

УДК 577.21:577.2.043:539.1

*Т.С. БАЛМУХАНОВ¹, Т.Н. МИРОШНИК¹, М.А. МЕНДЕШ¹, П.К. КАЗЫМБЕТ²,
Р.Х. МУСТАФИНА², К.О. МАХАМБЕТОВ², АБДРАСИЛОВА Д.Д², Н.А. АЙТХОЖИНА¹*

ПОЛИМОРФИЗМ З ИНТРОНА И 6 ИНТРОНА ГЕНА P53 СРЕДИ РАБОТНИКОВ УРАНОВЫХ ШАХТ КАЗАХСТАНА

Проведен анализ полиморфизмов 3 интрана и 6 интрана гена онкосупрессора *p53* в ДНК работников уранового месторождения «Балкашинское» методом ПЦР-ПДРФ. Частота встречаемости мутантных аллелей и генотипов в 3 интране, согласно критерию χ^2 , достоверно ($p < 0.05$) превышает аналогичные показатели в контрольной группе.

Введение. Республика Казахстан обладает богатейшими запасами урана. Добыча этого стратегического сырья постоянно нарастает и, соответственно, увеличивается количество лиц, вовлеченных в данный процесс. Работники уранодобывающих шахт регулярно подвергаются воздействию так называемых «малых доз» облучения. В настоящее время появились данные исследований, указывающие на опасность воздействия на организм человека доз, ранее считавшихся безопасными [1, 2]. Эти результаты являются в настоящее время дискуссионными и, в связи с этим, определение степени риска воздействия на здоровье доз радиации, принятых допустимыми для персонала уранодобывающих предприятий, является для Казахстана актуальной проблемой.

Известно, что радиоактивное излучение вызывает разнообразные повреждения биологических объектов, а ДНК является одной из основных его мишенией. В процессе эволюции биологическими объектами разработаны разнообразные механизмы защиты от облучения, в реализации которых среди прочих активно участвует продукт гена *p53* – транскрипционный фактор, белок онкосупрессор *P53*.

Данный белок, расположенный на коротком плече 17-й хромосомы (17p13.1), в 1993 году избран авторитетным научным журналом “Science” «молекулой года». Белок *p53* является мультифункциональным, играя ключевую роль в поддержании генетической стабильности, он принимает участие в столь разнообразных процессах, как регуляция (временная приостановка) клеточного деления, программируемая клеточная гибель (апоптоз) и репарация ДНК [3].

Генетические нарушения, приводящие к возникновению мутаций, в том числе вызванные

радиацией, опасны способностью провоцировать неопластическую трансформацию. Мажорный или дикий (wild - w) генотип *p53* доминантен в популяции и определяет нормальное функционирование защитных механизмов, в то время как минорный или мутантный (mutant – m) генотип может, при определенных условиях, приводить к качественным или количественным изменениям синтеза белка *P53* и последующими нарушениями в работе защитных механизмов. Для гена *p53* установлено 19 полиморфизмов, три из которых принимают участие в канцерогенезе: в 3 интроне, 4 экзоне и 6 интране. Полиморфизм 3 интрана обусловлен дупликацией 16 пар нуклеотидов (пн) и представлен тремя генотипами (w/w, w/dup16, dup16/dup16). Имеются данные о том, что полиморфизм 3 интрана ассоциирован с раком легкого [4]. Полиморфизм 6 интрана детально изучен при раке молочной железы, ассоциирован с синдромом Ли–Фраумени, представлен включением аденина в сайт, узнаваемый эндонуклеазой рестрикции *MspI* (C:CAGG), за счет чего данный сайт не распознается или теряется (C:CGG) и установлено, что данный полиморфизм может изменять экспрессию белка *p53* [5].

Материалы и методы. В исследование включены 114 образцов ДНК, выделенных из цельной венозной крови у работников уранового рудника месторождения «Балкашинское», поселок Шантобе, Акмолинская область и у 188 практически здоровых лиц, проживающих в г. Алматы и г. Талдыкоргане.

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов фирмы “Axygen” (США) в соответствии с прилагаемым протоколом.

Анализ вариабельных участков гена проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) методом определения полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Рестрикцию проводили с использованием рестриктазы *Msp* I, электрофорез - в 8% полиакриламидном геле (ПААГ).

Олигонуклеотидные последовательности праймеров подбирали с использованием программы Primer-Express, согласно данным, полученным из геномных баз данных ENSEMBLE NCBI [6].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы "SPSS".

Распределения генотипов и аллелей по исследованным полиморфным локусам в экспериментальных и контрольных выборках проверены на соответствие ожидаемым при равновесии Харди–Вайнберга. При сравнении частот генотипов и аллелей использовался стандартный критерий соответствия Пирсона χ^2 . Для отклонения нулевой гипотезы (отсутствие различий) принимали уровни статистической значимости $p < 0,05$.

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности.

Результаты и обсуждение. В предлагаемой работе проведено сравнение частоты встречаемости полиморфизмов аллелей и генотипов инtronов 3 и 6 гена *p53* среди работников уранового рудника и лиц контрольной группы.

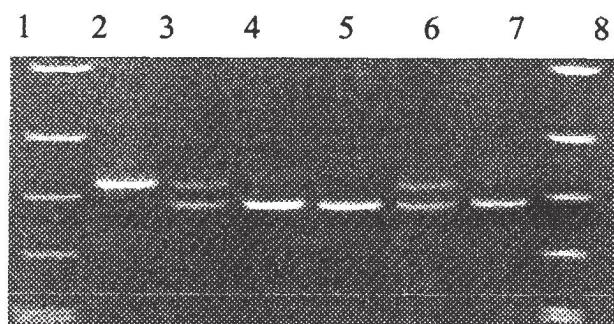
В результате дупликации в 3 интроне участка размером 16 пар нуклеотидов (пн) образуются два фрагмента размерами 180 пн и 196 пн. При электрофоретическом анализе гомозиготный дикий тип (w/w) представлен одной полосой размером 180 пн, гибридный гетерозиготный (w/dup16) – двумя полосами 180 пн и 196 пн, гомозиготный мутантный (dup16/dup16) – одной полосой 196 пн.

На рисунке 1 приведена типичная электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции, демонстрирующая результаты эксперимента по детекции полиморфизмов (дупликация 16 пн) в 3 интроне гена *p53*.

На рисунке 2 приведена электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции 6 интрана гена *p53* - наличие/отсутствие сайта рестрикции рестриктазы *Msp* I.

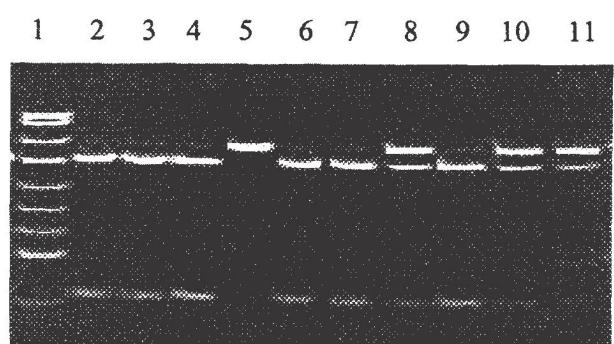
В 6 интроне появление мутации тестируется по наличии или отсутствии специфического сайта рестрикции для рестриктазы *Msp* I.

Мажорный (дикий) генотип ww является наиболее часто встречающимся в опытной и контрольной группах и определяет неизменную функциональную активность. Вторым по частоте



Дорожки: 1, 8 – маркеры молекулярной массы; 2 – гомозиготный мутантный, 3, 6 – гетерозиготные по вставке; 4, 5, 7 – гомозиготные дикие типы.

Рис. 1. Электрофорез в 8% ПААГ геле амплифицированных фрагментов рестрикции 3 интрана



Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы; 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11 – гомозиготные дикие; 5 – гомозиготный мутантный;

Рис. 2. Электрофорез в 8% ПААГ геле амплифицированных фрагментов рестрикции 6 интрана

встречаемости является гетерозиготные мутантные w/dup16, w/Msp и наиболее редкими – гомозиготные мутантные dup16/dup16 и Msp⁺/Msp⁻. Мутантные генотипы потенциально способны обуславливать определенные изменения в структуре и функциях кодируемого белка и приводить к нарушениям нормального функционирования защитных механизмов, приводящим к повышению риска развития патологий.

В таблице 1 приведена частота встречаемости изучаемых генотипов в группе, состоящей из работников уранового рудника и практически здоровых лиц (контроль).

При исследовании полиморфности 3 интрана обнаружено статистически достоверное превышение ($p < 0,05$) частоты встречаемости мутаций в группе шахтеров по сравнению с контрольной группой, что говорит о наличии определенного воздействия условий труда работников уранодобывающей промышленности на генетический аппарат.

Таблица 1. Распределение генотипов и аллелей гена p53 (3 инtron и 6 инtron) среди работников урановых рудников и здоровых лиц

3 инtron			
	Частота генотипов	Контроль	Шахтеры
w/w	153	78	
w/dup16	33	34	
dup16/dup16	2	2	
χ^2 генотип	6,3758		
p генотип	0.0116		
χ^2 аллель	6.9814		
p аллель	0.0137		
6 инtron			
w/w	154	84	
w/Msp ⁻	32	28	
Msp ⁻ /Msp ⁻	2	2	
χ^2 генотип	2.6408		
p генотип	0.0141		
χ^2 аллель	2.8267		
p аллель	0.0927		

Примечание: w/w – гомозиготный дикий, w/dup16 – гетерозиготный, dup16/dup16 – гомозиготный по дупликации генотипы; w/w – гомозиготный дикий, w/Msp⁻ – гетерозиготный, Msp⁻/Msp⁻ – гомозиготный по отсутствию сайта рестрикции генотипы.

При проведении статистического анализа полиморфизма гена p53 по 6 интрону отличия с достоверностью $p < 0.05$ обнаружена только для генотипа, но не для аллелей, поэтому однозначно наличие генетических различий мы отмечаем только для 3 интрана.

Обнаружение повышенной частоты мутаций в 3 интроне генома шахтеров уранового рудника является основанием для расширения масштабов исследований, включающих в себя изучение полиморфизмов других функционально значимых участков гена p53, а также анализ других генов, вовлеченных в процесс развития патологий и, в первую очередь, канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J. et al. Induction of minisatellite mutations in the mouse germ-line by low-dose chronic exposure to gamma-radiation and fission neutrons // Mut. Res. 2000. T.53: 17-24.
- Бурлакова Е.Б., Голоцапов А.Н., Жижина Г.П. и др. Новые аспекты закономерностей действия низкодозированного облучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 1: 38-44.

3. 25 Years of p53 Research. 2007. "Springer". Hainaut P., Wiman K.G. eds., 446 p.

4. Гервас П.А., Чердынцева Н.В., Беляевская В.А. и др. Сибирский онкологический журнал. 2007. № 2: с. 49-54.

4. Barel D., Avigad S., Cohen I.J. et al. A novel germline p53 insertion/duplication mutation in intron 6 in a Li-Fraumeni Family // Cancer Research. 1994. Vol. 54: 1298-1234. 6. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Summary

The analysis of polymorphisms of 3 intron and 6 intron of p53 gene in DNA of the workers of uranium mine "Balkashinskoe" by means of PCR-RFLP method was performed. The frequency of mutant alleles and genotypes in 3 intron reliably ($p < 0.05$), accord the χ^2 criterion, exceeding the analogical indexes in a control group.

Резюме

Уран өндіретін «Балкашинское» кен орнындағы жұмысшылардың ДНК-ғы p53 генінің 3 интроны мен 6 интрондарының полиморфизміне ПЦР-ПДРФ әдісімен тексеру жүргізілді. Мутантты аллельдер мен 3 интрондағы генотиптердің кездесу жайлірі бақылау табына қарандан χ^2 белгісі бойынша ұқсас көрсеткіштен ($p < 0.05$) жоғары.

1 – Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина

2 – Медицинский университет Астана

Поступила 15.07.09