



Зайцева Н.В.<sup>1</sup>, Долгих О.В.<sup>1</sup>, Летюшев А.Н.<sup>2</sup>, Казакова О.А.<sup>1</sup>, Ганич Т.С.<sup>1</sup>

## Особенности экспрессии генов *TLR4* и *MMP9* у детей, модифицированной антигеном SARS-CoV-2 и бенз(а)пиреном

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125993, Москва, Россия

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Экспозиция химическими и биологическими средовыми факторами сопряжена с риском реализации генетической предрасположенности к развитию астении и онкоассоциированных болезней, что определяет актуальность поиска генетических индикаторных маркёров ранних нарушений уровня транскрипции мРНК, ассоциированного с определёнными аллелями полиморфных генов в условиях современных вызовов и угроз здоровью населения.

**Цель работы** – характеристика особенностей экспрессии генов *TLR4* и *MMP9*, модифицированной антигеном SARS-CoV-2 и бенз(а)пиреном у детей.

**Материалы и методы.** Проведён анализ полиморфизма генов *MMP9 Gln279Arg* (rs17576), *TLR4 A8595G* (rs1927911), а также относительного нормализованного уровня экспрессии транскриптов *MMP9 Hs00234579\_m1* (20q13.12), *TLR4 Hs00152939\_m1* (9q33.1) в культуре клеток цельной крови детей и подростков (возрастной диапазон от 10 до 16 лет). Был изучен полиморфизм как спонтанный, так и индуцированный 24-часовой инкубацией бенз(а)пиреном и вакцинными антигенами (на примере SARS-CoV-2,  $1 \pm 0,5 \cdot 10^{11}$  частиц).

**Результаты.** Установлено, что бенз(а)пирен оказывает потенцирующий эффект на экспрессию *MMP9* и угнетающий на *TLR4*, сочетание экспозиции бенз(а)пиреном с вакцинными антигенами SARS-CoV-2 *in vitro* приводило к разнонаправленным эффектам в зависимости от генотипа (полиморфизма) исследуемых генов. Показана способность бенз(а)пирена и антигенов SARS-CoV-2 модифицировать *in vitro* экспрессию кандидатных генов *MMP9*, *TLR4*, что позволяет рассматривать гены и продукты их экспрессии *MMP9 Hs00234579\_m1* и *TLR4 Hs00152939\_m1* в качестве индикаторных для задач ранней диагностики астении и онкопролиферативных состояний.

**Ограничения исследования.** Ограничения на проведение исследований заключаются в ограниченности выборки и объёма экспериментального исследования.

**Заключение.** Результаты экспериментальных исследований *in vitro* показали способность бенз(а)пирена и SARS-CoV-2 модифицировать экспрессию генов матричной металлопротеиназы *MMP9 Gln279Arg* (rs17576) и толл-подобного рецептора *TLR4 A8595G* (rs1927911), что позволяет рассматривать транскрипты *Hs00234579\_m1* и *Hs00152939\_m1* в качестве критериев формирования астении в условиях течения вирусных инфекций (SARS-CoV-2) в связи с активацией фермента, разрушающего внеклеточный матрикс для обладателей AA дикого и AG гетерозиготного генотипов гена *MMP9 Gln279Arg*. В случае гетерозиготного AG-генотипа гена *TLR4 A8595G* сочетание бенз(а)пирена и SARS-CoV-2 (26-й серотип) приводит к формированию иммуносупрессии, что фенотипически может сопровождаться развитием онкопролиферативных процессов. Транскрипты *MMP9 Hs00234579\_m1* и *TLR4 Hs00152939\_m1* рекомендуются в качестве маркёров ранних нарушений, ассоциированных с экспозицией SARS-CoV-2 + бенз(а)пирен.

**Ключевые слова:** SARS-COV-2; бенз(а)пирен; экспрессия гена; TP53, *MMP9 Hs00234579\_m1*; *TLR4 Hs00152939\_m1*

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование выполнено с соблюдением этических требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ред. 2000 г.) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 23 от 20.12.2021 г.). Было получено информированное согласие участников исследования.

**Для цитирования:** Зайцева Н.В., Долгих О.В., Летюшев А.Н., Казакова О.А., Ганич Т.С. Особенности экспрессии генов *TLR4* и *MMP9* у детей, модифицированной антигеном SARS-CoV-2 и бенз(а)пиреном. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(6): 584–590. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-6-584-590> <https://elibrary.ru/prbfbw>

**Для корреспонденции:** Казакова Ольга Алексеевна, ст. науч. сотр., зав. лаб. иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь. E-mail: chakina2011@yandex.ru

**Участие авторов:** Зайцева Н.В. – концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста; Долгих О.В. – концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста; Летюшев А.Н. – концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста; Казакова О.А. – сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание и редактирование текста; Ганич Т.С. – сбор и обработка материала. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 03.04.2024 / Поступила после доработки: 25.04.2024 / Принята к печати: 19.06.2024 / Опубликовано: 17.07.2024

Nina V. Zaitseva<sup>1</sup>, Oleg V. Dolgikh<sup>1</sup>, Aleksandr N. Letyushev<sup>2</sup>, Olga A. Kazakova<sup>1</sup>,  
Tatiana S. Ganich<sup>1</sup>

## Features of *TLR4* and *MMP9* gene expression modified with SARS-CoV-2 antigen and benzapyrene in children

<sup>1</sup>Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993, Russian Federation

### ABSTRACT

**Introduction.** Exposure to chemical and biological environmental factors is associated with the risk of realizing genetic predisposition to the development of asthenia and cancer-associated diseases, which determines the relevance of the search for genetic indicator markers of early abnormalities in mRNA structure in the context of modern threats and challenges to public health. **The aim of the study:** characteristics of the expression of *TLR4* and *MMP9* genes modified by the SARS-CoV-2 antigen and benz(a)pyrene in children.

**Materials and methods.** We analyzed the polymorphism of *MMP9* Gln279Arg (rs17576), *TLR4* A8595G (rs1927911) genes, as well as the relative normalized expression level of *MMP9* Hs00234579\_m1 (20q13.12), *TLR4* Hs00152939\_m1 (9q33.1) in whole blood cell culture both spontaneous and induced by 24 hour incubation with benz(a)pyrene and vaccine antigens (using SARS-CoV-2,  $1.0 \pm 0.5 \cdot 10^{11}$  particles as an example) in adolescents of 10–16 years.

**Results.** Benz(a)pyrene was found to have a potentiating effect on *MMP9* expression and a suppressive effect on *TLR4*. The combination of benz(a)pyrene exposure with SARS-CoV-2 vaccine antigens “in vitro” resulted in differently directed effects depending on the genotype (polymorphism) of the genes under study. The ability of benz(a)pyrene and SARS-CoV-2 antigens to modify “in vitro” expression of *MMP9*, *TLR4* candidate genes was shown, which allows considering genes and products of their expression *MMP9* Hs00234579\_m1 and *TLR4* Hs00152939\_m1 as indicator genes for early diagnosis of the development of asthenia and oncoproliferative states.

**Limitations.** Limitations of the study include the limited sample and scope of the pilot study.

**Conclusion.** The results of experimental studies “in vitro” showed the ability of benz(a)pyrene and SARS-CoV-2 to modify the expression of genes of matrix metalloproteinase *MMP9* Gln279Arg (rs17576) and toll-like receptor *TLR4* A8595G (rs1927911), which allows considering transcripts Hs00234579\_m1 and Hs00152939\_m1 as criteria for the formation of asthenia in the course of viral infections (SARS-CoV-2) due to activation of the enzyme that destroys the extracellular matrix for AA wild-type and AG heterozygous genotype of the *MMP9* Gln279Arg gene. In the case of heterozygous AG genotype of *TLR4* A8595G gene, the combination of benz(a)pyrene and SARS-CoV-2 (26 serotype) leads to the formation of immunosuppression, which phenotypically may be accompanied by the development of oncoproliferative processes. *MMP9* Hs00234579\_m1 and *TLR4* Hs00152939\_m1 transcripts are recommended as markers of early disorders associated with SARS-CoV-2+benz(a)pyrene exposure.

**Keywords:** SARS-COV-2; benz(a)pyrene; gene expression; TP53; *MMP9* Hs00234579\_m1; *TLR4* Hs00152939\_m1

**Compliance with ethical standards.** The study was performed in compliance with the ethical requirements of the WMA Declaration of Helsinki, 2000 and the protocol of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, 1999. The study was approved by the LEC of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Technologies for Population Health Risk Management of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Protocol No. 23 of 20.12.2021). Informed consent was obtained for the study participants.

**For citation:** Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Letyushev A.N., Kazakova O.A., Ganich T.S. Features of *TLR4* and *MMP9* gene expression modified with sars-cov-2 antigen and benzapyrene in children. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2024; 103(6): 584–590. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-6-584-590> <https://elibrary.ru/prfbfw> (In Russ.)

**For correspondence:** Olga A. Kazakova, MD, PhD, senior researcher of the Immunogenetics laboratory of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: chakina2011@yandex.ru

**Contribution:** Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Letyushev A.N. – concept and design of the study, writing and editing of the text; Kazakova O.A. – collection and processing of material, statistical processing, writing and editing of the text; Ganich T.S. – collection and processing of material. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: April 4, 2024 / Revised: April 25, 2024 / Accepted: June 19, 2024 / Published: July 17, 2024

### Введение

Развитие человечества и его благополучие неразрывно связаны с влиянием окружающей среды, при этом деятельность человека модифицирует её химическую и биологическую составляющие, привнося в избыточном количестве искусственные синтетические соединения и биологические агенты, к которым в силу скорости эволюционных адаптационных процессов в человеческом организме ещё не выработаны механизмы защиты. Принято считать, что на здоровье человека могут влиять такие факторы, как питание, физическая активность, загрязнение среды обитания, распространённость инфекционных болезней и генетическая предрасположенность. Соотношение этих факторов варьирует, по данным разных авторов, в пределах 20–25%. Если на первые четыре фактора индивид способен повлиять, то генетический фактор — это уникальная особенность, не зависящая от человека, сформированная накоплением огром-

ного числа мутаций, полученных от предыдущих поколений, в том числе под воздействием биологических агентов [1].

Геном человека закладывается в половых клетках ещё до формирования плода, однако химические вещества и биологические агенты могут модифицировать его структуру. Химические вещества способны не только к радикальным перестройкам в цепи ДНК в виде потери фрагмента, закольцевания фрагментов, переноса и повторов, но и к случайному включению и выключению отдельных сайтов, считыванию с которых экспрессируются белки, необходимые для адекватного жизнеобеспечения организма. Биологические агенты способны встраивать свой генетический код в структуру человеческой ДНК, что также сказывается на функции изменённых белков. В таких случаях происходит либо активация избыточной экспрессии, либо отключение функции критически важных генов. В случае такого воздействия на половые клетки человека эти изменения могут закрепиться в поколениях, неся в себе «дефектные» гены, реализация

которых может привести к болезням, в том числе сердечно-сосудистой системы, центральной нервной системы и системы иммунитета [2].

Бенз(а)пирен является сравнительно устойчивым к деградации химическим веществом в объектах окружающей среды, в результате чего долго мигрирует из одного объекта в другой (воздух, вода, почва), делая их вторичными источниками загрязнения.

Токсичность бенз(а)пирена зависит от его метаболической активации. Переходная преобразованная форма 3-гидроксibenз(а)пирен образуется путём детоксикации, тогда как форма транс-анти-7,8,9,10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирен имеет канцерогенный путь преобразования [3].

В процессе метаболизма могут образовываться различные нестабильные и реакционноспособные промежуточные продукты – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), которые «атакуют» ДНК, вызывая токсические эффекты и трансформацию клеток.

Существуют межиндивидуальные различия в уровнях экспрессии и каталитической активности различных ферментов, которые активируют и (или) детоксифицируют ПАУ в тканях и органах человека, что является решающим для понимания индивидуальных особенностей реакции на ПАУ.

Биологический агент SARS-Cov-2, распространившийся в 2019 г. и унёсший жизни миллионов людей во всём мире, до сих пор не теряет своей актуальности, так как за последние пять лет вирус претерпел несколько преобразований и окончательно слился с ежегодными вспышками ОРВИ и гриппа. Несмотря на огромное количество исследований, направленных на изучение негативного воздействия вируса, главными мишенями которого выступали сердечно-сосудистая, иммунная и нервная системы, молекулярные механизмы и отсроченные эффекты за такой короткий промежуток времени не изучены в достаточной мере. Для предотвращения возможных вирусных вспышек подобного рода или сглаживания их негативного действия в будущем необходимо тщательное изучение возможных механизмов, реализуемых на уровне генома и постгенома и обеспечивающих гомеостаз и иммунную защиту от воздействия биологических агентов [4].

Современные научные изыскания посвящены изучению обменных процессов в организме и не затрагивают аддитивности компартментов факторной нагрузки, объединяющей действие химического и биологического факторов, комбинированное воздействие которых способно как потенцировать, так и нейтрализовать действие друг друга. Поэтому так важно понимание молекулярных клеточных механизмов с участием полиморфизма генов и особенностей их экспрессии в условиях комбинированного воздействия химических и биологических факторов.

Таким образом, идентификация генетических маркёров, ассоциированных с воздействием химических факторов (на примере бенз(а)пирена) и биологических агентов (вакцинный антиген SARS-Cov-2), для предотвращения риска развития у населения болезней сердечно-сосудистой, иммунной и нервной систем представляется актуальной темой в современных научных исследованиях.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 30 детей (21 девочка, 9 мальчиков) в возрасте 10–16 лет, подверженных хроническому ингаляционному воздействию химического гаптена бенз(а)пирена в сочетании с вирусной нагрузкой вакцинным антигеном новой коронавирусной инфекции. Дети, принадлежавшие к одной этнической группе и имевшие идентичный социальный статус, проходили обследование во ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН». На момент обследования ни один из пациентов не являлся носителем и не болел SARS-COV-2, и бенз(а)пирен в крови каждого был определён на уровне 0.

Для эксперимента *in vitro* была использована периферическая цельная кровь пациентов, нагруженная бенз(а)пиреном, компонентами вакцины (I компонент – аденовирусный вектор 26-го серотипа, II компонент – аденовирусный вектор 5-го серотипа), несущими белок S-вируса SARS-Cov-2, и их комбинацией в течение 24 ч. Действующая концентрация бенз(а)пирена составляла 7 мкг/л, концентрация компонентов вакцины –  $1 \pm 0,5 \cdot 10^{11}$  частиц. Нагрузка выполнялась в дублях для каждого образца в следующем соотношении действующих факторов и периферической крови: бенз(а)пирен и кровь 1 : 1; первый компонент вакцины SARS-Cov-2 и кровь 1 : 1; второй компонент вакцины SARS-Cov-2 и кровь 1 : 1; комбинация первого и второго компонентов вакцины SARS-Cov-2 и крови в соотношении 1/2 : 1/2 : 1; комбинация бенз(а)пирена и компонентов вакцины с кровью выполнена в соотношении 1/3 : 1/3/1/3 : 1. Спонтанный уровень экспрессии оценивался при разведении цельной крови физиологическим раствором в соотношении 1 : 1. Всего выполнено по 360 измерений для каждого белка (*TLR4* и *MMP9*).

Выполнены генетические исследования материала от пациентов по оценке полиморфности, экспрессии кандидатных генов врождённого иммунитета *TLR4* (Hs00152939\_m1), индуцированной комбинацией бенз(а)пирена и компонентов вакцины SARS-Cov-2, и ремоделирования внеклеточного матрикса *MMP9* (Hs00234579\_m1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе BioRAD CFX96 (Сингапур). Полиморфизмы *TLR4* A8595G (rs1927911) и *MMP9* Gln279Arg (rs17576) оценивались при использовании комплектов реагентов компании «Синтол» (Москва), праймеры для оценки экспрессии *TLR4* Hs00152939\_m1 (9q33.1) и *MMP9* Hs00234579\_m1 (20q13.12) были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва).

Выделение ДНК для оценки SNP выполнено при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб В» компании AmpliSens ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва), выделение РНК для оценки экспрессии генов выполнено с помощью «РНК-экстрэн» компании «Синтол» (Москва) – комплекта реагентов для выделения тотальной РНК из цельной крови, клеточных культур и образцов тканей.

Качественные и количественные данные, полученные в ходе эксперимента, сформированы в базе Excel и подвергнуты статистической обработке с оценкой: N – число, X – среднее, SE – стандартная ошибка среднего, *t*-критерий Стьюдента, *p* – уровень значимости различий. Числовые данные представлены в таблицах в формате:  $X \pm SE (N)$ .

## Результаты

Результаты оценки уровня спонтанной экспрессии белка *TLR4* Hs00152939\_m1, распределённого по генотипам гена *TLR4* A8595G, показали, что экспозиция бенз(а)пиреном *in vitro* сопровождалась достоверным снижением экспрессии для дикого генотипа AA относительно его спонтанного уровня ( $p < 0,05$ ), а также увеличением экспрессии при гетерозиготном генотипе относительно его спонтанного уровня ( $p = 0,0675$ ). Различия в уровне экспрессии между генотипами AA/AG и AA/GG были достоверны при  $p < 0,05$  (см. таблицу).

Первый компонент вакцины против SARS-CoV-2 (26-й серотип) продемонстрировал тенденцию к активации экспрессии для гетерозиготного генотипа AG гена *TLR4* A8595G относительно его спонтанного уровня в 2,6 раза ( $p = 0,0776$ ).

Второй компонент вакцины против SARS-CoV-2 (5-й серотип) не оказал существенного влияния на уровень экспрессии белка *TLR4* Hs00152939\_m1 относительно спонтанного уровня. Достоверных различий в уровне экспрессии, распределённых по генотипам, не выявлено.

Комбинированный эффект вакцинных и химического антигенов (26-й серотип, 5-й серотип, бенз(а)пирен) продемонстрировал повышение уровня экспрессии для гетерозиготного генотипа AG относительно его спонтанного ( $p = 0,0662$ ) уровня в 5,8 раза.

**Уровень спонтанной и индуцированной антигенами экспрессии генов *TLR4* A8595G (rs1927911) / *TLR4* Hs00152939\_m1, *MMP9* Gln279Arg (rs17576) / *MMP9* Hs00234579\_m1 в образцах цельной крови**

The level of spontaneous and antigen-induced *TLR4* A8595G (rs1927911) / *TLR4* Hs00152939\_m1, *MMP9* Gln279Arg (rs17576) / *MMP9* Hs00234579\_m1 gene expression in whole blood samples

Ген, генотип Gene, Genotype	Уровень экспрессии, $X \pm SD$ Expression level, $X \pm SD$			
	Спонтанный уровень, у.е. (N) Spontaneous level, c.u. (N)	Индуцированный бенз(а)пиреном, у.е. (N) Induced by benz(a)pyrene, c.u. (N)	Индуцированный 26-м серотипом, у.е. (N) Induced by serotype 26, c.u. (N)	
<b><i>TLR4</i> A8595G (rs1927911) / <i>TLR4</i> Hs00152939_m1</b>	AA	0.37 ± 0.17 (12)	0.07 ± 0.02 (12)*	0.55 ± 0.24 (12)
	AG	0.19 ± 0.10 (14)	1.39 ± 0.75 (14)**	0.49 ± 0.18 (14)**
	GG	0.70 ± 0.46 (5)	2.19 ± 1.83 (5)	0.91 ± 0.52 (4)
<b><i>TLR4</i> A8595G (rs1927911) / <i>TLR4</i> Hs00152939_m1</b>	Индуцированный 5-м серотипом, у.е. (N) Induced by serotype 5, c.u. (N)	Индуцированный комбинацией 26-го и 5-го серотипов, у.е. (N) Induced by a combination of 26 and 5, c.u. (N)	Индуцированный комбинацией 26-го, 5-го серотипов и бенз(а)пиреном, у.е. (N) Induced by a combination of 26, 5 and benz(a)pyrene, c.u. (N)	
	AA	0.53 ± 0.27 (12)	0.61 ± 0.46 (12)	0.45 ± 0.21 (12)
	AG	0.62 ± 0.31 (14)	0.32 ± 0.16 (14)	1.08 ± 0.53 (14)**
GG	0.05 ± 0.05 (5)	0.01 ± 0.00 (4)	0.32 ± 0.20 (4)	
<b><i>MMP9</i> Gln279Arg (rs17576) / <i>MMP9</i> Hs00234579_m1</b>	Спонтанный уровень, у.е. (N) Spontaneous level, c.u. (N)	Индуцированный бенз(а)пиреном, у.е. (N) Induced by benz(a)pyrene, c.u. (N)	Индуцированный 26-м серотипом, у.е. (N) Induced by serotype 26, c.u. (N)	
	AA	0.45 ± 0.12 (12)	0.72 ± 0.21 (12)**	0.71 ± 0.17 (12)*
	AG	1.20 ± 0.64 (12)	2.36 ± 1.50 (12)	0.86 ± 0.32 (12)
GG	0.64 ± 0.23 (6)	1.51 ± 0.76 (6)	0.61 ± 0.39 (6)	
<b><i>MMP9</i> Gln279Arg (rs17576) / <i>MMP9</i> Hs00234579_m1</b>	Индуцированный 5-м серотипом, у.е. (N) Induced by serotype 5, c.u. (N)	Индуцированный комбинацией 26-го и 5-го серотипов, у.е. (N) Induced by a combination of 26 and 5, c.u. (N)	Индуцированный комбинацией 26-го, 5-го серотипов и бенз(а)пиреном, у.е. (N) Induced by a combination of 26, 5 and benz(a)pyrene, c.u. (N)	
	AA	0.46 ± 0.1492 (12)	0.25 ± 0.08 (12)**	0.31 ± 0.09 (12)
	AG	1.50 ± 1.17 (12)	0.59 ± 0.18 (12)	0.61 ± 0.19 (12)
GG	1.20 ± 0.37 (6)**	0.52 ± 0.23 (6)	0.32 ± 0.10 (6)	

Примечание. AA – дикий генотип гена; AG – гетерозиготный генотип гена; GG – вариантный генотип гена; у.е. – условные единицы; N – количество; X – среднее выборки; SD – стандартное отклонение; \* – значимые различия между спонтанным и индуцированным уровнем при  $p < 0,05$ ; \*\* – различия между спонтанным и индуцированным уровнем при  $p < 0,1$ .

Note: AA – wild genotype of the gene; AG – heterozygous genotype of the gene; GG – variant genotype of the gene; c.u. – conventional units; N – quantity; X – sample mean; SD – standard deviation; \* – significant differences between spontaneous and induced levels at  $p < 0.05$ ; \*\* – significant differences between spontaneous and induced levels at  $p < 0.1$ .

Таким образом, экспозиция *in vitro* бенз(а)пиреном отличалась угнетающим экспрессию белка *TLR4* действием в AA гомозиготном варианте гена *TLR4* A8595G, в то же время вакцинный антиген (26-й серотип) и бенз(а)пирен активировали экспрессию белка в AG гетерозиготном генотипе, что указывает на особенности действия химического и биологического факторов с ожиданием эффекта иммуносупрессии в условиях экспозиции ПАУ (бенз(а)пирен), а также эффекта астенизации в условиях экспозиции SARS-CoV-2, причём более выраженного при сочетании SARS-CoV-2 + бенз(а)пирен.

Анализ уровня индуцированной бенз(а)пиреном экспрессии белка *MMP9* (Hs00234579\_m1) матричной металлопротеиназы геном *MMP9* в AA-гомозиготном диком варианте был выше его спонтанного уровня в 1,6 раза ( $p = 0,0884$ ).

Индукция первым компонентом вакцины против SARS-CoV-2 (2-й серотип) сопровождалась значимой активацией экспрессии гена *MMP9* в условиях AA-генотипа гена в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), а также недостоверным снижением в гетерозиготном и вариантном генотипах относительно их спонтанных уровней. Разницы в уровнях экспрессии между генотипами не выявлено.

В то же время второй компонент вакцины против SARS-CoV-2 (5-й серотип) вызывал рост уровня экспрессии белка в условиях GG-вариантного генотипа в 1,7 раза относительно его спонтанного уровня ( $p = 0,0668$ ). Выявлена достоверная разница в уровнях экспрессии между генотипами AA и GG.

Комбинация первого и второго компонентов вакцины против SARS-CoV-2 (26-й и 5-й серотипы) характеризовалась снижением уровня экспрессии белка *MMP9* (Hs00234579\_m1) геном *MMP9* для AA-генотипа относительно спонтанного ( $p = 0,0856$ ). Для гетерозиготного AG-генотипа также было отмечено снижение экспрессии относительно его спонтанного уровня в 2 раза.

В результате комбинированной экспозиции *in vitro* биологического и химического факторов (26-й серотип, 5-й серотип, бенз(а)пирен) различия в уровнях экспрессии белка *MMP9* не были установлены.

Таким образом, на основании полученных результатов нами выдвинута следующая гипотеза. Бенз(а)пирен, как и первый компонент вакцины SARS-CoV-2 (26-й серотип), обладает протективным эффектом, обеспечивающим высокий уровень экспрессии белка *MMP9* (Hs00234579\_m1) и

поддержку воспалительного процесса по пути альтерации, тогда как 5-й серотип вакцинного антигена SARS-CoV-2, вызывая экспрессию MMP9 (Hs00234579\_m1) в случае мутантного генотипа GG, будет обеспечивать лёгкое течение воспалительного процесса, но будет отличаться его хронизацией с проявлениями нарушений фиброзного и атерогенного характера.

Таким образом, результаты проведённых экспериментальных исследований *in vitro* по оценке индуцированной экспрессии бенз(а)пиреном и вакцинными антигенами SARS-CoV-2 у детей и подростков показали достоверные изменения в уровне экспрессии белков TLR4 (Hs00152939\_m1) и MMP9 (Hs00234579\_m1), ассоциированные с генотипами однонуклеотидных замен в генах *TLR4* A8595G и *MMP9* Gln279Arg.

Установлено, что бенз(а)пирен и первый компонент вакцинного антигена SARS-CoV-2 индуцировали увеличение экспрессии TLR4 Hs00152939\_m1 для AG-гетерозиготного генотипа гена *TLR4* A8595G, в то же время бенз(а)пирен оказывал супрессивный эффект на экспрессию толл-подобного рецептора в случае AA-гомозиготы гена *TLR4* A8595G. Аналогичная картина наблюдалась для AA-дикого и AG-гетерозиготного генотипов гена *MMP9* Gln279Arg группы наблюдения, где бенз(а)пирен и первый компонент вакцины SARS-CoV-2 оказывали индуцирующее экспрессию воздействие, тогда как второй компонент вызывал рост уровня экспрессии белка в условиях GG-мутантного генотипа.

## Обсуждение

Сигнальный путь матриксной металлопротеиназы *MMP9* и толл-подобных рецепторов *TLR4* вовлечены в дисфункцию гематоэнцефалического барьера [5].

Матриксные металлопротеиназы участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса и переработке биологически активных молекул. Повышенная экспрессия MMP способствует ангиогенезу, инвазии и метастазированию, коррелирует с иммунными маркерами [6].

Сложный механизм регуляции экспрессии, синтеза и активации MMP9, высокая гомология с другими представителями семейства MMP затрудняют оценку безопасности воздействия ингибиторов экспрессии MMP9 [7].

Kondakova E.V. и соавт. [8] установили, что носительство гетерозиготного варианта полиморфизма *MMP9* связано с благоприятным прогнозом функционирования сердечно-сосудистой системы. Обнаружено положительное значение ускорения биологического возраста среди подгрупп с генотипами AA и GG гена *MMP9* и отрицательное значение ускорения биологического возраста среди гетерозиготных носителей аллеля этого полиморфизма [8].

Индукцированная бенз(а)пиреном сверхэкспрессия *MMP9* была ослаблена ингибитором ERK U0126 и ингибитором AhR ресвератролом. Исследование Wei Y. и соавт. позволяет предположить, что бенз(а)пирен способствует пролиферации и метастазированию клеток посредством усиления регуляции экспрессии MMP9, что, вероятно, было опосредовано через сигнальный путь AhR [9]. В своей работе Wang Y и соавт. сообщают, что воздействие бенз(а)пирена способствовало миграции и инвазии клеток HepG2, которые могли быть заблокированы ингибиторами p38 MAPK. Кроме того, воздействие бенз(а)пирена индуцировало повышенную регуляцию экспрессии мРНК *MMP9*, которая модулировалась p-38 [10].

В исследовании Jiang H. и соавт. сверхэкспрессия MMP9 коррелировала с метастазированием в лимфатические узлы (OR = 2,9; 95%-й ДИ 1,86–4,53;  $P < 0,001$ ). Кроме того, гиперэкспрессия *MMP9* была связана с более высокой клинической стадией и гистологической оценкой у пациентов с раком [11].

Buttacavoli M. и соавт. сообщают, *MMP* могут обладать высокой активностью и служить новыми биомаркерами в иммунном ответе [12]. Некоторые однонуклеотидные полиморфизмы в генах TLR были связаны с изменённой восприимчивостью к инфекционным, воспалительным и аллергическим патологиям.

Толл-подобные рецепторы играют значительную роль при сердечно-сосудистых болезнях, так как обладают самой высокой экспрессией среди TLR в сердце. Установлено, что ингибирование сигнальных путей TLR4 уменьшает воспалительные реакции и даже предотвращает дополнительные повреждения уже повреждённого миокарда [13].

В исследовании Pandey N. и соавт. показано, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах *TLR* могут служить важным маркером ранней предрасположенности к различным онкопролиферативным состояниям. Генотипы CC и CT TLR4 rs1927911 были связаны с повышенным риском развития онкопролиферативных состояний, ассоциированных с hrHPV-инфекцией [14]. Исследование Pan S. и соавт. подтвердило, что подавление TLR4 снижает экспрессию MMP9 [15]. Исследование Pastille E. и соавт. установлено, что бактериальная активация *TLR4* на клетках врождённого иммунитета толстой кишки вызывает воспаление и способствует росту опухоли [16]. Allami R.H. и соавт. показали достоверную зависимость полиморфизма rs1927911 гена *TLR4* с развитием ИМП. Кроме того, полученные данные выявили весьма значимую разницу в сыровоточном уровне белка TLR4 у пациентов с носительством генотипа CT [17]. В исследовании [18] Su W. и соавт. отмечают подавление экспрессии *TLR4* под воздействием бенз(а)пирена.

В исследовании комбинированного воздействия дибутилфталата (ДБФ) и бенз(а)пирена на печень крыс Chen J. и соавт. установили активацию пути MyD88/NF- $\kappa$ B посредством повышения уровня ацетилирования *TLR4*, приводящего к дисбалансу провоспалительных факторов (CXCL-13, IL-6 и TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных факторов (IL-10), дальнейшему повреждению ткани печени и функциональным изменениям [19].

Как утверждают Aboudounya M.M. и соавт., клинический спектр COVID-19 чрезвычайно разнообразен. Вполне вероятно, что гетерогенность генетического состава носителя может способствовать тяжести болезни. Толл-подобный рецептор *TLR4* играет жизненно важную роль во врождённом иммунном ответе на инфекцию SARS-CoV-2 и восприимчивости людей к тяжёлой форме.

Ген экспрессируется как на иммунных, так и на тканевых резидентных клетках. ACE2, о котором сообщалось как о входном рецепторе для SARS-CoV-2, присутствует только на ~1–2% клеток в лёгких или имеет низкую экспрессию в лёгких. Недавно было высказано предположение о том, что белок spike обладает наиболее сильным белок-белковым взаимодействием с TLR4. Авторы рассматривают доказательство того, что SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 обладают феноменом прямого и непрямого связывания с TLR4 вместе с другими вирусными прецедентами, которые в совокупности проливают свет на патофизиологическую загадку COVID-19. Авторы представляют модель, в которой спайковый гликопротеин SARS-CoV-2 связывает TLR4 и активирует передачу сигналов *TLR4* для увеличения экспрессии *ACE2* на клеточной поверхности, способствующей проникновению вируса. SARS-CoV-2 также разрушает альвеолярные клетки II типа, которые секретируют лёгочные сурфактанты, обычно снижающие поверхностное натяжение воздуха (тканей) и блокируют TLR4 в лёгких, тем самым способствуя воспалению. Миокардит, индуцированный SARS-CoV-2, и поражение многих органов могут быть вызваны активацией TLR4, aberrантной передачей сигналов TLR4 у пациентов с COVID-19. Следовательно, TLR4 вносит значительный вклад в патогенез SARS-CoV-2, и его сверхактивация вызывает длительный или чрезмерный иммунный ответ [20].

## Заключение

По результатам проведённых исследований в рамках эксперимента *in vitro* изучены особенности формирования регуляторных нарушений, индуцированных экспозицией бенз(а)пиреном и вакцинными антигенами SARS-CoV-2 (26-й и 5-й серотипы).

Для 30 детей проведена оценка полиморфизма генов *MMP9* Gln279Arg и *TLR4* A8595G относительно нормализованного уровня экспрессии протеинов *MMP9* hs00234579\_m1 и *TLR4* hs00152939\_m1 в цельной крови, индуцированной инкубацией *in vitro* бенз(а)пиреном, 26-м серотипом вакцинного антигена SARS-CoV-2, 5-м серотипом вакцинного антигена SARS-CoV-2, а также их комбинациями.

Результаты экспериментального исследования позволили верифицировать механизмы транскриптомных эффектов бенз(а)пирена, которые проявляются в его способности модифицировать экспрессию патогномичных для контроллинга клеточной гибели протеинов и заключаются в активации экспрессии гена – деструктора белков внеклеточного матрикса *MMP9* в типичном гомозиготном и гетерозиготном состояниях, а также в способности снижать экспрессию гена клеточного иммунного ответа толл-подобного рецептора

*TLR4* в диком гомозиготном состоянии и активировать в гетерозиготном и вариантном состояниях. Это ослабляет иммунную защиту организма, вызывает избыточную агрессию компартментов иммунитета (аллергия, аутоиммунитет), отменяет контроль за пролиферативными процессами и увеличивает вероятность токсического воздействия метаболитов бенз(а)пирена с дальнейшим развитием онкопролиферативных состояний.

Показано, что экспозиция вакцинными компонентами SARS-CoV-2, а также их сочетание с экспозицией бенз(а)пиреном *in vitro* приводят к разнонаправленным эффектам в зависимости от генотипа (полиморфизма) исследуемых генов. Установлена способность оказывать аддитивное воздействие комбинации «бенз(а)пирен + вакцинные антигены SARS-CoV-2» на уровне транскриптома *in vitro* с модификацией экспрессии кандидатных генов *MMP9* rs17576, *TLR4* rs1927911, что позволяет рассматривать гены и их транскрипты *MMP9* Hs00234579\_m1 и *TLR4* Hs00152939\_m1 в качестве индикаторных при ранней диагностике астении и онкопролиферативных состояний, в основе механизма формирования которых лежат нарушения процессов клеточной гибели, пролиферативное воспаление и ангиогенез.

## Литература

(п.п. 5, 7–20 см. References)

1. Сидоров П.И., Новикова И.А. Способ скрининговой оценки факторов здоровья. *Гигиена и санитария*. 2010; 89(2): 85–9. <https://elibrary.ru/mrmhch>
2. Мажаева Т.В., Дубенко С.Э., Чернова Ю.С., Носова И.А. Молекулярно-генетические аспекты риска здоровью во взаимосвязи с неблагоприятными условиями окружающей среды и питанием (систематический обзор). *Анализ риска здоровью*. 2022; (4): 186–97. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.18> <https://elibrary.ru/celovn>
3. Маснавиева Л.Б., Кудяева И.В. Влияние ингаляционной нагрузки формальдегидом на уровень цитокинов у подростков промышленных центров. *Анализ риска здоровью*. 2020; (2): 110–6. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.12> <https://elibrary.ru/ubokuc>
4. Никонова А.А., Файзулов Е.Б., Грачева А.В., Исаков И.Ю., Зверев В.В. Генетическое разнообразие и эволюция биологических свойств коронавируса SARS-CoV-2 в условиях глобального распространения. *Acta Naturae*. 2021; (3): 77–89. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11337>
5. Шишкина В.В., Антакова Л.Н., Золотарева С.Н., Атыкшин Д.А. Матриксные металлопротеиназы в ремоделировании внеклеточного матрикса; молекулярные, клеточные и тканевые аспекты. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2022; 11(3): 93–108. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-93-108>
6. Sidorov P.I., Novikova I.A. A screening procedure for health factors. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2010; 89(2): 85–9. <https://elibrary.ru/mrmhch>
7. Mazhaeva T.V., Dubenko S.E., Chernova Yu.S., Nosova I.A. Molecular and genetic aspects of health risks and their association with adverse environmental conditions and diets (systemic review). *Analiz riska zdorov'yu*. 2022; (4): 186–97. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.18> <https://elibrary.ru/injlhd>
8. Masnavieva L.B., Kudyaeva I.V. Influence exerted by inhalation burden with formaldehyde on cytokines level in teenagers living in industrial centers. *Analiz riska zdorov'yu*. 2020; (2): 110–6. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.12> <https://elibrary.ru/uonlcf>
9. Nikonova A.A., Faizulov E.B., Gracheva A.V., Isakov I.Yu., Zverev V.V. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-Cov-2. *Acta Naturae*. 2021; (3): 77–89. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11337> (in Russian)
10. Jing N., Fang B., Li Z., Tian A. Exogenous activation of cannabinoid-2 receptor modulates TLR4/MMP9 expression in a spinal cord ischemia reperfusion rat model. *J. Neuroinflammation*. 2020; 17(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01784-7>
11. Shishkina V.V., Antakova L.N., Zolotareva S.N., Atyakshin D.A. Matrix metalloproteinases in extracellular matrix remodeling: molecular, cellular and tissue aspects. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2022; 11(3): 93–108. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-93-108> (in Russian)
12. Augoff K., Hryniewicz-Jankowska A., Tabola R., Stach K. MMP9: A tough target for targeted therapy for cancer. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(7): 1847. <https://doi.org/10.3390/cancers14071847>
13. Kondakova E.V., Ilina V.M., Ermakova L.M., Krivososov M.I., Kuchin K.V., Vedunova M.V. New genetically determined markers of the functional state of the cardiovascular system. *Genes (Basel)*. 2023; 14(1): 185. <https://doi.org/10.3390/genes14010185>
14. Wei Y., Zhao L., He W., Yang J., Geng C., Chen Y., et al. Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. *Int. J. Oncol*. 2016; 49(5): 2055–63. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3674>
15. Wang Y., Shi L., Li J., Li L., Wang H., Yang H. Involvement of p38 MAPK pathway in benzo(a)pyrene-induced human hepatoma cell migration and invasion. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2019; 26(35): 35838–45. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06733-3>
16. Jiang H., Li H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021; 21(1): 149. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07860-2>
17. Buttacavoli M., Di Cara G., Roz E., Pucci-Minifra I., Feo S., Cancemi P. Integrated multi-omics investigations of metalloproteinases in colon cancer: focus on MMP2 and MMP9. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(22): 12389. <https://doi.org/10.3390/ijms222212389>
18. Vaez H., Soraya H., Garjani A., Gholikhani T. Toll-like receptor 4 (TLR4) and AMPK Relevance in Cardiovascular Disease. *Adv. Pharm. Bull.* 2023; 13(1): 36–47. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.004>
19. Pandey N.O., Chauhan A.V., Raithatha N.S., Patel P.K., Khandelwal R., Desai A.N., et al. Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 9729. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46077-z>
20. Pan S., Guan Y., Ma Y., Cui Q., Tang Z., Li J., et al. Advanced glycation end products correlate with breast cancer metastasis by activating RAGE/TLR4 signaling. *BMJ Open Diabetes Res. Care*. 2022; 10(2): e002697. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2021-002697>
21. Pastille E., Faßnacht T., Adamczyk A., Ngo Thi Phuong N., Buer J., Westendorf A.M. Inhibition of TLR4 signaling impedes tumor growth in colitis-associated colon cancer. *Front. Immunol.* 2021; 12: 669747. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669747>
22. Huang W.L., Xu Y., Wan S.P. Association of Toll-like 4 receptor gene polymorphism (rs4986790, rs4986791) with the risk of urinary tract infection: A systematic review and meta-analysis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2020; 36(3): 206–11. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12158>
23. Su W., Zha S., Wang Y., Shi W., Xiao G., Chai X., et al. Benzo[a]pyrene exposure under future ocean acidification scenarios weakens the immune responses of blood clam, *Tegillarca granosa*. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 63: 465–70. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.046>
24. Chen J., He X., Song Y., Tu Y., Chen W., Yang G. Sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* alleviates liver injury induced by DBP and BaP co-exposure in rat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022; 241: 113750. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113750>
25. Aboudounya M.M., Heads R.J. COVID-19 and toll-like receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 may bind and activate TLR4 to increase ACE2 expression, facilitating entry and causing hyperinflammation. *Mediators Inflamm.* 2021; 2021: 8874339. <https://doi.org/10.1155/2021/8874339>

## Информация об авторах

**Зайцева Нина Владимировна**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор, науч. руководитель ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», 614045, Пермь, Россия. E-mail: [znv@fcrisk.ru](mailto:znv@fcrisk.ru)

**Долгих Олег Владимирович**, доктор мед. наук, зав. отд. иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», 614045, Пермь, Россия. E-mail: [oleg@fcrisk.ru](mailto:oleg@fcrisk.ru)

**Летюшев Александр Николаевич**, канд. мед. наук, доцент каф. организации санитарно-эпидемиологической службы ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», 125993, Москва, Россия. E-mail: [rmapo@rmapo.ru](mailto:rmapo@rmapo.ru)

**Казакова Ольга Алексеевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. — зав. лаб. иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», 614045, Пермь, Россия. E-mail: [chakina2011@yandex.ru](mailto:chakina2011@yandex.ru)

**Ганич Татьяна Сергеевна**, мл. науч. сотр. лаб. иммуногенетики отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», 614045, Пермь, Россия. E-mail: [tatka.kuleshova@yandex.ru](mailto:tatka.kuleshova@yandex.ru)

## Information about the authors

**Nina V. Zaitseva**, MD, PhD, DSci., Professor, Academician of the RAS, Scientific Director of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation; Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-2356-1145> E-mail: [znv@fcrisk.ru](mailto:znv@fcrisk.ru)

**Oleg V. Dolgikh**, MD, PhD, DSci., Head of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-4860-3145> E-mail: [oleg@fcrisk.ru](mailto:oleg@fcrisk.ru)

**Aleksandr N. Letyushev**, MD, PhD, associate professor of the Department of Organization of Sanitary and Epidemiological Service of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-4185-9829> E-mail: [rmapo@rmapo.ru](mailto:rmapo@rmapo.ru)

**Olga A. Kazakova**, MD, PhD, senior researcher of the Immunogenetics laboratory of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-0114-3930> E-mail: [chakina2011@yandex.ru](mailto:chakina2011@yandex.ru)

**Tatiana S. Ganich**, Junior researcher at the Laboratory of Immunogenetics of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: [tatka.kuleshova@yandex.ru](mailto:tatka.kuleshova@yandex.ru)