

Ассоциации полиморфных вариантов генов репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков с уровнем хромосомных нарушений в лимфоцитах человека*

Бабушкина Н.П., Кучер А.Н., Лебедев И.Н., Васильев С.А., Тимошевский В.А., Брагина Е.Ю., Суханова Н.Н., Торхова Н.Б., Яковлева Ю.С.

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, 634050, г.Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10, тел. (3822) 513146, факс (3822) 513744, e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru

Представлены данные о частотах полиморфных вариантов генов систем репарации ДНК (*MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321), *XRCC1* (rs25487)), контроля клеточного цикла (*TP53* (rs1042522)) и детоксикации ксенобиотиков (*Cyp2C19* (rs4244285), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del)) у индивидов с наличием в организме инкорпорированного плутония-239 и в контрольной группе, а также в подгруппах, характеризующихся различной частотой хромосомных аномалий (три группы сравнения: с высоким и низким уровнем частоты хромосомных aberrаций, анеуплоидии и микроядер). Ни по одному из исследованных локусов не зарегистрировано статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов между группой контроля и группой с наличием в организме инкорпорированного плутония-239. Однако установлены статистически значимые различия в частотах генотипов по rs1799977 гена *MLH1* между подгруппами с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций ($p=0,047$), а также по частоте комбинаций генотипов *GSTT1/GSTM1* между подгруппами с разным уровнем анеуплоидии ($p=0,032$). Для других исследованных локусов отмечены некоторые различия по частотам генотипов между группами с высокой и низкой частотой хромосомных нарушений разных типов, которые, однако, не достигали уровня статистической значимости. Частоты аллелей между сравниваемыми группами варьировали в меньшей степени; статистически значимые различия зарегистрированы только между подгруппами с разным уровнем хромосомных aberrаций (для rs25487 в гене *XRCC1*, $p=0,039$).

Ключевые слова: индивидуальная радиочувствительность, полиморфизм генов, репарация ДНК, хромосомные aberrации, микроядра

Введение

В настоящее время существование феномена индивидуальной радиочувствительности ни у кого не вызывает сомнения, так же как и наличие генетического компонента, оказывающего влияние на способность организма выдерживать воздействие ионизирующего излучения. Это подтверждается сходной индивидуальной радиочувствительностью в парах однойичевых близнецов, а также повышенной радиочувствительностью пациентов с наследственными заболеваниями, обусловленными мутациями генов репарации ДНК. Поэтому оценка индивидуальной радиочувствительности и изучение определяющих её факторов являются одними из приоритетных направлений современной радиобиологии. Активное использование ионизирующих излучений в повседневной жизни (рентгенология, радиотерапия, атомная электроэнергетика) увеличивает техногенную нагрузку на человека и его среду обитания. Контакт с ионизирующим излучением происходит, преимущественно, в диапазоне малых доз, реакция организма на которые может заметно варьировать. Известно, что существуют различия по радиочувствительности между видами, популяциями, поло-

возрастными группами; реакция на радиацию может зависеть от физиологического состояния организмов, отличаться у клеток разных типов, зависеть от стадии дифференцировки и стадии клеточного цикла [36]. Таким образом, при равном радиационном воздействии реакция организма может отличаться у разных индивидов. Пока нет однозначных суждений о том, какие именно гены являются ключевыми в определении индивидуальной радиочувствительности. Однако часто к кандидатным относят гены репарации ДНК, контроля клеточного цикла, метаболизма ксенобиотиков и др. [2].

В настоящем исследовании изучен полиморфизм генов систем репарации ДНК (мисс-матч — *MLH1* (rs1799977) и *PMS2* (rs1805321); эксцизионной репарации оснований — *XRCC1* (rs25487)), контроля клеточного цикла (*TP53* (rs1042522)), детоксикации ксенобиотиков (*Cyp2C19* (rs4244285) — первой фазы, *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del) — второй фазы) в группах индивидов, с одной стороны — дифференцированных по наличию/отсутствию в организме инкорпорированного плутония-239, с другой, — характеризующихся различной частотой хромосомных аномалий.

Настоящее исследование выполнено в рамках государственного контракта №16.512.11.2063 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы».

Материалы и методы

Всего обследовано 145 чел., из них 71 чел. — лица с наличием в организме инкорпорированного плутония-239 (активность 10–188 нКи) (работники ОАО «Сибирский химический комбинат», г.Северск; далее «Pu»). 74 чел., не имеющие отношения к плутониевому производству, составили контрольную группу (далее «К») (табл. 1). Все индивиды в обеих группах были мужского пола, преобладали представители русской национальности. От каждого индивида получено информированное согласие на проведение генетического исследования.

Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов хромосом для цитогенетического анализа проводили с использованием стандартных методов [29]. Анализ хромосомных нарушений проводился с использованием классических цитогенетических (применялась рутинная окраска хромосом по Гимза и дифференциальная окраска хромосом по G-методу (Романовского—Гимза)) [29] и молекулярно-цитогенетических методов [12] в случае учёта микроядер. Более подробно использованные молекулярно-цитогенетические методы описаны нами ранее [4].

У каждого индивида проанализировано 300 рутинно окрашенных метафаз и 100 метафазных пластинок с дифференциальной окраской. Частоту аномальных сегрегационных событий для каждой пары анализируемых на одном препарате хромосом оценивали в 1000 двухъядерных клеток, в которых проводили учет микроядер.

ДНК для проведения молекулярно-генетического анализа выделяли из лимфоцитов периферической крови по стандартной методике с фенол-хлороформной очисткой [3]. Полиморфные варианты генов анализировали с помощью ПЦР-ПДРФ. Структура праймеров, температура отжига и паттерн рестрикции представлены в табл. 2. Программы амплификации включали следующие блоки: первичная денатурация в течение 5–7 мин при 94–95°C, 30–35 циклов отжига праймеров при специфической для каждого snp температуре (табл. 2), элонгация цепи при 72°C и денатурация при 94°C. Программы завершала финальная элонгация в течение 5–10 мин при 72°C. Для определения генотипов продукты амплификации подвергали гидролизу специфической эндонуклеазой рестрикции (согласно протоколу фирмы-производителя), затем продукты рестрикции фракционировали в 3%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Генотипирование полиморфных

вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1* проводили с помощью мультиплексной ПЦР. Отсутствие соответствующих фрагментов размером 131 и 114 п.н. указывало на наличие гомозигот по «нулевым» аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* соответственно. Наличие этих фрагментов свидетельствовало о наличии нормальной копии гена в гомо-, либо гетерозиготном состоянии. Для внутреннего контроля амплификации определяли фрагмент гена *ER* размером 181 п.н.

Различия по величинам усреднённых значений частот хромосомных нарушений между сравниваемыми группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга проверяли с помощью критерия χ^2 ; для сравнения частот генотипов и аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и точный тест Фишера.

Результаты и обсуждение

Важным вопросом в оценке индивидуальной радиочувствительности является анализ зависимости уровня хромосомных нарушений в клетках человека от носительства различных вариантов генов, продукты которых участвуют в репарации ДНК, метаболизме ксенобиотиков и других процессах в организме, связанных с ответом на воздействие радиации. Ранее нами был проведен анализ частоты структурных и числовых хромосомных нарушений и микроядер в лимфоцитах периферической крови у индивидов с инкорпорированным плутонием и лиц контрольной группы, никогда не контактировавших с радиацией в рамках профессиональной деятельности [4]. Основные результаты данного исследования представлены в табл. 3. В группе индивидов с инкорпорированным плутонием-239 наблюдалась статистически значимо более высокая частота аберраций хромосомного типа по сравнению с контрольной группой. Напротив, частота аберраций хроматидного типа не отличалась статистически значимо между обследованными группами, что согласуется с известными механизмами хронического воздействия ионизирующего излучения. Кроме того, уровень микроядер, соответствующих отставшим фрагментам хромосом и целым хромосомам, у работников плутониевого производства был статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Наконец, суммарная частота анеуплоидии по шести исследованным хромосомам также оказалась выше в лимфоцитах периферической крови индивидов с инкорпорированным плутонием-239 по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1

Характеристика сформированных для обследования групп индивидов с инкорпорированным плутонием и контрольных лиц

Группа	Обозначение группы	Возраст, лет	Активность плутония, нКи	Число индивидов
Контрольная группа	«К»	24–70 (53,0±9,42)	—	74
Лица с инкорпорированным плутонием-239	«Pu»	26,5–70 (56,7±9,5)	10–188	71

По результатам цитогенетического исследования были выделены подгруппы индивидов с разным уровнем хромосомных нарушений: хромосомных аберраций (ХА), анеуплоидии (Ан), микроядер (МЯ) (табл. 4). Между сформированными группами проводилось сравнение частот полиморфных вариантов генов *MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321), *XRCC1* (rs25487), *TP53*

(rs1042522), *Cyp2C19* (rs4244285), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del).

Ни по одному из исследованных локусов не установлено статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов между группой контроля и группой индивидов с инкорпорированным плутонием-239, что позволило нам в дальнейшем формировать подгруппы с разным уровнем

Таблица 2

Структура праймеров, параметры ПЦР и рестрикции для определения генотипов по исследованным маркерам

Ген	Полиморфизм	Локализация в гене	Последовательность праймеров	Температура отжига праймеров	Метод детекции	Продукты гидролиза, п.н.	Источник
<i>MLH1</i>	rs1799977	Экзон 8	F: 5'-ATAGTTTGCTGGTGGAGATA-3' R: 5'-ATGTGATGGAATGATAAACCC-3'	56°C	ПЦР / ПДРФ Bcl I	G: 243 A: 161+82	*
<i>PMS2</i>	rs1805321	Экзон 11	F: 5'-AGAACAAGCCTCACAGCCCA-3' R: 5'-CCGTGTCTGGGATGCTGAAC-3'	64 °C	ПЦР / ПДРФ Bst MA I	T: 243 C: 136+107	*
<i>XRCC1</i>	rs25487	Экзон 10	F: 5'-TTGTGCTTTCTGTGTCCA-3' R: 5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'	55°C	ПЦР / ПДРФ Msp I	A: 615 G: 377+238	*
<i>TP53</i>	rs1042522	Экзон 4	F: 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' R: 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'	63°C	ПЦР / ПДРФ Bst FN I	C: 199 G: 113+86	*
<i>Cyp2C19</i>	rs4244285	Экзон 5	F: 5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3' R: 5'-TATCACTTCCATAAAAGCAAG-3'	60°C	ПЦР / ПДРФ Sma I	A: 169 G: 120+49	[8]
<i>GSTT1</i>	Протяжённая делеция ~10 тыс. п.н.		F: 5'-GGTCATTCTGAAGGCCAAGG-3' R: 5'-TTTGTGGACTGCTGAGGACG-3'	65°C → 61 °C (градиент)	Мультиплексная ПЦР In/Del	"+": 13 " ": —	[32]
<i>GSTM1</i>	Протяжённая делеция ~10 тыс. п.н.		F: 5'-TGCTTCACGTGTTATGGAGGTTTC-3' R: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'			"+": 114 " ": —	

Примечание. * — для конструирования последовательности праймеров исследуемых областей генов использовалась программа Vector NTI

Таблица 3

Средние значения частоты хромосомных нарушений в исследованных группах (% ± ст.ошибка)

Тип хромосомных нарушений	Группа индивидов с инкорпорированным плутонием-239	Контрольная группа
Аберрации хромосомного типа	0,86±0,10*	0,33±0,12
Аберрации хроматидного типа	0,75±0,08	0,55±0,11
Суммарная частота анеуплоидии (хромосомы 2, 7, 8, 12, X, Y)	1,49±0,30*	0,73±0,23
Микроядра	0,78±0,07*	0,55±0,04

Примечание. * — статистически значимо более высокая частота в группе индивидов с инкорпорированным плутонием-239 по сравнению с контрольной группой (p<0,05)

Таблица 4

Характеристика групп, сформированных на основе уровня хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови

Группа сравнения	Исходные группы (численность)	Критерий формирования	Объём выборки
>ХА	"Pu" (15) + "K" (2)	Уровень хромосомных аберраций выше (>) либо ниже (<) 2,5%	17
<ХА	"Pu" (30) + "K" (3)		33
>Ан	"Pu" (26) + "K" (5)	Уровень анеуплоидии 10% и выше (>) либо ниже (<)	31
<Ан	"K" (23)		23
>МЯ	"Pu" (26) + "K" (16)	Уровень микроядер выше 6% (>) либо ниже (<)	42
<МЯ	"Pu" (12) + "K" (25)		37

Примечание. "K" и "Pu" — см. табл. 1

хромосомных нарушений из обеих исходных групп (табл. 4). Отклонения наблюдаемого распределения генотипов от ожидаемого при равновесии Харди—Вайнберга тестировали как в исходных группах («Ри» и «К»), так и в подгруппах, различающихся по уровню хромосомных нарушений. В исходных группах по всем исследованным локусам наблюдалось соответствие равновесию Харди—Вайнберга (табл. 5). Соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому было зарегистрировано во всех подгруппах по изученным полиморфным вариантам в генах *CYP2C19*, *XRCC1* и *PMS2*, в пяти из шести подгрупп по гену *TP53* и в трёх из шести подгрупп по гену *MLH1*. В подгруппах с высокими уровнями хромосомных aberrаций, анеуплоидии и микроядер по полиморфному варианту в гене *MLH1* и в подгруппе с высоким уровнем анеуплоидии по полиморфному варианту в гене *TP53* распределение генотипов отличалось от равновесия Харди—Вайнберга. Во всех случаях (и для гена *TP53*, и для гена *MLH1*) отклонение было обусловлено отсутствием гомозигот по редкому аллелю и избытком гетерозигот. При этом, для полиморфного варианта гена *MLH1* в парах сравнений с высоким и низким уровнем хромосомных нарушений статистически значимые различия по распределению генотипов были установлены только между группами с хромосомными aberrациями выше 2,5% и ниже 2,5%, что соответствует фоновому уровню ($\chi^2=6,097$, $p=0,047$). Предрасполагающим к повышенному уровню хромосомных aberrаций оказался гетерозиготный генотип: $OR=4,41$ (CI: 1,14—14,29), $\chi^2=3,95$, $p=0,047$. Между другими сравниваемыми подгруппами (различающимися по уровню анеуплоидии и микроядер) по частотам генотипов rs1799977 в гене *MLH1* не установлено статистически значимых отличий, как и по исследованному локусу в гене *TP53*. Вместе с тем, ситуация по «смещению» распределений частот генотипов (табл. 5) в подгруппах с высоким уровнем хромосомных нарушений не может быть случайной, так как данные подгруппы были сформированы из двух исходных групп (контрольной и группы с инкорпорированным плутонием-239 — табл. 5), в которых, по всем исследованным полиморфным вариантам наблюдалось соответствие равновесию Харди—Вайнберга, а между группами не было установлено статистически значимых различий по частотам генотипов.

При попарном сравнении подгрупп с разным уровнем хромосомных нарушений, помимо отмеченного выше гена *MLH1*, ещё только в двух случаях выявленные различия достигли уровня статистической значимости: для rs25487 гена *XRCC1* при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций и для сочетаний генотипов *GSTT1/GSTM1* — при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем анеуплоидии. Однако в отдельных парах сравнений для всех локусов наблюдались определённые отличия в характере распределения частот генотипов и аллелей, не достигавшие, тем не менее, значимого уровня. Следует отметить, что численности обследованных групп невелики, что может отражаться на статистической значимости полученных результатов.

По полиморфному варианту в гене *PMS2* статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов в подгруппах с разным уровнем хромосомных нарушений не зарегистрировано. Вместе с тем, наблюдается существенное (в 1,59 раза) различие по частоте носительства гетерозигот в подгруппах с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций (35,29 и 56,25% соответственно) (табл. 5).

Белки *PMS2* и *MLH1* являются компонентами системы пост-репликативной мисс-матч репарации (MMR). Они образуют гетеродимер, называемый *MutL α* , функционирующий совместно с гетеродимером *MutS α* или *MutS β* — субъединицей комплекса, узнающего нарушения спаривания двойной спирали ДНК (мисс-матчи). *PMS2* обладает эндонуклеазной активностью, внося одноцепочечные разрывы в нить ДНК по краям участка с мисс-матчем. Деградиацию повреждённого участка осуществляет экзонуклеаза *EXO1*. Показаны физические взаимодействия *MutL α* с ДНК-полимеразой III, также привлекаемой к процессу репарации. Эндонуклеаза *PMS2* не может разрезать метилированную ДНК, поэтому таким путем могут репарироваться только нарушения, возникшие *de novo*. Кроме того, *MutL α* является частью *BRCA1*-ассоциированного комплекса, контролирующего стабильность генома — *BASC* (который содержит белки *BRCA1*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *ATM*, *BLM*, *PMS2*), а также белкового комплекса *RAD50-MRE11-NBS1*. Этот комплекс динамичен и изменяется как на протяжении клеточного цикла, так и в пределах субклеточных доменов. *MLH1* может также гетеродимеризоваться с *MLH3* (*MutL γ*) и играть определённую роль в мейозе. Известно также, что *PMS2* вовлечен в сигнальный путь, который при сильных повреждениях ДНК вызывает остановку клеточного цикла и ведет к апоптозу [19, 28]. Белки *PMS2* и *MLH1* играют важную роль в поддержании стабильности генома [22, 35]. Мутации в генах *PMS2* и *MLH1* могут приводить к некоторым наследственным онкологическим заболеваниям, таким как синдром Линча и синдром Туркота. Большинство семей с клинически верифицированным наследственным неполипозным колоректальным раком имеет мутации в генах *MLH1* и *MSH2*. Кроме того, мутации в *MLH1* могут вызвать синдром Мью—Торре, лобулярную карциному (LCIS), рак эндометрия [9, 20, 34].

В настоящем исследовании для замены в гене *XRCC1* (rs25487) также была выявлена некоторая специфика в распределении частот генотипов в разных подгруппах (табл. 5): частота гомозиготного генотипа по мажорному аллелю варьировала в пределах 35—59%, а гетерозиготного — 40—60%. Тем не менее, между сравниваемыми парами подгрупп статистически значимых различий по частотам генотипов не выявлено. По частотам аллелей различия регистрировались только при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций: аллель А является предрасполагающим к формированию структурных нарушений хромосом ($OR=2,82$ (CI: 1,05—7,66) $\chi^2=4,26$, $p=0,039$).

Частоты аллелей и генотипов изученных локусов в исследованных группах

Полиморфизм	Группы							
	"Pu"	"K"	>XA	<XA	>An	<An	>MЯ	<MЯ
<i>MLH1</i>								
AA	39,44	37,84	23,53	42,42	26,67	35,71	26,19	29,73
AG	53,52	48,65	76,47	42,42	73,33	57,14	64,29	59,46
GG	7,04	13,51	0	15,15	0	7,14	9,52	10,81
A	66,2	62,16	61,76	63,64	63,33	63,04	58,33	59,46
PXB: χ^2 (p)	2,725 (>0,05)	0,086 (>0,05)	6,515 (<0,01)	0,229 (>0,05)	10,055 (<0,01)	1,043 (>0,05)	4,367 (<0,05)	2,014 (>0,05)
χ^2 (p) генотипы	6,097 (0,047)							
<i>PMS2</i>								
CC	21,43	22,22	29,41	18,75	30	26,09	28,57	18,92
CT	58,57	50	35,29	56,25	46,67	47,82	52,38	48,65
TT	20	27,78	35,29	25	23,33	26,09	19,05	32,43
C	50,71	47,22	47,06	46,88	53,33	50,00	54,76	43,24
PXB: χ^2 (p)	2,063 (>0,05)	0,001 (>0,05)	0,487 (>0,05)	1,446 (>0,05)	0,536 (>0,05)	0,117 (>0,05)	0,138 (>0,05)	0,003 (>0,05)
χ^2 (p) аллели	4,259 (0,039)							
<i>TP53</i>								
GG	57,75	48,65	64,71	48,49	46,67	65,22	61,90	51,35
CG	36,62	44,59	35,29	39,39	53,33	30,43	38,10	43,24
CC	5,63	6,76	0	12,12	0	4,35	0	5,41
G	76,06	70,95	82,35	68,18	73,33	80,43	80,95	72,97
PXB: χ^2 (p)	0,002 (>0,05)	0,494 (>0,05)	0,781 (>0,05)	0,280 (>0,05)	3,967 (<0,05)	0,025 (>0,05)	2,325 (>0,05)	0,343 (>0,05)
χ^2 (p) аллели	4,259 (0,039)							
<i>Сур2С19</i>								
GG	77,14	69,86	88,24	68,75	83,33	60,87	63,41	81,08
GA	20	28,77	11,76	28,12	13,33	39,13	34,15	18,92
AA	2,86	1,37	0	3,13	3,34	0	2,44	0
G	87,14	84,25	94,12	82,81	90	80,43	80,49	90,54
PXB: χ^2 (p)	0,809 (>0,05)	0,512 (>0,05)	0,066 (>0,05)	0,005 (>0,05)	2,017 (>0,05)	1,361 (>0,05)	0,311 (>0,05)	0,404 (>0,05)
χ^2 (p) аллели	8,78 (0,032)							
<i>GSTT1/GSTM1</i>								
+/+	46,48	39,19	47,06	45,46	56,67	30,43	47,62	43,24
+/-	36,62	47,3	47,06	39,39	36,67	43,48	33,33	43,24
-/+	11,27	4,05	0	12,12	0	21,74	9,52	10,81
-/-	5,63	9,46	5,88	3,03	6,66	4,35	9,52	2,7
GSTT1 "+"	83,1	86,49	94,12	84,85	92	78,57	75,00	86,49
GSTM1 "+"	57,75	43,24	47,06	57,58	60	50	57,14	54,05
χ^2 (p) сочетания генотипов	8,78 (0,032)							
Примечание. Частоты приведены в процентах; PXB — показатели (χ^2 и p) оценки соответствия частот генотипов исследованных групп равновесию Харди—Вайнберга; приведены только статистически значимые различия, полученные при сравнении частот аллелей (χ^2 (p) аллели) и генотипов (χ^2 (p) генотипы) между группами								

Не исключено влияние этой нуклеотидной замены на репарацию хромосомных aberrаций, что согласуется с данными литературы. В ряде работ показано, что высокая частота аллеля А ассоциирована с повышением уровня различных хромосомных нарушений [14, 18, 23]. В настоящем исследовании частота редкого аллеля А у индивидов с высоким уровнем хромосомных aberrаций составляет 44,12%, в то время как в группе с низким уровнем — в два раза ниже (21,88%); в остальных группах частота данного аллеля находится в пределах 23—36%.

Белок XRCC1 принимает участие в эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), взаимодействуя с другими ферментами этой системы. Полиморфизм в гене XRCC1 является фактором риска развития разных форм онкопатологии. Однако даже при метаанализах ассоциации полиморфных вариантов этого гена с онкологическими заболеваниями в одних случаях подтверждаются [17], в других — нет [16]. Показано, что аллель 399Gln (аллель А) гена XRCC1 ассоциирован с высоким уровнем микроядер [14] и повышенным уровнем разрывов ДНК, т.е. снижением способности фермента репарировать повреждения ДНК [18, 23]. В нашем исследовании не установлено влияние данной замены на уровень микроядер.

По SNP rs1042522 в гене TP53 в подгруппах с высокими уровнями хромосомных aberrаций, анеуплоидии, микроядер гомозиготы СС не выявлены. В других подгруппах индивидов их частота не превышает 12,12%. В разных подгруппах разброс частот альтернативных гомозигот и гетерозигот составляет около 20% (табл. 5). Статистически значимых различий между сравниваемыми подгруппами не выявлено.

Белок p53, кодируемый геном TP53, является опухолевым супрессором, индуцирующим остановку клеточного роста или апоптоз в зависимости от физиологических обстоятельств и типа клеток. Кроме того, он вовлечён в контроль клеточного цикла как транс-активатор множества генов, участвующих в клеточном делении, апоптозе и репарации ДНК [6]. Количество p53 возрастает в трансформированных клетках разных типов. Герминативное носительство мутаций в гене TP53 в 80% случаев приводят к формированию четырех типов раковых новообразований: это рак молочной железы, саркома мягких тканей и костей, опухоли головного мозга и аденокарциномы [13, 24, 27]. На оставшиеся 20% приходится множество более редких опухолей. В целом же, примерно в 60% всех раковых образований выявляются мутации в гене TP53, приводящие либо к инактивации гена, либо к нарушению функций кодируемого им белка p53. Кодон 72 расположен в пролин-богатом регионе белка и замена аминокислоты может менять структуру SH3-связывающего домена [10]. Этот кодон является чрезвычайно варибельным, в нем описано 5 несинонимичных нуклеотидных замен, и только замена Arg (дикий тип) на Pro является полиморфным вариантом, остальные (замены на Cys, Gly, His, Leu) представляют собой мутации [15]. Имеются данные, что полиморфный вариант TP53 Pro72 (по сравнению с диким типом — Arg72)

снижает апоптотическую функцию белка, а также связан с увеличением радиочувствительности клетки [10].

По замене в гене Cyp2C19 (rs4244285) в подгруппах с низкими уровнями анеуплоидии и микроядер, а также в подгруппе с высоким уровнем хромосомных aberrаций не был зарегистрирован генотип AA (табл. 5). Однако частоты гетерозигот и альтернативных гомозигот в этих группах неодинаковы и варьируют для GA от 11,76% (высокий уровень хромосомных aberrаций) до 39,13% (низкий уровень анеуплоидии). В гене Cyp2C19 частота мажорного аллеля w находилась в границах от 80,43% (подгруппа с низким уровнем анеуплоидии) до 94,12% (подгруппа с высоким уровнем хромосомных aberrаций). Статистически значимые различия между сравниваемыми подгруппами не зарегистрированы.

Гены детоксикации ксенобиотиков, которые играют важную роль в индивидуальной чувствительности к воздействию различных токсических агентов окружающей среды, представляют большой интерес с точки зрения феномена индивидуальной радиочувствительности. Группа ферментов I фазы детоксикации ксенобиотиков представлена семейством цитохромов P-450, которое включает в себя более 60 генов [21, 25]. Фермент CYP2C19 метаболизирует широкий спектр лекарственных препаратов [33]. Основной генетический дефект, найденный у так называемых «медленных» метаболизаторов (S)-мефенитоина — это точковая замена G на A в пятом экзоне в положении 681 гена CYP2C19 (CYP2C19*2), приводящая к появлению aberrантного сайта сплайсинга [8]. Этот полиморфизм обуславливает нарушение способности цитохрома P450 метаболизировать антиэпилептический препарат (S)-мефенитоин, омепразол, прогуанил, некоторые барбитураты и ряд других соединений [31, 38].

Делеционный генотип («») в гене GSTT1 (табл. 5) в сравниваемых подгруппах встречался с частотами в интервале от 5,88% (подгруппа с высоким уровнем хромосомных aberrаций) до 25,00% (подгруппа с высоким уровнем микроядер). Генотип с делецией в гене GSTM1 регистрировался с высокой частотой (от 40 до 57% в разных подгруппах). По сочетанию генотипов GSTT1/GSTM1 редкими являются «-/» и «-/-». Частота сочетания «-/» варьирует от 0% (в подгруппах с высокими уровнями хромосомных aberrаций и анеуплоидии) до 21,74% (в подгруппе с низким уровнем анеуплоидии). Частота сочетания «-/-» находится в пределах 3,03—9,52%. В большинстве случаев преобладающим является сочетание «+/» (от 30,43 до 56,67%). Между группами с высоким и низким уровнем анеуплоидии выявляются статистически значимые различия по генотипическим комбинациям GSTT1/GSTM1: $\chi^2=8,78$, $p=0,032$.

Глутатион-S-трансферазы GSTT1 и GSTM1 относятся к группе ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, на которой различными гидролазами и трансферазами проводится нейтрализация токсичных продуктов первой фазы детоксикации. Глутатион-S-трансферазы играют основную роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, алкилированию бел-

ков, негативному воздействию свободных радикалов, приводящих к предотвращению повреждений ДНК [1]. Мутации генов семейства *GST* вовлечены в патогенез различных форм рака и являются факторами риска развития ряда заболеваний. «Нулевые» генотипы *GSTM1* или *GSTT1* (полная делеция гена), как правило, ассоциированы с повышенной частотой сестринских хроматидных обменов (СХО), по сравнению с нормальным генотипом при воздействии таких химических соединений, как 1,2-эпоксид-3-бутен и диэпоксидбутан [11]. «Нулевой» *GSTM1* генотип обуславливает также увеличение частоты хромосомных aberrаций хроматидного типа [30]. У индивидов с сочетанием гомозигот по «нулевым» аллелям генов *GSTM1* и *GSTT1* описана повышенная частота aberrаций хромосомного типа при воздействии тех же соединений. Для гомозиготных по «нулевому» аллелю генов *GSTM1* и *GSTT1* индивидов при курении характерны повышенная частота хромосомных aberrаций и высокий риск развития рака легкого [5, 7]. В то же время, в ряде других исследований отмечаются противоположные результаты: не подтверждаются ассоциации рассмотренных генотипов с хромосомными aberrациями и риском развития какой-либо формы рака [26, 37], в некоторых исследованиях [39] указывается даже протективная в отношении онкопатологии роль «нулевого» генотипа по *GSTM1*.

Таким образом, в ходе выполнения настоящего исследования были изучены полиморфные варианты в семи генах. Выбранные для исследования гены кодируют белки, относящиеся к системам репарации ДНК, метаболизма ксенобиотиков, регуляции клеточного цикла и пролиферации. Для большинства исследованных локусов наблюдались отличия по распространённости генотипов между сравниваемыми подгруппами, различающимися по частоте встречаемости хромосомных нарушений разных типов. Однако статистически значимые отличия были выявлены только для полиморфного варианта в гене *MLH1* (при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций), а также для комбинаций генотипов *GSTT1/GSTM1* (между подгруппами с разным уровнем анеуплоидии). Частоты аллелей между сравниваемыми группами варьируют в меньшей степени; статистически значимые различия зарегистрированы только между подгруппами с разным уровнем хромосомных aberrаций (полиморфный вариант в гене *XRCC1*).

Специфика формирования выборок для настоящего исследования, а именно трудоемкость предварительного детального цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования, обусловила, в конечном итоге, тот факт, что большинство выделенных групп с различными генотипами оказались малочисленными. Это существенно снижает вероятность получения статистически значимых отличий между обследованными группами и не позволяет однозначно оценить роль как отдельно взятых аллелей и генотипов, так и их сочетаний в формировании тех или иных хромосомных нарушений. Тем не менее, полученные данные указывают на возможность вовлечения отдельных

локусов генома в формирование индивидуальной чувствительности организма к воздействию плотно-ионизирующего излучения. Для подтверждения полученных результатов об ассоциации некоторых изученных полиморфных вариантов с уровнем хромосомных нарушений и высказанных предположений о возможной вовлечённости других полиморфизмов в риск возникновения цитогенетических нарушений необходимо продолжение исследований как на более обширных выборках, так и у представителей других этнических групп.

Список литературы

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Ивашенко Т.Э. и др. Геном человека и гены «предрасположенности». (Введение в предиктивную медицину). — СПб.: Интермедика, 2000. — 272 с.
2. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Тахауов Р.М., Карпов А.Б. Молекулярно-генетические подходы, применяемые для оценки воздействия радиации на геном, и индивидуальная радиочувствительность человека // Сибирский медицинский журнал. — 2003. — №5. — С. 78–83.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
4. Тимошевский В.А., Лебедев И.Н., Васильев С.А. и др. Хромосомный и цитомный анализ соматических клеток работников радиохимического производства с инкорпорированным ^{239}Pu // Радиационная биология. Радиозология. — 2010. — Т. 50, №6. — С. 672–680.
5. Abdel-Rahmad S.Z., Ei-Zein R.A., Zwishchenberder J.B. Association of the NAT110 genotype with increased chromosome aberrations and higher lung cancer risk in cigarette smokers // Mutat. Res. — 1998. — Vol. 398. — P. 43–54.
6. An W., Kim J., Roeder R.G. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53 // Cell. — 2004. — Vol. 117. — P. 735–748.
7. Conforti-Froes N., Ei-Zein, Abdel-Rahman S.Z. et al. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers // Mutat. Res. — 1997. — Vol. 379. — P. 53–59.
8. De Morais S.M.F., Wilkinson G.R., Blaisdell J. et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in human // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, №22. — P. 15419–15422.
9. De Vos M., Hayward B.E., Picton S. et al. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 74. — P. 954–964.
10. Dumont P, Leu JI, Della P.A.C. 3rd et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential // Nat. Genet. — 2003. — Vol. 33. — P. 357–365.
11. Falck G.C., Hirvonen A., Scsrpato R. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GCTM1, GCTT1, and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers // Mutat. Res. — 1999. — Vol. 441. — P. 225–237.
12. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a «cytome» assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // Mutat Res. — 2006. — Vol. 600. — P. 58–66.
13. Frebourg T., Barbier N., Yan Y.-X. et al. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome // Am. J. Hum. Genet. — 1995. — Vol. 56. — P. 608–615.
14. Guven M., Guven G.S., Oz E. et al. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency // Heart Vessels. — 2007. — Vol. 22. — P. 355–360.
15. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04637>.

16. Hu Z., Ma H., Chen F. et al. *XRCC1* Polymorphisms and cancer risk: A Meta-analysis of 38 Case-Control Studies // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* — 2005. — Vol. 14. — P. 1810—1818.
17. Hung R.J., Hall J., Brennan P., Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review // *Am. J. Epidemiol.* — 2005. — Vol. 162. — P. 925—942.
18. Iarmarcovai G., Sari-Minodier I., Chaspoul F. et al. Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms // *Mutagenesis.* — 2005. — Vol. 20. — P. 425—432.
19. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. // *Cell.* — 2006. — Vol. 126. — P. 297—308.
20. Miyaki M., Nishio J., Konishi M. et al. Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome // *Oncogene.* — 1997. — Vol. 15. — P. 2877—2881.
21. Nebert D.V., Garvan M.J. Ecogenetics: from biology to health // *Toxicol. Indust. Hlth.* — 1997. — Vol. 13. — P. 163—192.
22. Pan X.-M., Yang W.-Z., Xu G.-H. et al. The association between *MLH1* -93G>A polymorphism of DNA mismatch repair and cancer susceptibility: a meta-analysis // *Mutagenesis.* — 2011. — Vol. 26. — P. 667—673.
23. Qu T., Morii E., Oboki K., Lu Y., Morimoto K. Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human *XRCC1* // *Cancer Lett.* — 2005. — Vol. 221. — P. 91—95.
24. Ribeiro R.C., Sandrini F., Figueiredo B. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2001. — Vol. 98. — P. 9330—9335.
25. Roberts R., Joyce P., Kennedy M.A. Rapid and comprehensive determination of cytochrome P450 CYP2D6 poor metabolizer genotypes by multiplex polymerase chain reaction // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 16, №1. — P. 77—85.
26. Rossi A.M., Hansteen I.-L., Skjelbred C.F. et al. Association between frequency of chromosomal aberration and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* // *Environmental Health Perspectives.* — 2009. — Vol. 117. — P. 203—208.
27. Rutherford J., Chu C.E., Duddy P.M. et al. Investigations on a clinically and functionally unusual and novel germline p53 mutation // *Br. J. Cancer.* — 2002. — Vol. 86. — P. 1592—1596.
28. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P. et al. Direct visualization of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha // *Mol Cell.* — 2008. — Vol. 29. — P. 112—121.
29. Sasaki M.S., Norman A. Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes // *Nature.* 1967. — Vol. 214. — P. 502—503.
30. Scatpato R., Hirvonen A., Migliore L. et al. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers // *Mutat. Res.* — 1997. — Vol. 389. — P. 227—235.
31. Schwab M., Schaeffeler E., Klotz U. et al. *CYP2C19* polymorphism is a major predictor of treatment failure in white patients by use of lansoprazole-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 2004. — Vol. 76. — P. 201—209.
32. Spurdle A.B., Webb P.M., Purdie D.M. et al. Polymorphisms at the glutathione S-transferase *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* loci: risk of ovarian cancer by histological subtype // *Carcinogenesis.* — 2001. — Vol. 22. — P. 67—72.
33. Thum T., Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart // *Lancet.* — 2000. — Vol. 355. — P. 979—983.
34. Trojan J., Zeuzem S., Randolph A. et al. Functional analysis of *hMLH1* variants and HNPCC-related mutations using a human expression system // *Gastroenterology.* — 2002. — Vol. 122. — P. 211—219.
35. van Oers J.M.M., Roa S., Werling U. et al. *PMS2* endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance // *PNAS.* — 2010. — Vol. 107. — P. 13384—13389.
36. Xu B., Kim S., Lim D., Kastan M.G. Two molecularly distinct G2/M checkpoints are induced by ionizing irradiation // *Mol. And Cell. Biol.* — 2002. — Vol. 22, №4. — P. 1049—1059.
37. Xu X., Wiencke J.K., Niu T. et al. Benzene Exposure, Glutathione S-transferase theta homozygous deletion, and sister chromatid exchanges // *Am. J. Ind. Med.* — 1998. — Vol. 33. — P. 157—163.
38. Yang H.G., Wong L. P., Lee T. C. et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in healthy Malaysian subjects // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 58, №3. — P. 332—335.
39. Yu K.D., Di G.H., Fan L. et al. A functional polymorphism in the promoter region of *GSTM1* implies a complex role for *GSTM1* in breast cancer // *FASEB J.* — 2009. — Vol. 23. — P. 2274—2287.

Associations between polymorphic variants of DNA repair and metabolism of xenobiotics genes and chromosome aberration level in human lymphocytes

Babushkina N.P., Kucher A.N., Lebedev I.N., Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Bragina E.Yu., Sukhanova N.N., Torkhova N.B., Yakovleva Yu.S.

Institute of Medical Genetics SB RAMS,
634050, Tomsk, Naberezhnaya r.Ushaiki, 10, tel. (3822) 513146, fax (3822) 513744, e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru

We present data concerning frequencies of polymorphic variants of DNA repair (*MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321), *XRCC1* (rs25487)), cell cycle control (*TP53* (rs1042522)) and metabolism of xenobiotics (*Cyp2C19* (rs4244285), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del)) genes in cohort of plutonium workers and control group. Also, subgroups with various levels of chromosome abnormalities are considered (with high and low levels of chromosome aberrations, aneuploidy and micronuclei). There were no significant differences of allele and genotype frequencies between group of plutonium workers and control group. However, significant differences of rs1799977 *MLH1* genotype frequencies was observed between subgroups with different levels of chromosome aberrations ($p=0.047$) and *GSTT1/GSTM1* genotype frequencies between subgroups with high and low levels of aneuploidy ($p=0.032$). There were also differences between subgroups regarding to genotype frequencies at other loci, but insignificant. Allele frequencies differences were registered only in *XRCC1* (rs25487) between subgroups with different levels of chromosome aberrations ($p=0.039$).

Key words: individual radiosensitivity, gene polymorphism, DNA repair, chromosome aberrations, micronuclei