

УДК 612.014.24:575.116.4(571.16)

¹БОЛЕГЕНОВА Н.К., ¹ДЖАНСУГУРОВА Л.Б., ¹БЕКМАНОВ Б.О.,
²АУ У.У., ³БЕРСИМБАЕВ Р.И.

АССОЦИАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК И ГЕНОВ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ С ЧАСТОТОЙ МИНИСАТЕЛЛИТНЫХ МУТАЦИЙ В ПОПУЛЯЦИЯХ, ПРОЖИВАЮЩИХ ВБЛИЗИ СЕМИПАЛАТИНСКОГО ПОЛИГОНА

В настоящей работе изучена связь полиморфизма генов репарации ДНК (XRCC1, XRCC3) и генов, участвующих в процессе детоксикации ксенобиотиков (GSTT1, GSTM1) с частотой мутаций в минисателлитных локусах у жителей, проживающих вблизи бывшего Семипалатинского ядерного полигона и в соответствующей контрольной популяции с незагрязненной территорией.

Современные оценки радиационного риска основаны на молекулярно-эпидемиологических исследованиях с применением новых сверхчувствительных молекулярно-генетических технологий.

В настоящее время имеются достаточно обоснованные данные о том, что поломки регуляторных генетических механизмов, приводящие к возникновению ряда мультифакториальных заболеваний могут быть спровоцированы не только мутациями в генах-регуляторах, обеспечивающих клеточный гомеостаз, но и мутациями в генах репарации ДНК и генах «внешней среды», обеспечивающих детоксикацию ксенобиотиков [1]. Возрастание частоты многих заболеваний, развитие которых зависит как от генетических, так и от внешнесредовых факторов, ставит вопрос о выделении групп повышенного риска, имеющих наибольшую чувствительность к воздействию генотоксических агентов. Известно, что при воздействии ионизирующих излучений на живые организмы с высокой частотой индуцируются одно- и двунитевые разрывы ДНК, приводящие к образованию хромосомных aberrаций [2].

К генам, осуществляющими репарацию разрывов ДНК, вызванных ионизирующими излучениями, относятся гены XRCC1 и XRCC3 [3]. Ген XRCC1 играет ключевую роль в эксцизионной репарации однонитевых разрывов ДНК и ассоциирован с повышенной радиочувствительностью, и предрасположенностью к раковым заболеваниям [4]. Ген XRCC3 связан с гомологичной рекомбинационной репарацией, производит протеин, являющийся членом RecA/Rad51 семей-

ства. Показана ассоциация полиморфизма этого гена с частотой хромосомных aberrаций, у лиц, подвергнувшихся радиации [4].

Радиолиз молекул воды приводит к образованию свободных радикалов, высокореактивных частиц, результат действия которых может проявляться в накоплении генотоксических продуктов в организме, вызывающих химические модификации нуклеотидов ДНК и стимулирующих образование генных мутаций в пострадиационный период [5]. Значительный популяционный полиморфизм генов, участвующих в детоксикации ксенобиотиков, может также играть роль предрасполагающих к накоплению мутаций факторов. В эпидемиологических исследованиях наиболее изученным является полиморфизм генов суперсемейства глутатион S-трансфераз (GST), участвующих во второй фазе детоксикации ксенобиотиков [6, 7].

В качестве маркеров радиационной чувствительности в последнее время популярно использование частоты мутаций минисателлитных генов. Известны минисателлитные локусы, особенно чувствительные к действию радиации. Некоторые авторы считают, что минисателлитная нестабильность может быть связана с индивидуальной восприимчивостью к действию мутагенов и склонностью к развитию заболеваний с наследственной предрасположенностью [8].

Ранее нами было проведено комплексное исследование трех поколений семей, проживающих на территории Семипалатинского ядерного полигона (СЯП) и подвергнувшихся непосредственному облучению в результате первого наземно-

го испытания ядерного оружия в августе 1949 года [9-11]. Целью ранее проведенного исследования было: 1) сбор образцов крови и создание биологической базы данных трех поколений семей, проживающих в районе полигона и аналогичных контрольных семей; 2) ретроспективная FISH - биодозиметрия (флюоресцентная гибридизация *in situ*) популяции, подвергнутых воздействию радиации; 3) определение частоты минисателлитных мутаций в трех поколениях семей, подвергнувшихся воздействию радиации и соответствующих им контрольных семей.

Биодозиметрия с помощью флуоресцентной иммуноокрашиваемой *in situ* гибридизации хромосом (FISH) облученных семей, выявила, что кумулятивная доза ионизирующей радиации в данном регионе в 1998-2002 гг. не превышала 0,5 Gy [11]. Также был проведен анализ индивидуальных цитогенетических нарушений. Результаты показали, что частота хромосомных aberrаций в облученной группе достоверно превышает аналогичный показатель в контрольной группе более чем в 2 раза.

Минисателлитный анализ показал, что частоты мутаций в облученных семьях статистически значимо превышают таковые в контрольной группе: в 1,8 раз в родительском поколении P_0 и в 1,5 раз – в поколении F_1 . Повышенная частота мутаций была зарегистрирована по всем восьми изученным minisatelliteм локусам: (*DIS7*(MS1); *D7S21* (MS31); *DIS8* (MS32); *D2S90* (CEB1); *DIS172* (CEB15); *D10S180* (CEB25); *D10S473* (CEB36); *20q13* (B6.7). В поколении F_2 облученной группы была показана отрицательная корреляция между частотой минисателлитных мутаций и годом рождения родителей: наибольшая частота мутаций (в 2 раза выше контрольного уровня) наблюдалась у потомков, чьи родители рождены до 1970 г., в то время как у родившихся позже частота мутаций соответствовала контролльному уровню [9]. В настоящее время эти образцы активно используются для оценки хронического влияния ионизирующей радиации на людей с использованием новых методов и подходов молекулярной генетики.

Целью этой работы явилось изучение полиморфизма генов XRCC1 (*arg¹⁹⁴trp* и *arg³⁹⁹gln*), XRCC3 (*trp²⁴¹met*) и глутатион S-трансфераз M1 и T1 типа и выявление связи с частотой мутации minisatelliteх генов на примере трехпоколенных

семей, проживающих вблизи бывшего СЯП, и соответствующей контрольной популяции.

Материалы и методы

Характеристика облученной и контрольной групп. Материалом исследования служила база биологических образцов лаборатории молекулярной генетики Института общей генетики и цитологии МОН РК, представленная 247 образцами замороженной (-20°C) периферической крови людей, проживающих на территории СЯП и 172 аналогичными образцами контрольной группы. Облученная группа представлена 30 семьями в 3-х поколениях, проживающих в деревнях: Долонь, Бодене, Черемушки, Чаган и Мостик Бескарагайского района бывшей Семипалатинской области. В контрольной группе, подобранный в строгом соответствии с облученной группой (пол, возраст, национальность, профессия, социальный статус, образ жизни, вредные привычки, состояние здоровья и др.), представлены жители п. Уштобе, п. Жанаталап и п.Дзержинск бывшей Талдыкурганской области, представители 21 семьи.

Выделение ДНК. Геномная ДНК была выделена из замороженных (-20°C), обработанных ЭДТА, образцов периферической крови с использованием стандартного метода фенол-хлороформной экстракции.

Генотипирование. Генотипирование аллелей генов репарации ДНК и детоксикации ксенобиотиков проводили методом ПЦР с применением специфических праймеров (таб.1) [12]. Точечные мутации определенных районов генов репарации ДНК выявляли рестрикционным анализом (таб.2, рис.1). Продукты амплификации и рестрикционные фрагменты анализировали в 3% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ выполнен в лаборатории молекулярной эпидемиологии Техасского Медицинского Университета (США) с использованием программы Software GraphPad 2.04. Минимально достоверные объемы выборок для каждого поколения и изученных когорт в целом определяли с применением Power анализа. Показатели относительного риска (OR), выявляющие

Таблица 1. Условия ПЦР

| Ген | Праймер | Размер ы (bp) | Условия реакции |
|--|--|------------------|--|
| Гены репарации ДНК | | | |
| <i>XRCC1</i> <i>arg¹⁹⁴ trp</i> | (F)GCCCGTCCCAGGT (R)AGCCCCAAGACCCCTT | 490 | 40 циклов: 94°C 15с., 57°C 45с., 72°C 45с. |
| <i>XRCC1</i> <i>arg³⁹⁹ gln</i> | (F)CAAGTACAGCCAGGTCCTAG (R)CCTTCCCTCA TCTGGAGTAC | 248 | 40 циклов: 94°C 15с., 55°C 30 с., 72°C 45с. |
| <i>XRCC3</i> <i>trp²⁴¹ met</i> | (F)GCCTGGTGGTCATGACTC (R)ACAGGGCTCTGAAGGACTG CTCAGCTCACGCACC | 136 | 40 циклов: 94°C 15с., 60°C 30с., 72°C 45с. |
| Гены детоксикации ксенобиотиков | | | |
| <i>GSTM1</i> | (F) GAACCTCCCTGAAAAGCTAAAGC (R) GTTGGGCTCAAATATAACGGTGG | 480 | 35 циклов: 94°C 2мин., 59°C 1 мин., 72°C 1 мин. |
| <i>GSTT1</i> | (F) CCTTA CTTGGTCCTCACATCTC (R) TCACCGGATCATGGCCAGCA | 215 | |

Таблица 2. Анализ ПДРФ и фрагменты рестрикции

| Ген | Рестриктаза | Мутация замены нуклеотидов | позиция | Генотип | Фрагменты (п.н.) |
|--------------|--------------|----------------------------|---------|--|-------------------------------|
| <i>XRCC1</i> | <i>PvuII</i> | Ц на Т | 194 | <i>arg/arg</i> <i>arg/trp</i> <i>trp/trp</i> | 490 490/294/196 294/196 |
| <i>XRCC1</i> | <i>NciI</i> | Г на А | 399 | <i>arg/arg</i> <i>arg/gln</i> <i>gln/gln</i> | 159/89 248/159/89 248 |
| <i>XRCC3</i> | <i>NcoI</i> | Ц на Т | 241 | <i>trp/trp</i> <i>trp/met</i> <i>met/met</i> | 136 136/97/39 97/39 |
| <i>GSTM1</i> | - | - | - | +/-, +/- -/- | 480 0 |
| <i>GSTT1</i> | - | - | - | +/-, +/- -/- | 215 0 |

подверженность генов репарации ДНК и детоксикации ксенобиотиков мутационным изменениям в результате действия радиации рассчитывали по стандартным методикам [13]. Достоверность различий (Р) между группами определяли с использованием t-критерия Стьюдента [13].

Результаты и их обсуждение

Изучение полиморфизма генов репарации ДНК

В результате проведенного исследования установлено распределение аллельных вариантов генов XRCC1 и XRCC3 в популяциях людей, проживающих на территории бывшего Семипалатинского полигона и в контрольной группе (рис. 2).

Для оценки подверженности исследуемых генов репарации ДНК мутациям был вычислен

показатель относительного риска (OR). Гетерозиготные варианты генотипов объединены в одну группу с гомозиготными по мутации в исследуе-

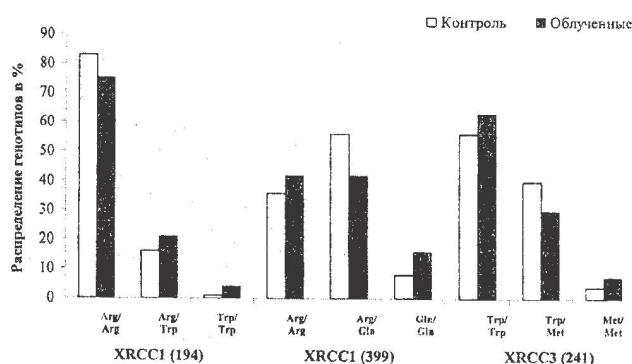


Рис. 2. Распределение генотипов генов репарации у жителей, прилегающих к территории бывшего Семипалатинского полигона и здоровых жителей

мом локусе вариантами. Результаты статистического анализа представлены в таблице 3.

Из представленных данных видно, что количество мутаций в облученной популяции достоверно выше, чем в контроле, для аллеля XRCC1 arg¹⁹⁴trp (OR=1,68; C.I.[1,033-2,759], p=0.03). Достаточно высокий процент встречаемости мутации замены нуклеотидов (C>T) в 194 кодоне гена XRCC1 (arg¹⁹⁴trp) в облученной популяции свидетельствует о значимости этого вида полиморфизма для функциональной активности гена XRCC1 arg¹⁹⁴trp и чувствительности к действию радиации.

Другой вид полиморфизма этого гена XRCC1 arg³⁹⁹gln с заменой нуклеотидов (G > A) не выявляет связи с фактором радиации. Для аллеля XRCC1 arg³⁹⁹gln различия статистически недостоверны (OR=0,788, C.I.[0,52-1,17], p=0.24).

Изученный вид полиморфизма XRCC3 trp²⁴¹met с заменой нуклеотидов (C>T) также не показывает достоверной разницы между облученной и контрольной популяциями (OR=0,768, C.I.[0,51-1,14], p=0.19).

Распределение по поколениям не выявило достоверной разницы между контролем и опытом по всем трем генам ДНК репарации в Р0 и F1 поколениях. Только в F₂ достоверное различие обнаружено для аллеля XRCC1 arg¹⁹⁴trp (OR=2,889, C.I.[1,054-7,916], p=0.03) и для аллеля XRCC1 arg³⁹⁹gln (OR=0,352, C.I.[0,685586-3,863965], p=0.01). Это свидетельствует о значительном действии радиации на половые клетки F1 поколения и наследуемым F₂ генетическом грузе. Р0 поколение подверглось остному облучению, в результате взрыва ядерной бомбы (1949г.), F₁ поколение облучалось малыми дозами радиации в течение всего репродуктивного периода за счет хронического облучения. Исходя из полученных нами данных, хроническое об-

лучение может иметь эффект воздействия на репарационные системы организма как в соматических, так и в половых клетках.

Изучение полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1

Генотипирование генов детоксикации ксенобиотиков проводили с применением мультиплексного ПЦР [22].

В результате установлено распределение аллельных вариантов генов GSTM1 и GSTT1, определяющих наличие (положительный генотип, +/+ и отсутствие (отрицательный генотип, (-/-), (-/+/-) белковых продуктов генов, в облученной и контрольной популяциях (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой доле гомозигот GSTM1(-/-) в облученной группе, чем в контроле (73% и 20% соответственно, $\chi^2=128,41$; p=0,000). При сравнении опытной группы с контрольной по частоте встречаемости нуль генотипа (-/-) гена GSTT1 достоверных различий не обнаружено.

Показатели относительного риска (OR) подверженности мутационным изменениям генов GSTT1 и GSTM1 под действием радиации представлены в таблице 4.

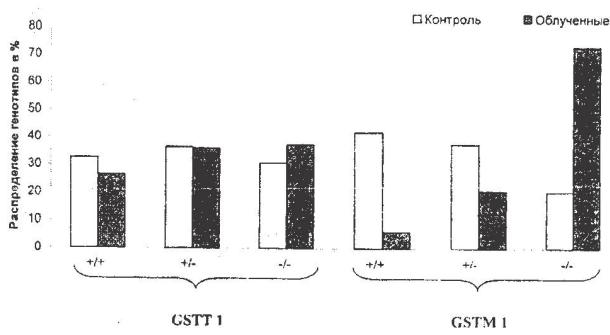


Рис. 3. Встречаемость GSTT1 и GSTM1 генотипов в облученных и контрольных группах

Таблица 3. Распределение генотипов по генам репарации в облученных и контрольных группах

| Гены | Генотип | Контроль n (%) | Облученные n (%) | OR | CI (95%) | P |
|------------|-----------------|----------------|------------------|-------|-------------|------|
| XRCC1(194) | Arg/Arg | 143(83) | 184(74) | 1,688 | 1,033-2,759 | 0,03 |
| | Atr/Trp;Trp/Trp | 29(17) | 63(26) | | | |
| XRCC1(399) | Arg/Arg | 62(36) | 103(42) | 0,788 | 0,528-1,177 | 0,24 |
| | Arg/Gln;Gln/Gln | 110(64) | 144(58) | | | |
| XRCC3(241) | Trp/Trp | 97(56) | 155(63) | 0,768 | 0,516-1,141 | 0,19 |
| | Trp/Met;Met/Met | 75(44) | 92(37) | | | |

Таблица 4. Распределение генотипов по генам GST-семейства в облученной и контрольных группах

| Гены | Генотип | Контроль, n (%) | Облученные, n (%) | OR | CI (95%) | P |
|-------|---------|-----------------|-------------------|--------|--------------|------|
| GSTT1 | +/+ | 56 (33) | 65 (26) | 1,352 | 0,882-2,071 | 0,16 |
| | +/-;-/- | 116 (67) | 182 (74) | | | |
| GSTM1 | +/+ | 72 (42) | 15 (6) | 11,136 | 6,089-20,366 | 0,16 |
| | +/-;-/- | 100 (58) | 232 (94) | | | |

Результаты свидетельствуют, что частота мутаций GSTM1 гена в облученной группе достоверно превышает аналогичные показатели в контрольной популяции (OR=11,116). Причем, это прослеживается по всем поколениям: P_0 (OR=17,273); F_1 (OR=12,889); F_2 (OR=6,556). Однако, по полученным данным гена GSTT1, различия по встречаемости мутантного аллеля (+/-, -/-) в облученной и контрольных группах не достоверны.

Анализ корреляции частоты минисателлитных мутаций и полиморфизма генов репарации и детоксикации ксенобиотиков в облученной и контрольной популяциях

Для оценки влияния генотипа на индукцию мутаций в минисателлитных генах мы сравнили

частоту встречаемости мутаций минисателлитных локусов среди людей с разными генотипами (таблица 5).

Установлено, что в отсутствии фактора облучения мутации гена *XRCC1 Arg194Trp* не имеют значения для индукции мутаций в минисателлитах. При условии действия радиации на людей, с мутантными генотипами (*Atr/Trp + Trp/Trp*) частота мутаций в минисателлитах достоверно выше в облученной группе, чем в контроле. Однако в отсутствии радиационного облучения полиморфизм гена *XRCC1 Arg194Trp* не оказывает влияния на индукцию минисателлитных мутаций. По-видимому, это связано с тем, что в контрольной популяции функциональная активность гена *XRCC1* не имеет проявления, так как не индуцируются однонитевые разрывы ДНК.

Таблица 5. Достоверность различий между средними частотами минисателлитных мутаций по генотипам в облученных и контрольных популяциях

| Полиморфизм | Облученная группа | | Контрольная группа | |
|------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| <i>XRCC1 Arg194Trp</i> | Arg/Arg | Atr/Trp;Trp/Trp | Arg/Arg | Atr/Trp;Trp/Trp |
| Частота MM | 29,95±2,91 | 9,31±1,85 | 21,51±3,13 | 1,16±0,82 |
| t _{St} , P | 5,91; 0,001 | | 6,30; 0,001 | |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | Arg/Arg | Arg/Gln;Gln/Gln | Arg/Arg | Arg/Gln;Gln/Gln |
| Частота MM | 16,60±2,38 | 20,24±2,55 | 6,39±1,86 | 16,28±2,81 |
| t _{St} , P | 1,04; не достоверно | | 2,93; 0,02 | |
| <i>XRCC3 Trp241Met</i> | Trp/Trp | Trp/Met;Met/Met | Trp/Trp | Trp/Met;Met/Met |
| Частота MM | 25,10±2,76 | 14,17±1,27 | 10,46±2,33 | 12,21±2,49 |
| t _{St} , P | 3,59; 0,001 | | 0,51; не достоверно | |
| <i>GSTT 1</i> | +/+ | +/-;-/- | +/+ | +/-;-/- |
| Частота MM | 13,76±2,19 | 25,51±2,77 | 5,23±1,69 | 17,44±2,89 |
| t _{St} , P | 3,33; 0,001 | | 3,64; 0,001 | |
| <i>GSTM 1</i> | +/+ | +/-;-/- | +/+ | +/-;-/- |
| Частота MM | 0,81±0,57 | 38,46±3,10 | 9,88±2,27 | 12,79±2,55 |
| t _{St} , P | 11,95; 0,001 | | 0,85; не достоверно | |

MM – минисателлитные мутации

Результаты анализа другого вида полиморфизма этого гена (*XRCC1 Arg399Gln*) свидетельствуют, что частота мутаций у лиц нормальных генотипов ($22,99 \pm 4,24$) достоверно ниже, чем у лиц, имеющих мутантный генотип ($36,52 \pm 3,76$) вне зависимости от фактора радиации ($P < 0,001$). Сравнивая два вида полиморфизма гена XRCC1, можно сказать, что замена нуклеотида (G>A) в положении 399 кодона Arg/ Gln более критична для функциональной активности фермента, чем мутации замены нуклеотида (C > T) в 194 кодоне гена XRCC1 (arg¹⁹⁴trp).

По нашим результатам в облученной группе частота мутаций у лиц +/+ генотипа XRCC3 достоверно выше, чем у лиц мутантного генотипа. В контрольной популяции различия между группами недостоверны. Это означает, что полиморфизм XRCC3 (Trp241Met) не ассоциирован ни с радиорезистентностью, ни с радиочувствительностью.

Анализ полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков (GSTT1, GSTM1) выявил, что частота мутаций минисателлитных локусов у лиц мутантных генотипов достоверно превышает аналогичные показатели у лиц нормальных генотипов. Причем это характерно как для облученной, так и необлученной когорт. Данное обстоятельство определяет сильное влияние нуль-генотипов (GSTT1, GSTM1) на индукцию минисателлитных мутаций даже в отсутствии фактора облучения.

Таким образом, выявлена ассоциация полиморфизма генов XRCC1, GSTT1 и GSTM1 с радиочувствительностью, выраженной в повышении частоты минисателлитных мутаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Taxayov P.M., Карпов А.Б., и др.* Основные подходы к оценке влияния радиационного фактора на организм человека // Бюллетень сибирской медицины. 2005. №2. С.88-98.
2. *Hu J. et al.* Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk // Env.Mol.Mut. V.39. P.208-15. 2
3. *Matullo G., Palli D. et al.* XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of health subjects // Carcinogenesis. 2001. V.9. P.1437-1445.
4. *Brenneman M.A., Weiss A.E. et al.* XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination // Mutat.Res. 2000. V.459. P.89-97.

5. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б. и др. Молекулярно-генетические подходы, применяемые для оценки воздействия радиации на геном, и индивидуальная радиочувствительность человека // Сиб.мед.журн. 2003. №5. С.78-83.

6. Rebbeck, T.R. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1997. V.6. P.733-743.

7. Дмитриева А.И., Новицкий В.В. и др. Изучение полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 у больных раком легких // Бюллетень СО РАМН. 2004. №1. С.60-62.

8. Yauk C. Monitoring for induced heritable mutations in natural populations^ application of minisatellite DNA screening // Mutation Research. 1998. N. 411. P. 1-10.

9. Dubrova Y.E., Bersimbaev R.I. et al. Nuclear weapons tests and human germline mutation rate // Science. 2002. V.295. P.1307.

10. Bersimbaev R.I., Lindholm C. et al. Three generation study of population living the vicinity of the Semipalatinsk nuclear test site. Biosample database and population characteristics // STUK-AA 180. 2002. P.10-29.

11. Lindholm C., Bersimbaev R.I. et al. Stable chromosome aberrations in the lymphocytes of a population living in the vicinity of the Semipalatinsk nuclear test site // Radiation Research. 2002. V.158. P.591-596.

12. Au W.W., Salama S.A. et al. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays // Environ. Health Perspec. 2003. V.111. P.1843-1850.

13. Jedrychowski W., Maugeri U. Epidemiologic Methods in Studing Chronic Diseases Teachning Manual // A handbook sponsored by the International Center for Studies and research in Biomedicine in Luxembourg. 2000. P.245-247.

Резюме

Семей полигоны маңындағы тұрғындар популяциясындағы ДНК репарациясындағы геннің (тек) генетикалық полиморфизм құрамалары мен минисателлитті мутациялар жиілігіндегі ксенобиотиктер генінің детоксикациясы (үйтсыздандыру) зерттелген.

Summary

In the current study we investigated the influence of polymorphisms in DNA repair (XRCC1, XRCC3) and chemical metabolism genes (GSTT1, GSTM1) on the expression of minisatellite mutations in two populations (247 and 172 individuals, for exposed and control, respectively, in 3 generations) living in the proximity of the Semipalatinsk atomic weapons test site and their relationships with radiation exposure.

¹Институт общей генетики и цитологии, Алматы, Казахстан

²Техасский медицинский университет, Гальвестон, Техас, США

³Евразийский национальный университет им.Л.Н.Гумилева, Астана

Поступила 12.06.09