

# Исследование ассоциаций полиморфных вариантов генов *MnSOD*, *GPx* и *TP53* с частотами хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека при длительном воздействии радона

Ларионов А.В.<sup>1</sup>, Соболева О.А.<sup>2</sup>, Минина В.И.<sup>1,2</sup>, Тимофеева А.А.<sup>2</sup>, Головина Т.А.<sup>1,2</sup>, Дружинин В.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра генетики, Институт Биологии, Экологии и Природных Ресурсов, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

<sup>2</sup> Лаборатория цитогенетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный Исследовательский Центр Угля и Углекислоты СО РАН, Кемерово, Россия, alekseylarionov09@gmail.com

**Актуальность.** Ионизирующее излучение радона помимо прямого эффекта, вызывает также не прямое повреждение ДНК, вызванное окислительным стрессом в результате действия продуктов радиолитического распада воды. Можно предположить важную роль генов антиоксидантного ответа в развитии повреждений ДНК, включая такие признанные биомаркеры генотоксических и канцерогенных воздействий как хромосомные aberrации. **Цель.** Исследование связи полиморфных вариантов 3 генов защитных систем: *MnSOD*, *GPx*, *TP53* с частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови детей-подростков, длительно проживающих в условиях сверхнормативной экспозиции плетноизирующим излучением радона. **Материалы и методы.** Генотипированы 3 однонуклеотидных замены в генах: *MnSOD* 47C>T (rs4880), *GPx* 599 C>T (rs1050450), *TP53* 215 G>C (rs1042522), у подростков длительное время экспонированных радоном в повышенной концентрации (более 200 Бк/м<sup>3</sup>). Генотипирование проводилось методом real-time ПЦР с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов. Расчет частоты хромосомных aberrаций проводился методом световой микроскопии. **Результаты.** Анализ ROC-кривых построенных по результатам генотипирования генов *GPx* и *TP53* позволил определить их как возможные «удовлетворительные» предикторы, ассоциированные с повышением показателя доли aberrантных метафаз: вариант *GPx* T, rs1050450 (AUC = 0,603, p = 0,04) в рецессивной модели, и вариант *TP53* C, rs1042522 (AUC = 0,634, p = 0,03) также в рецессивной модели. **Выводы.** Однонуклеотидные вариации *GPx* T, rs1050450 и *TP53* C, rs1042522 могут быть связаны с увеличением риска повреждения ДНК в условиях длительного радиационного низкодозового воздействия.

**Ключевые слова:** радон, ионизирующее излучение, генетический полиморфизм, антиоксидантные ферменты, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, транскрипционный фактор p53, хромосомные aberrации.

**Финансирование исследования и конфликт интересов:**

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-34-60069\15 мол\_а\_дк). Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

## Studying of association of MnSOD, GPx and TP53 genes polymorphism with frequencies of chromosomal aberrations in human lymphocytes under long-term radon exposure

Larionov A.V.<sup>1</sup>, Soboleva O.A.<sup>2</sup>, Minina V.I.<sup>1,2</sup>, Timofeeva A.A.<sup>2</sup>, Golovina T.A.<sup>1,2</sup>, Druzhinin V.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Institute of Biology, Ecology and Natural Resources, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Cytogenetics, Federal State Budget Scientific Institution Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, SB RAS, Kemerovo, Russia, alekseylarionov09@gmail.com

**Relevance.** Ionizing radon radiation besides the direct effect, also leads to indirect DNA damage caused by oxidative stress as a result of the action of water radiolysis products. It can be assumed the important role of antioxidant response genes in the development of DNA damage, including such recognized biomarkers of genotoxic and carcinogenic effects as chromosomal aberrations. **Goal.** To study association of polymorphic variants of 3 protective genes: *MnSOD*, *GPx*, *TP53* with the frequency of chromosomal aberrations in blood lymphocytes of adolescents who live for a long time under exposure by excessive level of high-LET radon radiation. **Materials and methods.** Three single-nucleotide variations in genes were genotyped: *MnSOD* 47C>T (rs4880), *GPx* 599 C>T (rs1050450), *TP53* 215 G>C (rs1042522), in a group of people exposed for extended periods of exposure to radon in elevated concentrations (> 200 Bq/m<sup>3</sup>). Genotyping was carried out using the real-time PCR method using the technology of competing TaqMan probes. The frequency of chromosome aberrations was calculated by light microscopy. **Results.** ROC curves analysis obtained by results of genotyping of *GPx* and *TP53* genes, made it possible to identify this genes as possible «satisfactory» predictors associated with an increase in the proportion of aberrant metaphases: the hereditary variant *GPx* T, rs1050450 (AUC = 0.603, p = 0.04) in the recessive model, and variant *TP53* C, rs1042522 (AUC = 0.634, p = 0.03) also in the recessive model. **Conclusions.** Single-nucleotide variations in genes *GPx* T, rs1050450 and *TP53* C, rs1042522 may be associated with an increased risk of DNA damage in conditions of prolonged radiation low-dose exposure.

**Key words:** radon, radiation ionizing, polymorphism genetic, antioxidants, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, tumor suppressor protein p53, chromosome aberrations.

## Введение

Повреждения ДНК являются главной причиной нарушения процессов клеточного деления, транскрипции и экспрессии генов, которые, в свою очередь, могут приводить к гибели клеток, апоптозу и злокачественной трансформации. Показатели частоты хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови во многом отражают индивидуальную чувствительность генома к действию комплекса эндогенных и экзогенных факторов [1, 2]. Значимость ХА как эффективных биомаркеров генотоксических и канцерогенных воздействий, в том числе радиационного фактора, показана в ряде классических работ. Частота ХА в соматических клетках может отражать общий канцерогенный риск [3, 4].

Воздействие ионизирующего излучения приводит к прямому повреждению ДНК, а также стимулирует образование ряда окислителей в клетке в результате процесса радиолитического распада воды. В дальнейшем окислительные повреждения могут распространяться от клетки-мишени на близлежащие клетки. Данный эффект известен в радиобиологии как «эффект свидетеля». Для компенсации радиационно-индуцированного окислительного стресса, нарушающего окислительно-восстановительный баланс клетки, происходит активация ряда метаболических путей. Способность клетки справиться с таким стрессом во многом зависит от дозы излучения и его качества. Возникающие в результате радиационного воздействия кислородные радикалы и нитрозные частицы могут играть критическую роль во многих клеточных процессах. Увеличение концентрации подобных метаболитов в облученных клетках приводит к реализации феномена долгосрочных отложенных эффектов радиации. Также в качестве возможных причин геномной нестабильности рассматривают снижение репаративной функции, изменение теломера и эпигенетические модификации.

Окислительный стресс, сопровождающий облучение, приводит к повреждениям ДНК, перекисному окислению липидов, повреждению мембран и митохондриальным нарушениям. Дальнейшее развитие окислительного стресса ведет к снижению адаптивного потенциала организма, что находит отражение в увеличении частоты цитогенетических повреждений.

Естественный полиморфизм многочисленных генов-протекторов, включая гены антиоксидантного ответа, в большой степени определяет индивидуальную устойчивость. При этом многие полиморфные варианты

исследованы недостаточно, часто имеются противоречивые данные об эффектах тех или иных замен.

## Цель и задачи

**Цель:** Исследовать ассоциации однонуклеотидных замен в генах-антиоксидантах *MnSOD* 47C>T (rs4880) и *GPx* 599 C>T (rs1050450), а также транскрипционного фактора *TP53* 215 G>C (rs1042522) с частотой цитогенетических нарушений в условиях долговременного воздействия плотноионизирующего излучения радона.

## Задачи:

1. Сбор и подготовка образцов биологического материала (препараты лимфоцитов и образцы геномной ДНК) у обследованных, длительное время подвергавшихся воздействию радона.
2. Генотипирование образцов ДНК и исследование показателей хромосомных нарушений в обследованной группе.
3. Исследование ассоциации рассматриваемых наследственных вариаций с показателями хромосомных нарушений с использованием методов биомедицинской статистики.

## Материалы и методы

Характеристика обследованных выборок

Изучены образцы венозной крови, полученные у 372 обследованных (8–18 лет, средний возраст  $12,24 \pm 2,60$  года), длительное время проживавших в школе-интернате (г. Таштагол, Кемеровская область, Российская Федерация). Данная школа расположена в горно-таежном районе, характеризующимся относительно низким уровнем химического загрязнения. Включенные в обследование дети-подростки проводили большую часть года в интернате, что сводило к минимуму различия в образе жизни, питании, медицинском обеспечении и иных социальных факторах (табл. 1).

Многочисленные радиологические исследования, выполненные на территории интерната, позволили установить факт постоянного превышения концентраций радона в воздухе учебных и жилых помещений [5]. Усредненный показатель эквивалентной равновесной объемной активности (ЭРОА) изотопов радона в воздухе составил  $468 \pm 77$  Бк/м<sup>3</sup>, что превышает значение предельно допустимого для эксплуатируемых зданий ( $200$  Бк/м<sup>3</sup>). Расчеты с использованием норм радиаци-

Таблица 1

Половозрастная характеристика обследованных выборок

Группа	Экспонированные			Контроль		
	Всего	Муж.	Жен.	Всего	Муж.	Жен.
Число	372	195	177	186	83	103
Возраст (среднее $\pm$ SD)	$12,24 \pm 2,60$	$12,14 \pm 2,63$	$12,36 \pm 2,58$	$14,43 \pm 2,58$	$13,90 \pm 2,58$	$14,85 \pm 2,51$
Возраст (min-max)	8–18			8–19		

онной безопасности [6], показали, что при постоянном пребывании на территории школы-интерната зафиксированные значения ЭРОА радона обуславливают индивидуальную эффективную дозу ингаляционного облучения воспитанников за счет изотопов радона и их короткоживущих дочерних продуктов в воздухе  $\sim 20 \text{ м}^3$  в год. Известно, что радон является канцерогеном первого класса опасности и способен вызывать различные типы генетических повреждений в лимфоцитах и повышение онкологической заболеваемости населения [7, 8, 9].

В качестве контрольной группы использовали образцы крови 186 детей-подростков в возрасте от 8 до 19 лет, проживающих в сельских населенных пунктах Кемеровской области (Красное, Зарубино, Пача), где не было выявлено превышения концентрации радона [5].

Критерием исключения из обследования при формировании экспонированной и контрольной групп являлось наличие рентгенологического медицинского обследования в течение 3 месяцев до сбора образцов крови. Исследование проводили в соответствии с требованиями Комиссии по этике Кемеровского государственного университета, протокол исследования утвержден на заседании Комиссии № 4 от 02.10.2014 г. На каждого участника было получено информированное согласие со стороны родителей или лиц, осуществляющих опеку несовершеннолетних.

#### Выделение ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием фенол-хлороформного метода. На первом этапе выполняли селективный лизис клеточных мембран в сахарозном буфере с замороженными образцами венозной крови. Далее осуществляли фенол-хлороформную экстракцию. К 3 мл венозной крови добавляли 10 мл сахарозного буфера и выдерживали в течение 40 мин при  $0^\circ\text{C}$ , затем центрифугировали, осадок ресуспендировали в 300 SE-буфера (25 мМ ЭДТА, NaCl, 75 мМ), добавляли протеиназу К (500 мкг/мл) и додецилсульфат натрия (1%). После 12 ч инкубации при  $37^\circ\text{C}$ , добавляли 300 мкл фенола. Все образцы дважды экстрагировали с использованием раствора фенола-хлороформа (25 частей фенола, 24 частей хлороформа, 1 часть изопропанола) и один раз хлороформом. На заключительном этапе образцы ДНК обрабатывали 4М раствором NaCl и осаждали 70% этанолом при  $-20^\circ\text{C}$ .

#### ПЦР

Типирование локусов *Gpx1* (*rs1050450*), *SOD2* (*rs4880*), *TP53* (*rs1042522*) проводили методом real-time ПЦР с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов с применением наборов реактивов СибДНК (СибДНК, Новосибирск). Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов, несущих «гаситель» на 3'-конце (BHQ) и флуоресцентных красителей (FAM и

R6G) на 5'-конце. Для выявления замены 47 C>T гена *MnSOD* использовали праймеры:

5'-CGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'  
5'-CTGTGCTTCTCGTCTTCAG-3'

зонды:

5'-FAM-CTGGCTCCGGCTTTGGGG-RTQ-3';  
5'-R6G-CTGGCTCCGGCTTTGGGG-FQ-3'

Для выявления вариантов 599 C>T гена *h Gpx 1* использовали

праймеры:

5'-GCCTGGTGGTGGGTTTCGAGCC-3'  
5'-GACAGCAGCACTGCAACTGCC-3';

зонды:

5'-R6G-CTCAAGGGCTCAGCTGTGC-BHQ-3';  
5'-R6G-CTGGCTCCGGCTTTGGGG-FQ-3'.

Для выявления замены 215 G>C гена *TP53* использовали праймеры:

5'-GCTCCCAGAATGCCAGAG-3'  
5'-GGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'

зонды:

5'-FAM-CTCCCCGCGTGGCCCC-BHQ-3'  
5'-R6G-CTCCCCCGTGGCCCC-BHQ-3'

#### Цитогенетические методы

В качестве цитогенетических маркеров генотоксического эффекта использовали показатели частот хромосомных aberrаций (ХА) в кратковременных культурах лимфоцитов периферической крови.

Для анализа ХА 500 мкл цельной крови помещали во флаконы, содержащие среду RPMI-1640, телячью эмбриональную сыворотку и ампициллин (100 Ед/мл). Для стимуляции деления вводили ФГА (100 мкл/флакон). На 48 часу от начала постановки культур вводили колхицин (0,5 мкг/мл) и продолжали культивирование еще 2 часа. После этого препараты подвергали действию гипотонического раствора KCl (0,55%) и фиксировали в смеси Карнуа. Подробно процедура подготовки препаратов метафазных хромосом представлена в работе [8]. Все препараты шифровались и оценивались двумя независимыми исследователями.

Отбор метафаз, включенных в анализ, и критерии ХА, подлежащих учету соответствовали общепринятым рекомендациям [10]. Учитывали следующие показатели: доля aberrантных метафаз (%), число одиночных фрагментов (%), число парных фрагментов (%), число обменных хромосомного типа (дигцентрические и кольцевые хромосомы, атипичные моноцентрики, %). Все результаты цитогенетического анализа вносили в единые по образцу протоколы, где отмечали количество изученных клеток, общую частоту aberrаций, количество и локализацию отдельных типов aberrаций, и их распределение по клеткам.

#### Статистические методы

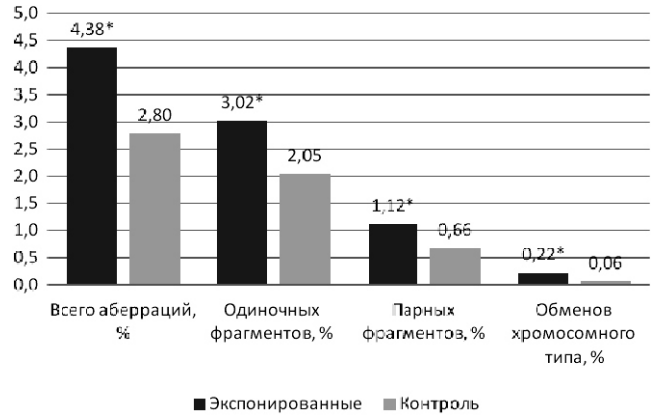
Статистический анализ данных проводили с использованием пакета Statistica 10.0. Для оценки нормально-

сти распределения количественных переменных использовали тест Колмогорова-Смирнова. Анализ данных проводили с использованием блока непараметрической статистики. Сравнение групп выполняли с использованием U-теста Манна—Уитни, поскольку распределение всех количественных переменных (цитогенетические показатели) отличалось от нормального. Для выявления предиктивной значимости доминантной и рецессивной модели генов применяли ROC-анализ (расчет показателя AUC) в модификации DeLong (1988), используя пакет программ MedCalc 14.8.1. Коррекцию полученных результатов с учетом множественных сравнений осуществляли с помощью процедуры FDR (False Discovery Rate) разработанной Benjamini и Yekutieli (2001).

**Результаты**

На рисунке представлены результаты анализа ХА в лимфоцитах крови детей-подростков из экспонированной радоном и контрольной групп.

В лимфоцитах детей из г.Таштагола наблюдалось достоверное увеличение всех основных типов цитогенетических повреждений по сравнению с контролем, что указывает на формирование значимых кластогенных эффектов в условиях экспозиции организма сверхнормативным излучением радона и продуктов его радиоактивного распада. Дополнительным свидетельством наличия радиационной составляющей в наблюдаемых генотоксических эффектах у воспитанников школы-интерната является тот факт, что частота обменов хромосомного типа (дицентрических, кольцевых хромосом, атипичных моноцентриков) составила 0,22%, 95% CI — [0,26—0,18], что значимо превышает аналогичный показатель (0,06%, 95% CI — [0—0,11] в контрольной выборке.



Частота наиболее распространенных типов ХА в группе экспонированных детей и подростков и контрольной группе. Выделены ассоциации генотипов с частотой аберраций в тесте Манна—Уитни, \* —  $p < 0,001$ .

Исследование частоты наследственных вариантов *MnSOD*, *GPx* и *TP53* не выявило существенных различий между экспонированной и контрольной группами, за исключением некоторого повышения частоты минорного аллеля *MnSOD* 47 C в экспонированной группе (табл. 2).

Следует отметить смешанный этнический состав экспонированной группы, представленной шорцами (малая тюркоязычная народность Южной Сибири), европеоидами и потомками смешанных браков. Возможно данная особенность объясняет увеличение частоты аллеля C по замене *MnSOD* 47C>T в экспонированной группе в сравнении с группой контроля представленной европеоидами. В то же время, отсутствие значимых межэтнических различий в частотах генотипов генов репарации позволяет в дальнейшем рассматривать экспонированную группу как единую выборку для проведения ассоциативного исследования с цитогенетическими

Таблица 2

**Частоты генотипов *MnSOD*, *GPx* и *TP53* в экспонированной и контрольной группах**

SNP	Генотип	Группа обследованных			
		Экспонированные		Контроль	
		N	Частота генотипа, %	N	Частота генотипа, %
<i>MnSOD</i> 47C>T	C/C	168	43,5	44	23,7
	C/T	167	43,3	97	52,1
	T/T	51	13,2	45	24,2
<i>GPx</i> 599 C>T	C/C	227	58,8	93	50,0
	C/T	130	33,7	76	40,9
	T/T	29	7,5	17	9,1
<i>TP53</i> 215 G>C	G/G	219	56,9	78	47,0
	G/C	141	36,6	70	42,2
	C/C	25	6,5	18	10,8

Примечание. Распределение частот указанных наследственных вариантов соответствовало теоретически ожидаемому согласно закону Харди—Вайнберга.



показателями в условиях постоянного генотоксического воздействия радонового излучения.

Исходя из того факта, что частоты цитогенетических нарушений не отличались у мальчиков и девочек как в экспонированной радоном, так и в контрольной группах, дальнейшую оценку влияния полиморфных вариантов на частоты ХА проводили без разделения выборок по полу (табл. 3). Парный анализ генотипов показал достоверное увеличение показателя суммарной частоты aberrантных метафаз у носителей минорного генотипа *Trp53* C/C в сравнении с генотипом G/G ( $p = 0,02$ ). Проведена коррекция на множественность сравнений при сравнении генотипа, гомозиготного по «мажорному» аллелю, с гетерозиготами и гомозиготами по «минорному» варианту, ( $p_{\text{corr}} = 0,05/24 = 0,0021$ , где общее количество сравнений в тесте Манна—Уитни = 24 (3 гена X 4 показателя X 2 теста). Таким обра-

зом, уровень значимости находится ниже границ, заданных процедурой FDR.

В отношении полиморфизмов *MnSOD* 47C>T и *GPx* 599 C>T значимых ассоциаций ни с одним из цитогенетических параметров ХА не выявлено. Аналогичный парный анализ генотипов, выполненный для выборки детей из контрольной группы (табл. 4), выявил только увеличение частоты парных фрагментов у носителей *MnSOD* 47T/T генотипа ( $p = 0,008$ ), что также ниже границы значения  $p$ , заданной процедурой FDR.

Для проверки возможной ценности данных нуклеотидных замен в качестве предикторов показателей ХА, на следующем этапе был выполнен ROC-анализ. Данный анализ позволяет оценить качество бинарной классификации (в данном случае генотипы в доминантной и рецессивной модели) и отображает соотношение между долей объектов от общего количества носителей при-

Таблица 3

Частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах детей, экспонируемых радоном, с различными аллельными вариантами генов репарации *MnSOD*, *GPx* и *Trp53*

Генотип	n	Аберрантные метафазы, % [95% CI]	Одиночные фрагменты, % [95% CI]	Парные фрагменты, % [95% CI]	Обмены хромосомного типа, % [95% CI]	
<i>MnSOD</i> 47C>T	C/C	152	4,49 [4,08-4,90]	3,03 [2,68-3,38]	1,20 [1,05-1,35]	0,25 [0,18-0,31]
	C/T	156	4,25 [3,85-4,66]	3,03 [2,69-3,38]	1,02 [0,87-1,17]	0,18 [0,11-0,24]
	T/T	49	4,36 [3,64-5,08]	2,97 [2,35-3,59]	1,15 [0,88-1,42]	0,26 [0,13-0,38]
<i>GPx</i> 599 C>T	C/C	209	4,50 [4,15-4,85]	3,14 [2,84-3,44]	1,13 [1,00-1,25]	0,22 [0,16-0,28]
	C/T	119	4,01 [3,55-4,47]	2,76 [2,36-3,16]	1,03 [0,86-1,20]	0,21 [0,13-0,29]
	T/T	28	4,98 [4,03-5,94]	3,29 [2,48-4,11]	1,43 [1,08-1,79]	0,23 [0,07-0,39]
<i>Trp53</i> 215 G>C	G/G	203	<b>4,26 [3,91-4,61]</b>	2,95 [2,65-3,25]	1,07 [0,94-1,20]	0,23 [0,17-0,29]
	G/C	130	4,32 [3,88-4,76]	3,03 [2,65-3,41]	1,08 [0,92-1,25]	0,20 [0,13-0,27]
	C/C	23	<b>5,30* [4,25-6,35]</b>	3,55 [2,65-4,45]	1,46 [1,07-1,85]	0,26 [0,08-0,44]

Примечание. Приведено значение средней частоты aberrаций и доверительный интервал. Выделены ассоциации генотипов с частотой aberrаций в тесте Манна—Уитни, \* —  $p = 0,02$ .

Таблица 4

Частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах детей контрольной группы, с различными аллельными вариантами генов репарации *MnSOD*, *GPx* и *Trp53*

Генотип	n	Аберрантные метафазы, % [95% CI]	Одиночные фрагменты, % [95% CI]	Парные фрагменты, % [95% CI]	Обмены хромосомного типа, % [95% CI]	
<i>MnSOD</i> 47C>T	C/C	44	2,59 [2,09-3,10]	2,06 [1,68-2,24]	<b>0,45* [0,23-0,68]</b>	0,03 [0-0,09]
	C/T	94	2,72 [2,37-3,06]	1,98 [1,73-2,24]	0,64 [0,49-0,80]	0,07 [0,03-0,11]
	T/T	45	3,11 [2,61-3,61]	2,17 [1,79-2,54]	<b>0,84 [0,62-1,07]</b>	0,06 [0-0,110]
<i>GPx</i> 599 C>T	C/C	92	2,83 [2,48-3,18]	2,08 [1,82-2,34]	0,68 [0,53-0,84]	0,05 [0,01-0,09]
	C/T	74	2,88 [2,49-3,27]	2,10 [1,81-2,39]	0,66 [0,48-0,83]	0,08 [0,04-0,12]
	T/T	17	2,12 [1,30-2,93]	1,62 [1,01-2,22]	0,44 [0,07-0,81]	0 [0-0,09]
<i>Trp53</i> 215 G>C	G/G	203	2,51 [2,12-2,91]	1,91 [1,62-2,20]	0,49 [0,32-0,67]	0,08 [0,03-0,12]
	G/C	130	3,05 [2,63-3,47]	2,13 [1,83-2,44]	0,82 [0,64-1,01]	0,06 [0,02-0,11]
	C/C	23	3,25 [2,44-4,06]	2,53 [1,93-3,12]	0,67 [0,30-1,03]	0 [0-0,09]

Примечание. Приведено значение средней частоты aberrаций и доверительный интервал. Выделены ассоциации генотипов с частотой aberrаций в тесте Манна—Уитни, \* —  $p = 0,008$

знака, верно классифицированных как несущих признак. Исследование наследственных вариаций в гене *MnSOD* 47C>T (rs4880) с использованием ROC-кривых не выявило значимых ассоциаций с частотой хромосомных aberrаций (табл. 5). В отношении генов *GPx* и *Trp53* проведенный анализ ROC-кривых позволил определить возможные «удовлетворительные» предикторы, ассоциированные с повышением основного цитогенетического показателя — доли aberrантных метафаз: наследственный вариант *GPx* T, rs1050450 (AUC = 0,603, p = 0,04) в рецессивной модели, и вариант *Trp53* C, rs1042522 (AUC = 0,634, p = 0,03) также в рецессивной модели.

### Обсуждение

#### Радиационное воздействие в экспонированной группе

Средняя объемная активность радона в исследованной группе составила  $468 \pm 77$  Бк/м<sup>3</sup>, что значительно превышает показатели контрольной группы —  $94 \pm 23$  Бк/м<sup>3</sup>. Гамма-фон от естественных источников радиации составил 11–18 мкР/ч в экспонированной группе и 12–14 мкР/ч в контрольной группе. Индивидуальная эффективная доза облучения, вызванная ингаляцией радона и продуктов его распада, составила 27 мЗв/год. Детально данные результаты представлены в нашей предыдущей работе [8].

Радон признается в настоящее время одним из наиболее опасных канцерогенов, действующих на человека. Выделение радона происходит постоянно с небольшой скоростью в результате распада природного изотопа уран-238. В природе радиационный радоновый фактор не оказывает значимого влияния на живые объекты, поскольку газ радон рассеивается в большом объеме воздуха и достаточно быстро распадается (период полураспада  $Rn^{222} = 3,82$  суток). В то же время жилые и технические постройки представляют собой своеобразные ловушки, накапливающие радон, что приводит к серьезному экспонированию людей, живущих или работающих в таких строениях. Очаги выделения радона часто располагаются спорадически в зависимости от форм микрорельефа, материнской породы, дефектов конструкции, строительных материалов и т.д. Радон рассматривается в качестве ведущей причины повышения частоты хромосомных aberrаций в экспонированной группе, особенно обменов хромосомного типа, что подробно описано в нашей предыдущей работе [8].

Радон электрически нейтрален и наибольшую угрозу здоровью представляют продукты его распада, изотопы <sup>218</sup>Po, <sup>214</sup>Po, <sup>214</sup>Pb, и <sup>214</sup>Bi, которые имеют электрический заряд и легко связываются электростатически с частицами пыли и дыма в воздухе помещений. Эти частицы при вдыхании могут экспонировать эпителиальные клетки легких, вызывая повреждения тканей и нарушения

Таблица 5

**Значение параметра AUC для значений показателей доли aberrантных метафаз, одиночных и парных фрагментов, обменов хромосомного типа у детей, экспонируемых радоном, в доминантной и рецессивной модели**

Генотип	Доминантная модель		Рецессивная модель	
	AUC	p	AUC	p
Доля aberrантных метафаз				
<i>MnSOD</i> C>T	0,533	0,286	0,509	0,853
<i>GPx</i> C>T	0,511	0,711	<b>0,603</b>	<b>0,048</b>
<i>Trp53</i> G>C	0,533	0,278	<b>0,634</b>	<b>0,037</b>
Одиночные фрагменты				
<i>MnSOD</i> C>T	0,517	0,573	0,500	0,999
<i>GPx</i> C>T	0,515	0,628	0,555	0,344
<i>Trp53</i> G>C	0,530	0,322	0,588	0,168
Парные фрагменты				
<i>MnSOD</i> C>T	0,557	0,056	0,507	0,875
<i>GPx</i> C>T	0,522	0,482	0,587	0,151
<i>Trp53</i> G>C	0,533	0,281	0,604	0,131
Обмены хромосомного типа				
<i>MnSOD</i> C>T	0,521	0,403	0,528	0,457
<i>GPx</i> C>T	0,514	0,574	0,503	0,950
<i>Trp53</i> G>C	0,511	0,658	0,533	0,540

\* Примечание. Выделены значения показателя AUC > 0,6, соответствующие критерию «удовлетворительного» предиктора.

в структуре ДНК. Ингалированный радон частично растворяется в крови и распространяется по организму, достигая определенной равновесной концентрации в соответствии с относительной растворимостью. Предложен возможный механизм присутствия радона в жировой ткани вблизи клеток костного мозга, что приводит к их облучению альфа-радиацией. Таким образом, и зрелые лимфоциты, и клетки-предшественники могут подвергаться плотниоизирующему излучению радона.

#### ***Цитогенетические аномалии как следствие низкодозовой длительной радиационной нагрузки***

Установлено, что единственным генотоксическим фактором, действующим на экспериментальную выборку и способным вызвать цитогенетические повреждения, является радон и продукты его распада — замеры уровня радона показали сверхнормативные концентрации, в то же время пробы воздуха и воды не обладали мутагенной активностью (выполнены тест Эймса и тест на индукцию доминантных леталей у *Drosophila*). Подробные результаты радиологических и цитогенетических исследований представлены в работе [8].

Согласно современным представлениям, ионизирующее излучение производит кластерные повреждения ДНК. При этом важно понимать, что излучение разных типов с низкой и высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) характеризуется примерно одинаковым количеством повреждений ДНК в расчете на единицу поглощенной дозы излучения. В случае альфа-радиации данные повреждения «концентрируются» в сравнительно небольшом объеме сайтов, число повреждений в одном сайте коррелирует с показателем ЛПЭ.

Альфа-частицы, обладающие большой массой и зарядом +2, вызывают кластерные повреждения ДНК, играющие центральную роль в формировании долговременных радиационных эффектов. Комплекс из нескольких двухцепочечных разрывов, компактно расположенных на хромосоме приводит к локальному нарушению стабильности хроматина. Подобные формы могут рассматриваться в качестве разновидности высоко локализованного хромотрипсиса — феномена масштабной локальной фрагментации хромосомного материала. Последствия подобной фрагментации могут заключаться в нарушении объединения фрагментов хроматина, что рассматривается некоторыми исследователями в качестве одного из механизмов канцерогенеза [11].

При воздействии радона лишь малая часть эпителиальных клеток испытывает попадание  $\alpha$ -частицы. Эта малая фракция клеток со значительно увеличенной частотой мутаций, вероятно, является первым шагом к возникновению рака. В то же время, эффект  $\alpha$ -частиц не ограничивается клетками мишенями, в работах обнаружено возрастание сестринских хроматидных обменов (СХО) в клетках «свидетелях», не испытавших попадания  $\alpha$ -частиц. Воздействие  $\alpha$ -радиации распространяется на окружение пораженной клетки, даже если попада-

ние частиц происходит редко, при этом наблюдается пропорциональное возрастание частоты цитогенетических нарушений в зависимости от дозы. Подобные данные позволяют предположить проявление значимых генотоксических эффектов даже в диапазоне малых доз  $\alpha$ -излучения.

#### ***Оксидативные последствия облучения плотниоизирующим частицами***

На сегодняшний день распространена точка зрения, согласно которой большая часть радиационных эффектов вызывается рядом ранних биохимических модификаций, которые происходят непосредственно после облучения. В то же время оксидативные изменения могут происходить на протяжении дней и даже месяцев, поскольку после первичного облучения продолжается генерация кислородных и азотных радикальных частиц (ROS и RNS). Эти процессы также могут продолжаться у потомков пораженных клеток. Радиационный оксидативный стресс может распространяться на соседние клетки, этот феномен известен как «эффект свидетеля». Потомки клеток-свидетелей также испытывают многие типы окислительных повреждений, включая карбонилирование белков, перекисное окисление липидов, увеличение спонтанной частоты мутаций и неопластических трансформаций [12]. Последствия облучения можно рассматривать как долгосрочные риски для здоровья. Даже небольшое снижение активности генов антиоксидантных систем может значимо модулировать тяжесть негативных последствий облучения и риски здоровью человека.

Известно, что различные типы ионизирующего излучения неравноценны по степени производимых биологических эффектов. Интенсивность повреждения биомолекул и радиолитиза воды зависит от характеристик распределения энергии вдоль трека движения радиационной частицы. В облученных клетках передача энергии приводит к формированию ROS вдоль трека. Например, редкоизирующее гамма-излучение изотопа  $^{137}\text{Cs}$  производит около 60 ROS на 1 нанограмм ткани в течение примерно 1 микросекунды, в то же время плотниоизирующая частица с энергией 3,2 МэВ производит около 2000 ROS [13]. В ответ на окислительное повреждение запускаются сигнальные каскады, в том числе адаптивные ответы репарации ДНК и антиоксидантные реакции. В случае редкоизирующего гамма- и рентгеновского облучения подобные адаптивные ответы могут приводить к сверхкомпенсации после облучения (явление радиационного горемезиса). В противоположность этому, адаптивные механизмы не могут устранить полностью повреждения при действии низких доз плотниоизирующего излучения. Подобные нарушения ассоциируются также с развитием хронического воспалительного процесса. Клетки, участвующие в развитии воспаления и циркулирующие в крови (макрофаги и другие), могут принимать часть излучения, индуцируя

воспалительные процессы вдалеке от места первоначального облучения. Таким образом, радиационно-индуцированные процессы хронического воспаления и нарушения окислительного метаболизма могут приводить к развитию геномной нестабильности и ряда патологий, таких, как нейродегенеративные заболевания, сердечно-сосудистые и онкозаболевания.

#### **Ассоциации исследованных полиморфных вариантов с показателями цитогенетических повреждений**

Защитные клеточные механизмы в условиях радиационного воздействия включают как процессы репарации прямых повреждений ДНК, так и борьбу с образующимися окислительными частицами и радиотоксинами. Индивидуальная радиочувствительность — это сложный признак, который определяется активностью генов кодирующих различные процессы клеточной защиты. Общее количество генов, вовлеченных в эти процессы, может достигать нескольких сотен, включая гены репарации, детоксикации, биотрансформации и контроль клеточного цикла.

К настоящему времени накоплен большой объем информации о влиянии наследственных вариаций в генах защитных систем на признак индивидуальной радиочувствительности. Гены репарации ДНК являются первым барьером, исправляющим большую часть первичных повреждений ДНК, большой вклад данного клеточного механизма показан во многих работах. К сожалению, имеется лишь небольшое число работ, исследующих наследственные факторы радиочувствительности в условиях воздействия радонового фактора. В ряде наших ранее опубликованных работ также проводился поиск генетических основ чувствительности к радоновому фактору. Было показано значение полиморфных вариантов ряда генов репарации (*APE1*, *OGG1*, *ADPRT*, *XpG* и *XpD*) для формирования тяжести повреждения наследственного материала, в условиях хронического действия радона, что выражалось показателями частоты хромосомных aberrаций [14, 15]. К числу факторов защиты относятся и гены антиоксидантных систем, способных снижать негативные эффекты, вызванные окислителями, образовавшимися в результате радиолиза воды.

В представленной работе обнаружено некоторое увеличение суммарной частоты aberrаций у носителей минорного генотипа *Trp53* C/C в сравнении с генотипом G/G ( $p < 0,05$ ). В отношении антиоксидантного гена *MnSOD* не было выявлено значимых ассоциаций. В то же время для полиморфных вариантов генов *GPx* и *Trp53* были показаны некоторые предиктивные свойства в отношении суммарной частоты aberrаций. Анализ ROC-кривых позволил выявить возможные «удовлетворительные» предикторы, ассоциированные с повышением суммарной частоты aberrаций: наследственный вариант *GPx* T, rs1050450 (AUC = 0,603,  $p = 0,04$ ) в рецессивной модели, и вариант *Trp53* C, rs1042522 (AUC = 0,634,  $p = 0,03$ ) также в рецессивной модели.

Несмотря на то, что показатели хромосомных нарушений в экспонированной группе значительно превышали показатели контрольной группы, для исследованных SNP не было выявлено ассоциаций с маркерами радиационного повреждения (обмены хромосомного типа, включая кольцевые и дицентрические хромосомы). Можно предположить, что интенсивность возникновения данных кластерных повреждений модулируется главным образом репарационными механизмами. В то же время хроматидные разрывы, вызванные окислительным стрессом и другими химическими факторами, можно связать в первую очередь с деятельностью антиоксидантных систем.

Марганцевая супероксиддисмутаза (*MnSOD*) является важным митохондриальным антиоксидантным ферментом клеток млекопитающих. *MnSOD* отвечает за окисление супероксидных радикалов — побочных продуктов работы митохондрий. Данный фермент критически важен в условиях окислительного стресса и во многом определяет ответ на генотоксическое воздействие. Показано, что активность гена *MnSOD* может увеличиваться в результате некоторых посттрансляционных модификаций. Полиморфный вариант Ala16Val, ведёт к изменению вторичной структуры молекулы фермента, что в свою очередь, может влиять на локализацию и транспорт энзима в митохондрии [16].

Глутатионпероксидаза 1 (*GPx*) является тетрамерным ферментом, содержащим селен. Катализирует реакцию глутатиона с пероксидом водорода, а также трансформирует липоперекиси и другие органические гидроперекиси в их гидроксильные соединения [17]. *GPx* использует глутатион в качестве донора протона, превращая его в окисленную форму глутатиона. Находится в цитоплазме и митохондриальном матриксе, в нерастворимой форме участвует в нейтрализации липидных гидроперексидов в мембранах. Замена C→T (rs1050450) во втором экзоне гена *GPx1* приводит к замене пролина на лейцин Pro198Leu в белке. Это может сказываться на каталитической активности фермента, на его сродстве к субстрату, специфичности, стабильности структуры и т.д. У носителей аллеля T каталитическая активность фермента ниже на 5% для каждой дополнительной копии T [18].

Окислительный стресс является потенциальным индуктором гена-супрессора опухолей *Trp53*. Это фактор определяет антипролиферативные клеточные сигналы в условиях окислительного стресса, включая временный арест клеточного цикла, старение клетки и апоптоз. Снижение активности p53 снижает клеточную чувствительность к окислительному стрессу и неизбежно повышает риск возникновения злокачественных трансформаций [19]. Установлено, что вариант Arg72 (rs1042522) кодирует протеин p53, который более эффективно индуцирует апоптоз и подавляет опухолевую трансформацию, чем белок, кодируемый вариантом Pro72 [20].

Непрямое повреждение ДНК в условиях ионизирующего излучения обеспечивает большую часть всех ради-



ационных эффектов, большинство из которых реализуется в результате действия кислородных радикальных частиц и других окислителей в клетке. Эффективность работы антиоксидантных генов может влиять на изменение числа повреждений клеточных структур, включая ДНК, что, в свою очередь, находит отражение в изменении частоты хромосомных нарушений.

#### Список литературы

- Mateuca, RA; Decordie, I; Kirsch-Volders, M. Cytogenetic methods in human biomonitoring: principles and uses. *Methods Mol Biol.* 2012;817:305-334.
- Vodenkova, S; Polivkova, Z; Musak, L et al. Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients. *Mutagenesis.* 2015;30:557-563.
- Bonassi, S; Знаор, А; Норппа, Н; Hagmar, L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104:376-382.
- Norppa, H; Bonassi, S; Hansteen, IL et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006;600(1-2):37-45.
- Дружинин, ВГ; Волков, АН; Глушков, АН и др. Роль полиморфизма генов репарации в оценке чувствительности генома человека к воздействию сверхнормативных концентраций радона. *Гигиена и санитария.* 2011;5:26-30.
- Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009). М.: Минздрав России. 2009. 72с.
- Sinitsky, MY; Druzhinin, VG; The application of the cytokinesis-block micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes for the assessment of genome damage in long-term residents of areas with high radon concentration. *J Radiat Res.* 2014;55(1):61-66.
- Druzhinin, VG; Sinitsky, MY; Larionov, AV et al. Assessing the level of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes in long-term resident children under conditions of high exposure to radon and its decay products. *Mutagenesis.* 2015;30:677-683.
- Минина, ВИ; Дружинин, ВГ; Головина, ТА и др. Распространенность канцерогенных и мутагенных эффектов у населения Горной Шории. *Гигиена и санитария.* 2011;2:35-38.
- Brogger, A; Hagmar, L; Hansteen, IL et al. An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990;45:85-92.
- Schipler, A; Iliakis, G. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(16):7589-7605.
- Buonanno, M; de Toledo, SM; Pain, D; Azzam, EI. Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress. *Radiat Res.* 2011;175(4):405-415.
- Autsavapromporn, N; de Toledo, SM; Little, JB et al. The role of gap junction communication and oxidative stress in the propagation of toxic effects among high-dose  $\alpha$ -particle-irradiated human cells. *Radiat. Res.* 2011;175:347-357.
- Minina, VI; Druzhinin, VG; Lunina, AA et al. Association of DNA repair gene polymorphism with chromosomal aberrations frequency in human lymphocytes. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2012;2(2):171-176.
- Larionov, AV; Sinitsky, MY; Druzhinin, VG et al. DNA excision repair and double-strand break repair gene polymorphisms and the level of chromosome aberration in children with long-term exposure to radon. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(8):466-474.
- Charniot, JC; Sutton, A; Bonnefont-Rousselot, D et al. Manganese superoxide dismutase dimorphism relationship with severity and prognosis in cardiogenic shock due to dilated cardiomyopathy. *Free Radic Res.* 2011;45(4):379-388.
- Avelar, TMT; Storch, AS; Castro, LA et al. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved? *J Bras Patol Med Lab.* 2015;51(4):231-239.
- Ravn-Haren, G; Olsen, A; Tjonneland, A et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006;27:820-825.
- Gambino, V; De Michele, G; Venezia, O et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. *Aging Cell.* 2013;12:435-445.
- Thomas, M; Kalita, A; Labrecque, S et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1092-1100.