ДНК может быть полезно для расширения наших знаний о патогенезе и механизмах прогрессирования ИВРЗ, а также для разработки новых методов терапии и определения риска развития обострений.

**Цель** настоящей работы – изучение у пациентов с ИВРЗ частоты спонтанных фокусов ДР ДНК, их взаимосвязи с активностью заболевания, уровнем маркеров воспаления и содержанием аутоантител.

**Материал и методы.** В анализ было включено 40 пациентов с ИВРЗ. Среди них было 19 больных с достоверным диагнозом ревматоидного артрита (РА), соответствовавших критериям ACR/EULAR (American College of Rheumatology / European Alliance of Associations for Rheumatology) 2010 г. и 21 больной с достоверным диагнозом системной красной волчанки (СКВ) по критериям SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) 2012 г., наблюдавшихся в ФГБНУ «На-

Таблица 1. Клинико-иммунологическая характеристика больных (n=40)  
Table 1. Clinical and immunological characteristics of patients (n=40)

Показатель	Значение	
	больные РА (n=19)	больные СКВ (n=21)
Пол: мужчины/женщины, n	3/16	2/19
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	55,0 [46,0; 65,0]	31,0 [26,0; 43,0]
Длительность заболевания, мес, Ме [25-й; 75-й перцентили]	60,0 [20,0; 103,0]	96,0 [40,0; 158,0]
Рентгенологическая стадия, n: I /II/III/IV	2/12/4/1	—
DAS28, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5,04 [4,06; 5,9]	—
SLEDAI-2K, Ме [25-й; 75-й перцентили]	—	8,0 [4,0; 12,0]
Иммунологические нарушения, n (%): АНФ+ анти-дсДНК+	— —	21 (100) 19 (90,5)
HAQ, Ме [25-й; 75-й перцентили]	1,06 [0,87; 1,68]	—
СОЭ мм/ч, Ме [25-й; 75-й перцентили]	27,0 [19,0; 58,0]	13,0 [6,0; 18,0]
СРБ, мг/мл, Ме [25-й; 75-й перцентили]	10,5 [1,75; 41,2]	1,3 [1,0; 4,9]
IgM РФ, МЕ/мл, Ме [25-й; 75-й перцентили]	70,1 [34,3; 343,5]	—
IgM РФ+, n	17	—
IgM РФ-, n	2	—
АЦЦП, Ед/мл, Ме [25-й; 75-й перцентили]	92,4 [7,7; 614,0]	—
АЦЦП+, n	11	—

**Примечание.** АНФ – антинуклеарный фактор; АЦЦП – антитела к циклическому цитруллин-линированному пептиду; SLEDAI-2K – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2K; HAQ – Health Assessment Questionnaire.

струкции фирмы-изготовителя за верхнюю границу нормы IgM РФ была принята концентрация 15,0 МЕ/мл. Количественное определение АЦЦП и антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК) в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих наборов реагентов Axis-Shield (Великобритания; верхняя граница нормы – 5,0 ЕД/мл) и ORGENTEC Diagnostika (Германия; верхняя граница нормы – 20,0 МЕ/мл). Уровень АНФ оценивали в непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) на клетках линии Нер2 с использованием коммерческого набора реагентов IMMCO Diagnostics (США).

В группе РА был проанализирован уровень интерлейкина (ИЛ) 6, ИЛ18, ИЛ10, антагониста рецептора к ИЛ1 (ИЛ1Ра) методом ИФА с использованием коммерческого набора реагентов фирмы Invitrogen (США). Верхняя граница нормы при исследовании 15 сывороток здоровых доноров составила для ИЛ6 – 0,46 пг/мл, ИЛ18 – 192,2 пг/мл, ИЛ10 – 0,48 пг/мл, ИЛ1Ра – 641,2 пг/мл.

ДР ДНК определяли с помощью НРИФ, путем окрашивания и количественного подсчета фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в лимфоцитах с автоматизированной обработкой данных. Использовались коммерческие наборы реагентов Medipan (Германия).

учно-исследовательский институт ревматологии им В.А. Насоновой» (табл. 1). Контрольную группу составили 17 здоровых доноров, сопоставимых с больными по полу и возрасту.

Как видно из табл. 1, большинство больных были женского пола, среднего возраста, с длительным течением заболевания (медиана длительности РА и СКВ – соответственно 60,0 и 96,0 мес), серопозитивные по аутоантителам, имели высокую активность заболевания. Среди больных РА 4 (21,1%) получали генно-инженерные биологические препараты (ГИБП), все пациенты использовали базисные противовоспалительные препараты, включая метотрексат (n=15, 78,9%) и лефлуномид (n=3, 15,8%), а также нестероидные противовоспалительные препараты и глюкокортикоиды (ГК) до 10 мг/сут в пересчете на преднизолон. Все пациенты с СКВ находились на терапии ГК, 15 (71,4%) принимали гидроксихлорохин, 6 (28,6%) – микофенолата мофетил, 9 (42,9%) имели опыт применения ГИБП.

Активность РА оценивали по индексу DAS28, а активность СКВ – по SLEDAI-2K.

СОЭ определяли стандартным методом по Вестергрену (норма  $\leq 30$  мм/ч); сывороточную концентрацию СРБ и IgM ревматоидного фактора (РФ) – иммунонефелометрическим методом на анализаторе BN ProSpec (Siemens, Германия); СРБ – с помощью высокочувствительного теста с латексным усилением (чувствительность – 0,175 мг/л). Нормальный уровень СРБ в сыворотке крови составлял  $\leq 5,0$  мг/л. По ин-

Кровь собирали в пробирки с ЭДТА, хранение биоматериала допускалось не более 3 ч. На первой стадии реакции изолированные клетки фиксируются на носителе объекта с помощью фиксирующего раствора. После инкубирования незафиксированные клетки удаляются путем промывки. На второй стадии реакции стенки фиксируемых клеток разрушаются при помощи пермеабилизирующего раствора. На следующем этапе промывки неспецифические места блокируются посредством буфера. На третьей стадии реакции первичное антитело специфически связывается с  $\gamma$ H2AX, вторичное – с 53BP1. После инкубирования неспецифические соединения блокируются буфером. На последней стадии реакции маркированное флюорохромом вторичное антитело связывается с первичным антителом. После инкубации не связанные антитела удаляются путем промывки буфером. В завершение на лунки наносится покровное средство, содержащее DAPI и окрашивающее клетки, после чего поверх кладется покровное стекло.

Для оценки результатов проводится автоматический анализ носителей объекта с помощью системы AKLIDES Nuk и соответствующего программного обеспечения. При этом подсчитываются клетки одинаковой морфологии, не расположенные друг над другом и не находящиеся в апоптозе. При невозможности немедленного анализа носителей объекта допускается их хранение в холодильнике при температуре 2–8 °С в течение 24 ч.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ / ORIGINAL INVESTIGATIONS

Таблица 2. ДР ДНК у пациентов с РА, СКВ и здоровых доноров, Ме [25-й; 75-й перцентили]  
Table 2. DNA DSBs in patients with RA, SLE and healthy donors, Me [25th; 75th percentile]

Показатель	Больные РА (n=19)	Больные СКВ (n=21)	Здоровые доноры (n=17)
<b>γH2AX:</b>			
число клеток с разрывами	12 [4; 27]	3,0 [0; 13,0]	11,0 [8; 25]
число разрывов на клетку	0,28 [0,09; 0,44]	0,46 [0; 3,1]	0,25 [0,11; 0,5]
поврежденные клетки, %	23,5 [9; 37,5]	18,0 [0; 66,7]	21,4 [10,3; 50,0]
<b>53BP1:</b>			
число клеток с разрывами	29 [11; 72]	3,0 [2,0; 15,0]*	35,0 [10; 45]
число разрывов на клетку	1,3 [0,4; 3,9]	0,39 [0,05; 1,23]	0,81 [0,4; 2,5]
поврежденные клетки, %	42,9 [29; 75,5]	18,2 [4,0; 33,9]*	40,5 [26,7; 69,8]
Колокализация (одновременное обнаружение γH2AX и 53BP1)	0,0 [0; 2,0]	0 [0; 0]	0 [0; 2,0]

\* $p < 0,05$  при сравнении групп СКВ и здоровых доноров.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна–Уитни, а при сравнении трех и более групп – критерий Краскела–Уоллеса. Результаты представлены в виде медианы (Ме) с интерквартильным интервалом [25-й; 75-й перцентили]. Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Значимых различий числа спонтанных разрывов ДНК у пациентов с РА и здоровых доноров не выявлено ( $p > 0,05$ ); у пациентов с СКВ установлены меньшее число клеток с фокусом 53BP1 и меньший процент поврежденных клеток по данному фокусу (табл. 2).

В группе РА наблюдалась позитивная корреляционная взаимосвязь числа поврежденных клеток по фокусу γH2AX с CDAI (Clinical Disease Activity Index;  $r = 0,45$ ,  $p = 0,035$ ), числа клеток с разрывами по фокусу 53BP1 с СОЭ ( $r = 0,53$ ,  $p = 0,02$ ) и IgM РФ ( $r = 0,63$ ,  $p = 0,005$ ). У пациентов с высокой активностью по CDAI ( $n = 10$ ) обнаружены большее число клеток с разрывами по фокусу γH2AX (22,5 [6,0; 43,0]), большее число разрывов на клетку (0,39 [0,19; 0,62]) и больший процент поврежденных клеток (32,6 [18,7; 39,1]), чем у больных с низкой/умеренной воспалительной активностью ( $n = 9$ ; соответственно 9,0 [2; 12]; 0,12 [0,02; 0,28] и 11,5 [1,8; 23,5];  $p < 0,05$ ). В группе РА оценивался уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов. Выявлена позитивная корреляция среднего числа клеток с разрывами по фокусу γH2AX с уровнем ИЛ10 ( $r = 0,82$ ,  $p = 0,004$ ), процента поврежденных клеток по фокусу γH2AX с уровнем ИЛ10 ( $r = 0,79$ ,  $p = 0,006$ ), числа клеток с разрывами по фокусу 53BP1 с уровнем ИЛ6 ( $r = 0,69$ ,  $p = 0,03$ ).

В группе СКВ была обнаружена позитивная корреляция числа клеток с разрывами по фокусу γH2AX с уровнем анти-дсДНК ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,007$ ), среднего числа разрывов в клетке по фокусу γH2AX с уровнем анти-дсДНК ( $r = 0,57$ ,  $p = 0,004$ ). У пациентов с высокой активностью заболевания (SLEDAI-2K  $> 6$ ,  $n = 14$ ) отмечалось значимо меньшее число клеток с фокусом 53BP1 – 2,0 [1,0; 6,0], чем у пациентов с низкой активностью заболевания (SLEDAI-2K  $< 6$ ,  $n = 7$ ) – 21,0 [3,0; 65,0],  $p < 0,05$ .

**Обсуждение.** Одним из важных эндогенных факторов, влияющих на целостность ДНК, является воспаление. В последнее десятилетие воспаление рассматривается не только

в контексте инфекционного процесса и ревматических заболеваний, но и гораздо шире – в качестве патогенетического механизма развития метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также старения [5]. Описана возрастная активация воспалительных маркеров в крови и тканях при отсутствии каких-либо специфических индукторов воспаления. [19] Появляющиеся в литературе данные указывают на повреждение ДНК как общий механизм, лежащий в основе гетерогенности воспалительных фенотипов [20–22]. Многочисленные повреждения ДНК и их накопление могут изменять экспрессию белков, включая факторы транскрипции, и, как следствие, регуляцию молекулярных сигнальных путей, что приводит к различным патологическим процессам [23]. Один из самых тяжелых типов повреждения ДНК – ДР ДНК. Нарушения в системе РРП ДНК приводят к накоплению цитозольных одноцепочечных и двухцепочечных ДНК, которые могут действовать как мощные иммуностимуляторы посредством активации продукции интерферона I типа, влияя на процессы врожденного иммунного ответа [24]. Стабильность и сохранение генетической информации – основная задача функционирования клетки; любое повреждение ДНК сопровождается продукцией широкого спектра цитокинов, передающих информацию о повреждении, что приводит к остановке клеточного деления и развитию ответа на повреждение [25]. В то же время нарушение иммунного гомеостаза и длительная воспалительная реакция, вызванная различными факторами, могут повлечь за собой повреждение ДНК и активацию сети РРП ДНК. Такие механизмы описаны у больных с ИВРЗ [18].

В нашей работе оценена частота спонтанных фокусов ДР ДНК у пациентов с ИВРЗ. При этом не выявлено значимых различий числа спонтанных ДР ДНК у пациентов с РА и здоровых доноров. В группе больных СКВ уровень фосфорилирования гистона H2AX не отличался от соответствующего показателя у здоровых доноров, а уровень белка репарации 53BP1 был ниже, чем в контроле.

V.L. Souliotis и P.P. Sfikakis [26], которые обследовали пациентов с волчаночным нефритом (ВН) и группу контроля, отметили, более выраженное повреждение ДНК у больных ВН. При воздействии на клетки, полученные у пациентов этой группы, более низкие дозы мелфалана и цисплатина привели к увеличению числа ДР ДНК, а концентрация ДР ДНК была выше, чем в клетках здоровых добровольцев. V.L. Souliotis и соавт. [27] предположили, что нарушения механизмов репарации ДНК возникают при СКВ независимо от клинической активности заболевания и могут способ-

ствовать апоптозу лимфоцитов, а коррекция этих отклонений может иметь терапевтическую ценность при СКВ. В настоящей работе были получены сходные данные о более низком уровне белка репарации 53BP1 у пациентов с СКВ, однако его содержание зависело от активности заболевания. С. Micheli и соавт. [28] при оценке количества фокусов  $\gamma$ H2AX и системы репарации ДР ДНК после обработки Т-клеток митомицином у больных СКВ выявили большее число очагов  $\gamma$ H2AX, чем у здоровых лиц (контроль). R. Namas и соавт. [29] отмечают, что при СКВ количество ДР ДНК в CD4+ Т-клетках, CD8+ Т-клетках и моноцитах было значительно повышено по сравнению с контролем (здоровые лица) и коррелировало с активностью заболевания. В настоящей работе также была выявлена взаимосвязь числа клеток с разрывами по фокусу  $\gamma$ H2AX с уровнем анти-дсДНК.

Число спонтанных фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 может указывать не только на ДР ДНК, но и ассоциироваться с незавершенной репарацией разрыва ДНК, изменением структуры хроматина, старением, нарушением функционирования теломер. Клеточное старение ограничивает пролиферацию поврежденных клеток, что является защитной реакцией против опухолевой трансформации. Уже в 2009 г. было продемонстрировано наличие постоянных фокусов повреждения ДНК в стареющих фибробластах в отсутствие обнаруживаемых

повреждений ДНК [30]. Комплексы репарации ДНК могут собираться на концевых участках теломер в связи с их укорочением. [31]

Определение уровня ДР ДНК имеет важное значение для оценки эффектов различных лекарственных препаратов. А. Reddig и соавт. [32] оценили число индуцированных ионизирующим облучением фокусов ДР ДНК в культуре клеток здоровых доноров, которые инкубировали с различными ингибиторами JAK-киназ (тофацитиниб, барицитиниб, упадоцитиниб и филгитиниб), а затем подвергали  $\gamma$ -облучению в дозе 2Гр. Авторы продемонстрировали дозозависимое нарастание числа фокусов повреждения ДНК при воздействии ингибиторов JAK-киназ, а также снижение темпов их репарации, которое было наиболее значимым для филгитиниба.

**Заключение.** Таким образом, появление спонтанных фокусов ДР ДНК может, с одной стороны, ассоциироваться с хроническим воспалением и окислительным стрессом, а с другой — указывать на неправильную репарацию ДНК с нарушением структуры теломер и старением клетки. Следует отметить, что ДР ДНК могут стать новым маркером системных аутоиммунных заболеваний, значимость которого для оценки активности заболевания, эффективности и безопасности терапии предстоит уточнить в будущих исследованиях.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Jeggo PA, Pear LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jan;16(1):35-42. doi: 10.1038/nrc.2015.4. Epub 2015 Dec 15.
- Migliore L, Coppede F, Fenech M, Thomas P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):85-92. doi: 10.1093/mutage/geq067.
- Rube CE, Fricke A, Widmann TA, et al. Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging. *PLoS One*. 2011 Mar 7;6(3):e17487. doi: 10.1371/journal.pone.0017487.
- Vozilova AV, Shagina NB, Degteva MO, Akleyev AV. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: cytogenetic 323 analysis more than 50 years after onset of exposure. *Mutat Res*. 2013 Aug 30;756(1-2):115-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.016. Epub 2013 Jun 7.
- Pezone A, Olivieri F, Napoli MV, et al. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both. *Nat Rev Rheumatol*. 2023 Apr;19(4):200-211. doi: 10.1038/s41584-022-00905-1. Epub 2023 Feb 7.
- Passerini V, Ozeri-Galai E, de Pagter MS, et al. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. *Nat Commun*. 2016 Feb 15;7:10754. doi: 10.1038/ncomms10754.
- Chrzanowska K, Gregorek H, Dembowska-Baginska B, et al. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Feb 28;7:13. doi: 10.1186/1750-1172-7-13.
- Ванюшин БФ. Метилирование ДНК и эпигенетика. *Генетика*. 2006;42(9):985-997. [Vanyushin BF. DNA methylation and epigenetics. *Genetika*. 2006;42(9):985-997. (In Russ.)].
- Кузьмина НС, Лаптева НШ, Русина ГГ и др. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017;(4):341-356. [Kuz'mina NS, Lapteva NSh, Rusinova GG, et al. Hypermethylation of gene promoters in human blood leukocytes in the long-term period after radiation exposure. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017;(4):341-356. (In Russ.)].
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 2000;10(15):886-95. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00610-2.
- Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther*. 2003 May-Jun;2(3):233-5. doi: 10.4161/cbt.2.3.373.
- Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, et al. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*. 2003 Jun;81(3):123-9. doi: 10.1139/o03-042.
- Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res*. 2015 Mar 11;43(5):2489-98. doi: 10.1093/nar/gkv061. Epub 2015 Feb 20.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 2005 Dec 29;123(7):1213-26. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.038.
- Iwabuchi K, Basu BP, Kysela B, et al. Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):36487-95. doi: 10.1074/jbc.M304066200. Epub 2003 Jun 24.
- Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX — a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008 May-Jun;22(3):305-9.
- Chowdury D, Keogh MC, Ishii H, et al.  $\gamma$ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*. 2005 Dec 9;20(5):801-9. doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.003. Epub 2005 Nov 28.
- Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M, et al. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 20;21(1):55. doi: 10.3390/ijms21010055.
- Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Sep;15(9):505-522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2.
- Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. DNA damage response and immune defense. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 12;21(20):7504. doi: 10.3390/ijms2107504.
- Alfano M. Ageing, inflammation and DNA damage in the somatic testicular niche with idiopathic germ cell aplasia. *Nat Commun*. 2021 Sep 1;12(1):5205. doi: 10.1038/s41467-021-25544-0.
- Higo T. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun*. 2017 Apr 24;8:15104. doi: 10.1038/ncomms15104.

23. Saez GT. DNA Damage and Repair in Degenerative Diseases 2016. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 16;18(1):166. doi: 10.3390/ijms18010166.
24. Klein B, Günther C. Type I Interferon Induction in Cutaneous DNA Damage Syndromes. *Front Immunol*. 2021 Jul 23;12:715723. doi: 10.3389/fimmu.2021.715723. eCollection 2021.
25. Burton DG, Faragher RG. Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. *Age (Dordr)*. 2015;37(2):27. doi: 10.1007/s11357-015-9764-2. Epub 2015 Mar 20.
26. Souliotis VL, Sfikakis PP. Increased DNA double-strand breaks and enhanced apoptosis in patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2015 Jul;24(8):804-15. doi: 10.1177/0961203314565413. Epub 2014 Dec 26.
27. Souliotis VL, Vougas K, Gorgoulis VG, Sfikakis PP. Defective DNA repair and chromatin organization in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2016 Aug 4;18(1):182. doi: 10.1186/s13075-016-1081-3.
28. Micheli C, Parma A, Tani C, et al. UCTD and SLE patients show increased levels of oxidative and DNA damage together with an altered kinetics of DSB repair. *Mutagenesis*. 2021 Nov 29;36(6):429-436. doi: 10.1093/mutage/geab036.
29. Namas R, Renauer P, Ogenovski M, et al. Histone H2AX phosphorylation as a measure of DNA double-strand breaks and a marker of environmental stress and disease activity in lupus. *Lupus Sci Med*. 2016 Apr 29;3(1):e000148. doi: 10.1136/lupus-2016-000148. eCollection 2016.
30. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009 Aug;11(8):973-9. doi: 10.1038/ncb1909. Epub 2009 Jul 13.
31. Nakamura AJ, Redon CE, Bonner WM, Sedelnikova OA. Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells. *Aging (Albany NY)*. 2009 Feb 4;1(2):212-8. doi: 10.18632/aging.100019.
32. Reddig A, Voss L, Guttek K, et al. Impact of Different JAK Inhibitors and Methotrexate on Lymphocyte Proliferation and DNA Damage. *J Clin Med*. 2021 Apr 1;10(7):1431. doi: 10.3390/jcm10071431.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

11.04.2023/20.06.2023/23.06.2023

#### Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Статья подготовлена в рамках фундаментальной темы № 1021051402790-6 «Изучение иммунопатологии, диагностики и терапии на ранних стадиях системных ревматических заболеваний».

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has been conducted within basic scientific topic № 1021051402790-6 "Study of immunopathology, diagnosis and therapy in the early stages of systemic rheumatic diseases."

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Авдеева А.С. <https://orcid.org/0000-0003-3057-9175>  
 Алексанкин А.П. <https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>  
 Верижникова Ж.Г. <https://orcid.org/0000-0002-4829-5210>  
 Рыбакова В.В. <https://orcid.org/0000-0003-1404-4963>  
 Диатроптов М.Е. <https://orcid.org/0000-0001-6404-0042>  
 Горбунова Ю.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2024-6927>  
 Меснянкина А.А. <https://orcid.org/0000-0001-5411-7317>  
 Паранич Д.А. <https://orcid.org/0009-0004-3338-8256>  
 Лиля А.М. <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>  
 Насонов Е.Л. <https://orcid.org/0000-0002-1598-8360>