

**На правах рукописи**



**ЛАРИОНОВ Алексей Викторович**

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА И ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ  
КЛАСТОГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ,  
ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ РАДОНА В УСЛОВИЯХ  
ПРОЖИВАНИЯ И ОБУЧЕНИЯ**

**03.01.01 – Радиобиология**

**03.02.07 – Генетика**

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2012**

**Работа выполнена на кафедре генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Кемеровский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации**

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Дружинин Владимир Геннадьевич**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Рубанович Александр Владимирович**  
доктор биологических наук, профессор  
**Гераськин Станислав Алексеевич**

**Ведущая организация:** **Федеральное государственное учреждение науки Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства РФ**

Защита диссертации состоится «16» февраля 2012 г. в 15.00 на заседании Диссертационного Совета Д 501.001.65 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 12, МГУ, Биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзывы просим присылать по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 12, МГУ, Биологический факультет, Веселовой Татьяне Владимировне. Факс (495) 939-11-15.

Автореферат разослан «11» января 2012 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета,  
доктор биологических наук

Веселова Т.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Поддержание стабильности генетического материала является необходимым условием функционирования любого организма. Высокий уровень повреждения ДНК вызывает увеличение частоты мутаций и структурных дефектов хромосом, что может приводить к нарушению процессов деления клетки, транскрипции ДНК и экспрессии генов, при этом увеличивается риск развития онкологических заболеваний в данных экологических условиях. Чувствительность генома определяется механизмами клеточной защиты, деактивирующими генотоксиканты или восстанавливающими целостность генетического материала (репарация ДНК) [Гончарова и др., 2003; Засухина, 2005; Рубанович, 2007]. Система репарации ДНК является первым барьером на пути возникновения геномной нестабильности и канцерогенеза под действием мутагенов [Hu et al., 2001; Au et al., 2003; Berndt et al., 2007; Фрейдин и др., 2008; Batar et al., 2009].

Объектом данного исследования является чувствительность генома человека в условиях длительного воздействия повышенных концентраций радона. Считается, что радиочувствительность определяется, главным образом, генетическим полиморфизмом компонентов систем клеточной защиты [Hu et al., 2001; Barnett et al., 2009]. Известно, что гены репарации участвуют в формировании индивидуальной чувствительности к радиационному воздействию [Duell et al., 2000; Кузнецов и др., 2006; Skjelbred et al., 2006; Vodichka, 2007; Сальникова, 2011], ввиду этого они представляются основными кандидатами на роль наследственных факторов индивидуальной чувствительности к радону. В литературе имеются единичные работы, посвященные анализу взаимосвязи полиморфизма генов репарации с воздействием радона. В исследовании финских авторов [Kiuru et al., 2005] была показана ассоциация аллельных вариантов *XRCC1* 280His и *XRCC3* 241Met с показателями хромосомных нарушений в выборке индивидов, подверженных экспозиции радоном в бытовых условиях.

Проблема оценки генотоксического (в т.ч. – кластогенного) воздействия радона недостаточно изучена и имеет важное социально-экономическое значение, так как затрагивает большие группы населения. Особый интерес представляет оценка

последствий облучения населения радоноопасных территорий, к числу которых можно отнести Кемеровскую область [Сорокина, 2006]. У шахтеров урановых или иных шахт, подверженных воздействию высоких доз радона, уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови существенно превышает контрольные значения [Popp et al., 2000; Meszaros et al., 2004; Bilban, Jakopin, 2005], при этом доказана корреляция частоты хромосомных нарушений с риском развития злокачественных новообразований [Smerhovsky et al., 2002].

Исследования последнего времени показали взаимосвязь между воздействием низких концентраций радона в жилых помещениях и частотой возникновения рака легкого [Forastiere et al., 1998; Vochicchio et al., 2005; Darby et al., 2005]. При этом данные литературы о генотоксических эффектах радона у жителей, экспонированных в бытовых условиях, противоречивы [Bridges et al., 1991; Cole et al., 1996; Vauchinger et al., 1996; Lindholm et al., 1999]. В ряде исследований показана эффективность использования рутинных цитогенетических тестов при оценке кластогенных эффектов воздействия сверхнормативных концентраций радона в воздухе жилых или общественных помещений [Bilban, Vaupoti, 2001; Oestreicher et al., 2004; Дружинин, Ахматьянова и др., 2009].

**Цель работы:** Исследовать кластогенные эффекты как показатели чувствительности генома к воздействию сверхнормативных доз радона у экспонированных детей и подростков, оценить значение 10 однонуклеотидных замен в генах репарации ДНК как возможных факторов наследственной индивидуальной радиочувствительности.

#### **Задачи работы.**

1. Изучить комплекс радиационных и химических параметров окружающей среды в местах проживания и обучения детей и подростков опытной группы. Выявить преобладающий генотоксический фактор, индуцирующий кластогенные эффекты в лимфоцитах обследованных.
2. Определить уровень и спектр хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови детей и подростков, подверженных хроническому воздействию сверхнормативных концентраций радона.

3. Исследовать ассоциации аллельных вариантов генов репарации ДНК с частотами цитогенетических повреждений, индуцированных хроническим действием генотоксических факторов, включая сверхнормативное излучение радона.

4. Оценить значимость сочетаний аллельных вариантов генов репарации ДНК для формирования признака индивидуальной чувствительности человека к длительному генотоксическому воздействию малой интенсивности.

**Научная новизна.** Впервые проведено исследование частоты и спектра кластогенных эффектов у детей и подростков, длительное время проживающих в условиях воздействия естественного источника радиоактивности – газа радона. В результате поиска маркеров индивидуальной чувствительности к воздействию радона впервые установлена роль гена репарации ДНК *ADPRT* в развитии цитогенетических аномалий. Установлено, что наличие сочетания аллельных вариантов *APE1* 148Glu, *ADPRT* 762Ala, *hOGG1* 326Cys, *XpG* 1104His связано с увеличением чувствительности генома человека к хроническому воздействию генотоксикантов малой интенсивности.

**Практическая значимость.** Результаты работы служат основанием для разработки рекомендаций по снижению генотоксического и проканцерогенного риска в популяциях человека, подверженных длительному воздействию излучений радона.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты диссертационного исследования получены в рамках выполнения НИР по гранту РФФИ, 10-04-00497-а; государственного контракта ФЦНТП №16.512.11.2062. По итогам работы опубликовано информационно-методическое письмо «Опасность возникновения хромосомных нарушений у школьников при наличии высокого содержания радона в зданиях общеобразовательных учреждений». Федеральной службой по интеллектуальной собственности и товарным знакам выдан патент на изобретение «Способ определения индивидуальной чувствительности генома человека к воздействию радона по комплексу генетических маркеров» (№ 2415427).

**Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации.** Автором выполнены основные этапы молекулярно-генетического

исследования аллельных вариантов генов репарации (выделение ДНК, постановка ПЦР), включая статистический анализ и обработку результатов, а также цитогенетический анализ 72 образцов лимфоцитов крови (39%) (2007 – 2009 гг.).

**Положения, выносимые на защиту:**

- Ведущим генотоксическим фактором, действующим в условиях проживания и обучения детей и подростков, является радон и продукты его распада.
- Длительное воздействие сверхнормативных концентраций радона вызывает выраженные кластогенные эффекты в лимфоцитах крови у детей и подростков.
- Аллельный вариант гена репарации *ADPRT 762Ala*, а также сочетания аллельных вариантов *APE1 148Glu*, *ADPRT 762Ala*, *hOGG1 326Cys*, *XpG 1104His* ассоциированы с повышенной частотой аберраций в лимфоцитах детей и подростков, экспонированных радоном.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования доложены на III (XXXV) Международной научно-практической конференции (КемГУ, Кемерово 2008); 6<sup>th</sup> Conference of the Pan African Environmental Mutagen Society (Cape Town, 2008); Всероссийской научно-практической конференции «Научные проблемы использования и охраны природных ресурсов России» (Самара, 2009); V Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009); 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (Firenze, Italy, 2009); Международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды» (Сыктывкар, 2009).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 132 страницах и состоит из введения, 3 глав и выводов. Работа содержит 16 таблиц и 12 рисунков. Список литературы включает 235 работ, 57 опубликованы в отечественной печати, 178 – в зарубежной.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Материалы исследования.** Опытная группа для исследования хромосомных aberrаций в культурах лимфоцитов периферической крови и аллельных вариантов генов системы репарации ДНК была сформирована в 2004, 2007 и 2009 гг. из воспитанников школы-интерната г. Таштагол, являющегося административным центром горного таежного района Кемеровской области. Всего обследовано 76 мальчиков в возрасте от 8 до 18 лет (средний возраст  $13,86 \pm 0,27$ ) и 73 девочки в возрасте от 9 до 18 лет (средний возраст –  $14,26 \pm 0,28$  лет). Этнический состав выборки: европеоиды – 22 (15%), шорцы – 82 (55%), метисы – 45 (30%). В качестве группы контроля изучена выборка детей и подростков, проживающих в сельских населенных пунктах Кемеровской области в условиях отсутствия выраженного загрязнения окружающей среды по радиационным и химическим показателям: с. Красное Ленинск-Кузнецкого района и с. Пача Яшкинского района. Всего в контрольной группе обследовано 37 мальчиков в возрасте от 9 до 18 лет (средний возраст  $13,73 \pm 0,35$  лет) и 57 девочек в возрасте от 9 до 17 лет (средний возраст  $14,33 \pm 0,27$  лет). Сбор анамнестических данных проводили путем устного анкетирования и анализа медицинских карт (форма 025/у-87). Учитывали наличие хронических и инфекционных заболеваний, курение, прием лекарственных препаратов и рентгенодиагностические процедуры за 3 месяца до сбора материала. На каждого обследуемого ребенка был оформлен протокол информированного согласия, подписанный родителями либо лицами, осуществляющими опеку несовершеннолетних.

Для оценки радиационных и химических параметров среды в исследуемых населенных пунктах были выполнены комплексные радиологические, физико-химические и биоиндикаторные исследования, детально описанные в публикации [Дружинин и др., 2010]. Радиологические исследования выполнены в лаборатории радиационного контроля ООО «Кузбасский СКАРАБЕЙ». Содержание тяжелых металлов в почве исследовалось сотрудниками испытательного центра по агрохимическому обслуживанию «Кемеровский». Результаты биотестирования образцов почв, воды и воздуха в тестах Эймса и учета доминантных летелей у

дрозофилы любезно предоставлены сотрудниками НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина д.б.н. Ф.И. Ингель и к.б.н. Л.В. Ахальцевой.

**Цитогенетические методы.** Генотоксические эффекты изучали методом учета хромосомных aberrаций (ХА) в кратковременных культурах лимфоцитов периферической крови. Подготовку препаратов метафазных хромосом осуществляли с использованием стандартного полумикрометода [Hungerford, 1965]. Отбор метафаз и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям [Бочков, 1971; Bucton, Evans, 1993]. Учитывали четыре основные категории ХА: одиночные и парные ацентрические фрагменты, обмены хроматидного и хромосомного типа. В число обменов хромосомного типа включали дицентрические, кольцевые хромосомы и атипичные моноцентрики. Ахроматические пробелы в число aberrаций не включали и учитывали отдельно. Отдельно, в качестве мультиабберантных клеток (МАК), регистрировали метафазы, содержащие не менее 5 точек разрывов хромосом.

**Молекулярно-генетические методы.** Выделение ДНК проводили с использованием реактива «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех»). Типирование аллельных вариантов генов репарации ДНК осуществляли методом «SNP-экспресс», разработанным НПФ «Литех» (г.Москва). Исследовали 10 однонуклеотидных замен в 8 генах репарации: *APE* (апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1) Asp148Glu (rs1130409), *XRCC1* (комплементационная группа репарации радиационных повреждений ДНК) Arg194Trp (rs1799782), *XRCC1* Arg280His (rs25489), *XRCC1* Arg399Gln (rs25487), *hOGG1* (оксогуанин гликозилаза 1) Ser326Cys (rs1052133), *ADPRT* (аденозиндифосфатрибозилтрансфераза) Val762Ala (rs1136410), *XpC* белок распознавания повреждений ДНК) Lys939Gln (rs2228001), *XpD* (АТФ-независимая хеликаза) Lys751Gln (rs13181), *XpG* Asp1104His (rs17655), *NBS1* (нибрин) Glu185Gln (rs1805794).

**Методы статистической обработки.** Статистическую обработку осуществляли с помощью IBM PC, средствами программы StatSoft Statistica 6.0. Сравнение групп по качественным признакам и проверку на соответствие равновесию Харди-

Вайнберга проводили с помощью критерия  $\chi^2$ , с поправкой Йетса для таблиц 2x2 [Гланц, 1998]. Для количественных показателей рассчитывали средние значения ( $\mu$ ) и стандартные ошибки ( $s$ ) [Животовский, 1991]. Распределение частот aberrаций сравнивали с нормальным (методом Колмогорова-Смирнова); было установлено, что распределение всех изучаемых цитогенетических параметров отличалось от нормального. На основании этого использовали методы непараметрической статистики: ранговый U-тест Манна-Уитни [Закс, 1976] для парного сравнения групп и тест Краскела-Уоллиса для сравнения 3 групп. В качестве факторов, влияющих на частоты ХА, предполагались наследственные варианты генов репарации.

Ассоциации полиморфизмов с исследованными цитогенетическими показателями проверяли с помощью теста Краскела-Уоллиса. Для генов, показавших значимые результаты, проводили парное сравнение генотипов в тесте Манна-Уитни и исследование ассоциаций гаплотипов с частотой aberrаций (расчет отношения шансов в программе SNPStat) (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) [Sole et al., 2006]. Коррекцию полученных результатов с учетом множественных сравнений проводили с помощью процедуры FDR (False Discovery Rate) [Benjamini, Yekutieli, 2001]. Корреляцию между числом аллелей «предрасположенности» по 4 локусам и числом хромосомных aberrаций рассчитывали с использованием коэффициента корреляции Пирсона для рангов, для выборок более 50 человек также рассчитывали значение критерия Стьюдента [Гланц, 1998].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Частота и спектр цитогенетических нарушений в обследованной выборке.**

Показатель частоты ХА отражает степень повреждения ДНК генотоксикантами и эффективность процессов репарации, устраняющих эти повреждения. Спектр aberrаций при этом может модифицироваться как характером генотоксического воздействия, так и дефицитом активности того или иного механизма репарации, специфичного к определенному типу повреждений. В ходе исследования были рассчитаны значения общего числа aberrаций и их отдельных типов. Частота ХА

значимо выше в опытной группе по сравнению с контролем (табл. 1) по показателям числа aberrаций на 100 клеток, доле клеток с одиночными и парными фрагментами. Обмены хромосомного типа (маркеры радиационного воздействия) также чаще наблюдались в опытной группе по сравнению с контролем ( $0,2 \pm 0,04$  и  $0,04 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ). Вместе с тем, именно одиночные фрагменты составляют большую часть нарушений (75%) и вносят решающий вклад в общую картину повреждений хромосом. Также в лимфоцитах воспитанников школы-интерната зарегистрированы 11 мультиабберантных клеток (rogue cells, МАК), которые представляют собой редкие объекты ( $1/13000 - 1/30000$  метафаз), «нагруженные» большим количеством aberrаций хромосомного типа [Awa, Neel, 1986]. Природа и клиническое значение МАК остаются невыясненными, однако некоторые авторы связывают возможность индукции этих объектов с воздействием плотноионизирующего излучения альфа-частицами [Domracheva et al., 2000; Попова и др., 2004].

Таблица 1. Хромосомные aberrации ( $\mu \pm s$ ) в экспонированной радоном выборке и в контрольной группе

Группа / год исследования	N	Изучено метафаз	Всего aberrаций на 100 клеток	Число aberrаций на 100 клеток			
				фрагменты		обмены	
				Одиночные	Парные	Хроматидного типа	Хромосомного типа
Таштагол / 2004 – 2009	149	27850	$5,38 \pm 0,21^*$	$3,93 \pm 0,19^*$	$1,23 \pm 0,07^*$	$0,02 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,04^*$
Контроль / 2009	94	18800	$3,20 \pm 0,19$	$2,38 \pm 0,14$	$0,80 \pm 0,09$	$0,02 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$

Примечание.  $\mu$  – средняя частота,  $s$  – ст. ошибка средней. N – число обследованных в группе). Достоверные отличия (U-критерий Манна-Уитни) от значений контрольной группы: \* –  $p < 0,001$ .

Анализ популяционного уровня ХА требует оценки факторов, потенциально способных модифицировать цитогенетические эффекты. К их числу относят: пол и возраст [Rossner et al., 1998; Stephan, Pressl, 1999; Бочков и др., 2001], хроническую и инфекционную патологию, наличие вредных привычек (курение) [Tawn et al., 1989; Перминова и др., 1997; Bukvic et al., 2001; Celi, Akbas, 2005]. Влияния данных факторов, а также этнической принадлежности (шорцы, европеиды и потомки смешанных браков), на частоту aberrаций не было установлено.

Наличие выраженных кластогенных эффектов требует оценки условий проживания обследованных и поиска факторов, способных индуцировать цитогенетические нарушения в лимфоцитах. В табл. 2 сведены основные результаты физико-химических и радиологических исследований на территории школы-интерната. Показатели мощности экспозиционной дозы (МЭД) внешнего  $\gamma$ -излучения во всех изученных помещениях не различались и находились в пределах 0,14 – 0,2 мкЗв/ч, что не превышает нормируемых значений [Нормы радиационной безопасности (НРБ-99), 1999]. В пробах воды (водопроводной и питьевой) не было выявлено превышения регламентируемого уровня радионуклидов. Удельная эффективная активность проб почвенного грунта составила 100 Бк/кг, что соответствует средним величинам для почв Кузбасса [Сорокина, 2006]. В воздухе жилых и учебных помещений интерната было выявлено постоянное превышение содержания газа радона по сравнению с нормируемым значением в 200 Бк/м<sup>3</sup> [Крисюк, 1989]. Показатель ОА радона варьировал от 415 – 730 Бк/м<sup>3</sup> в зимнее время до 200 Бк/м<sup>3</sup> весной (среднее значение  $441 \pm 319$  Бк/м<sup>3</sup>). Расчеты усредненного показателя эквивалентной равновесной объемной активности (ЭРОА) радона (314,4 Бк/м<sup>3</sup>) показали, что условия постоянного пребывания в интернате обуславливают индивидуальную эффективную дозу ингаляционного облучения детей только за счет изотопов радона и их короткоживущих дочерних продуктов в воздухе  $\sim 20$  мЗв/год [Дружинин и др., 2010].

Также было проведено исследование содержание тяжелых металлов в почве (табл. 2), а также проведена проверка возможного мутагенного влияния химических загрязнителей путем биоиндикаторных исследований образцов воздушной пыли и

воды. Средние значения валовых и подвижных форм металлов в образцах почв находились в пределах ПДК, за исключением подвижных форм цинка (1,5 ПДК). Оценка показателя суммарной мутагенной активности (СМА) в тесте Эймса *Salmonella*/микросомы с использованием штаммов *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100, а также в тесте на индукцию доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в половых клетках дрозофилы показала, что ни один из исследуемых образцов не проявил мутагенной активности [Дружинин и др., 2010]. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что ведущим кластогенным фактором в этом горном районе является радиация, а с учетом результатов радиологических исследований – основным ее источником является сверхнормативное содержание радона в воздухе жилых и учебных помещений интерната.

Таблица 2. Характеристика радиационных и химических параметров окружающей среды на территории школы-интерната г. Таштагол

Содержание подвижных форм металлов в почве (мг/кг)	цинк	медь	кадмий	свинец	марганец	кобальт	никель	железо	хром
Среднее значение	37,2*	1,1	0,3	2,0	124,2	2,2	0,6	47,9	2,9
Допустимый уровень	23	3	0,3 <sup>#</sup>	6	140	4	5	–	6
Радиационные параметры	МЭД внешнего $\gamma$ -излучения, мкЗв/ч				Средняя удельная объемная активность радона, Бк/м <sup>3</sup>				
Среднее значение	0,17				441*				
Допустимый уровень	0,3				200				

Примечание. \* – превышение ПДК, <sup>#</sup> – ориентировочно допустимая концентрация

**Сравнительная характеристика полиморфизма генов репарации ДНК в исследуемых выборках.** Были рассчитаны частоты генотипов в опытной (3 этнических группы: шорцы, метисы и европеиды) и в контрольной группах (рис. 1 – 4). В опытной выборке отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, обусловленное недостатком гетерозигот, обнаружено для замены *XRCC1* Arg399Gln. В контрольной

группе отклонение от РХВ, обусловленное недостатком гетерозигот, выявлено по локусу *APE1*. Также избыток гетерозигот наблюдается по локусу *XpD*. Проведенный анализ частот генотипов в опытной и контрольной группе показал значительное повышение частот мажорных аллелей по замене *hOGG1 Ser326Cys* (0,35 – 0,40) в контрольной группе в сравнении с опытной группой в целом и группой шорцев в отдельности ( $p < 0,001$ ).

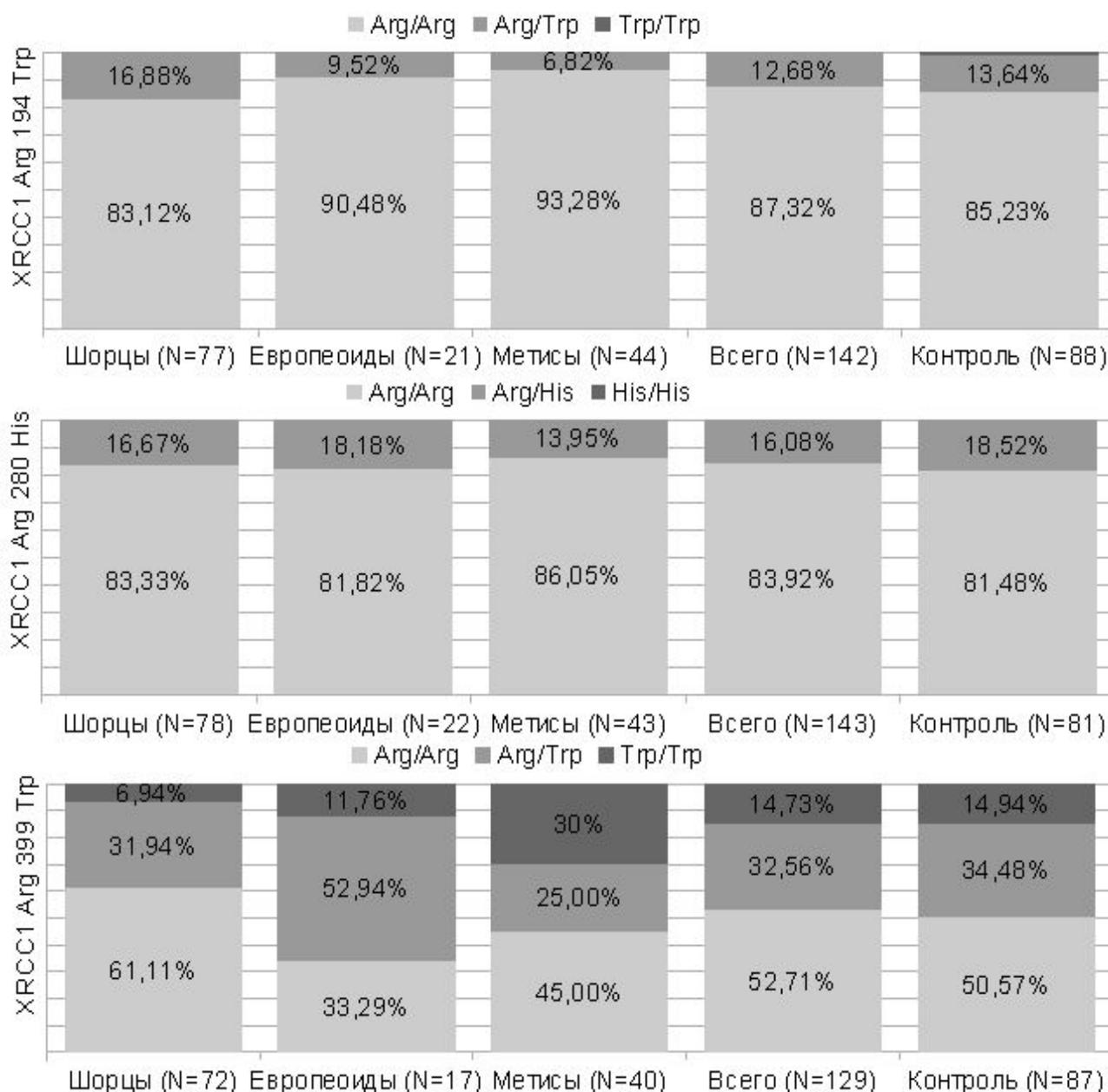


Рис. 1 Частота генотипов эксцизионной репарации оснований *XRCC1* в опытной и контрольной группах.

Примечание. Приведены частоты генотипов по каждому локусу в 3 этнических подгруппах опытной группы, суммарно в опытной группе и контрольной группе.

Аналогичная тенденция показана для замены *ADPRT* Val762Ala в контроле в сравнении с группой шорцев ( $p < 0,002$ ) и опытной группой в целом ( $p < 0,03$ ) (рис. 2). По другим локусам значимых различий между опытной и контрольной группой выявлено не было.

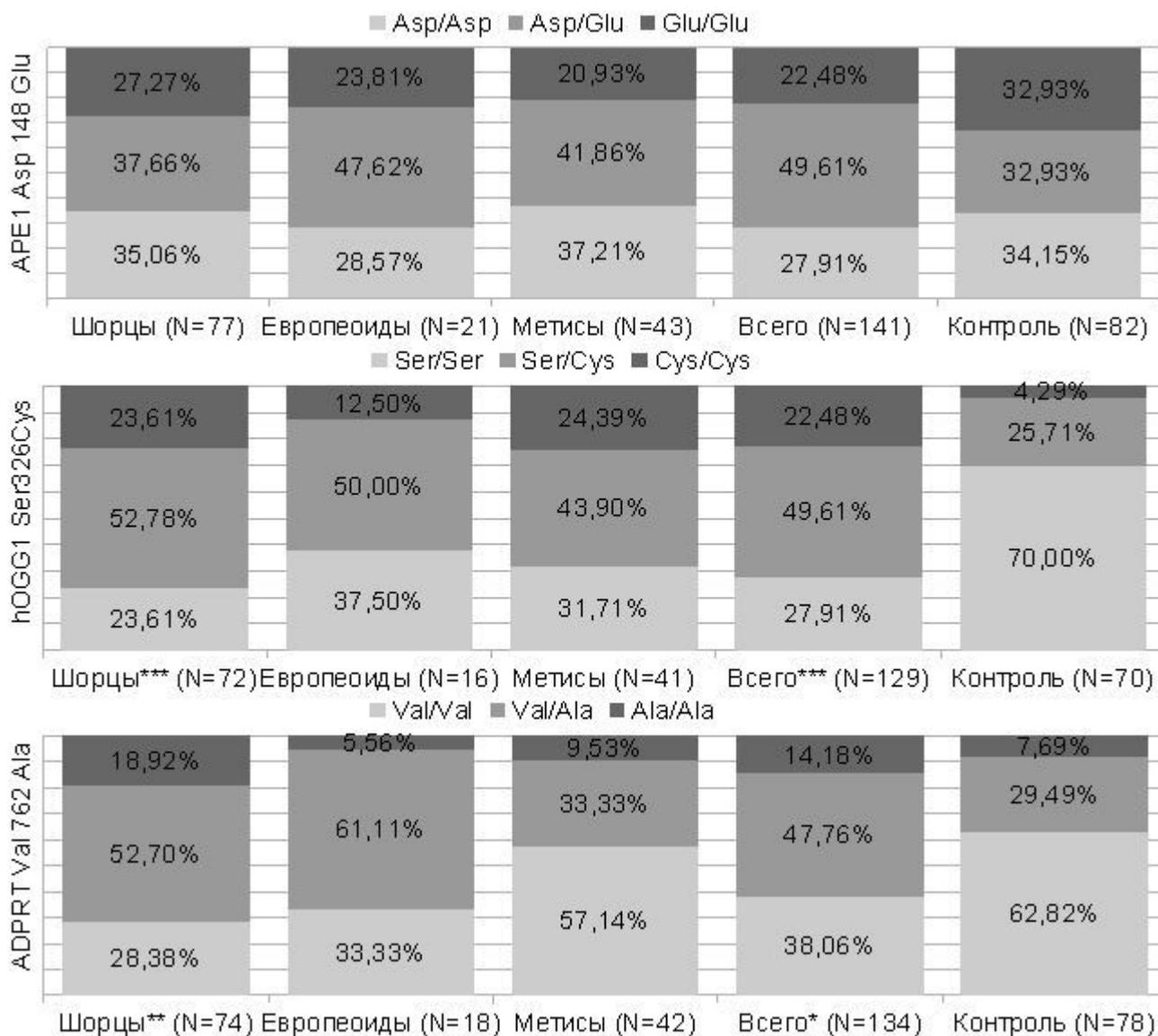


Рис. 2 Частота генотипов эксцизионной репарации оснований *APE1*, *hOGG1*, *ADPRT* в опытной и в контрольной группах.

Примечание. Приведены частоты генотипов по каждому локусу в 3 этнических подгруппах опытной группы, суммарно в опытной группе и контрольной группе, значимые отличия распределения генотипов в сравнении с контрольной группой

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

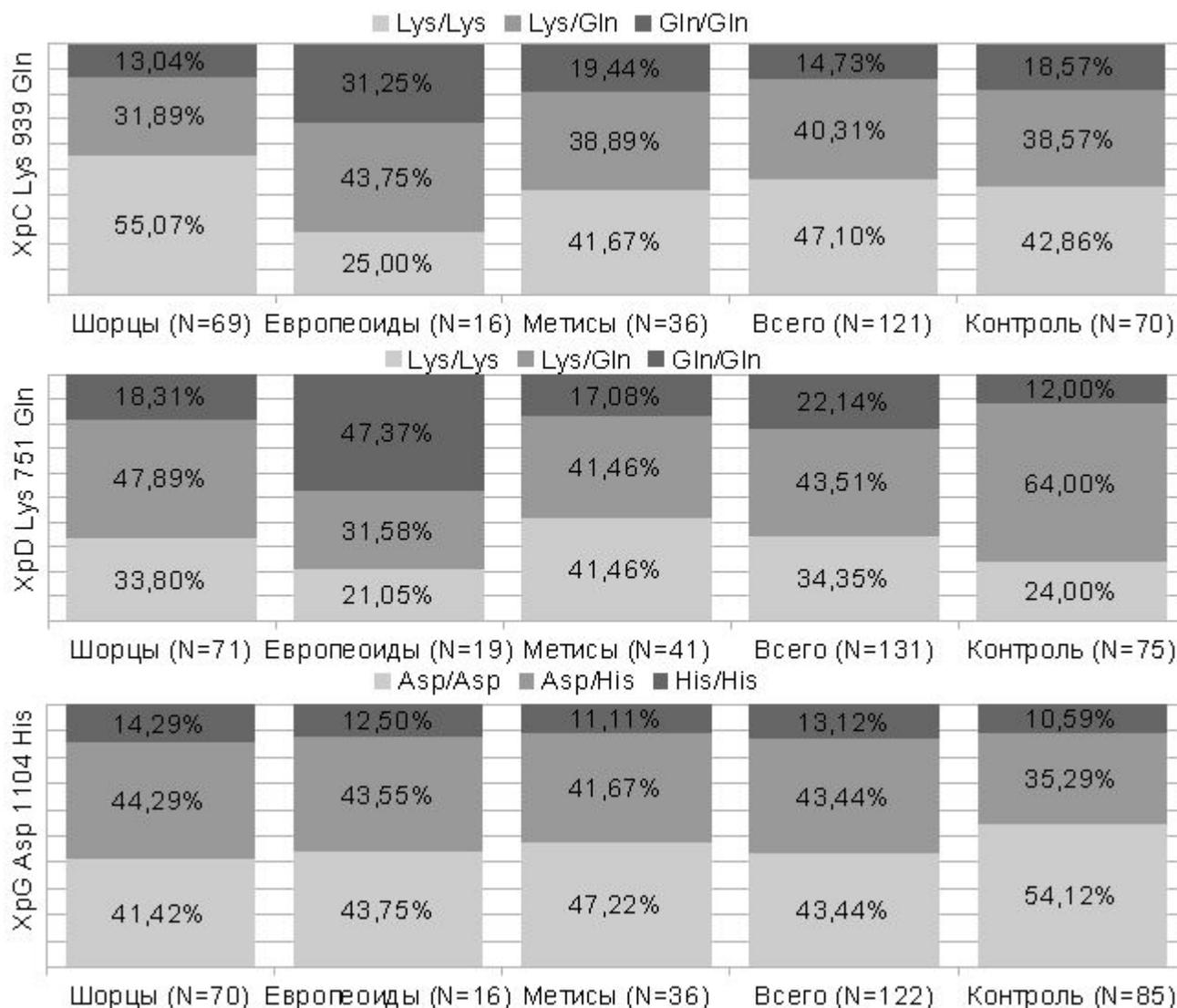


Рис. 3 Частота генотипов эксцизионной репарации нуклеотидов *XpC*, *XpD*, *XpG*, в опытной и в контрольной группах.

Примечание. Приведены частоты генотипов по каждому локусу в 3 этнических подгруппах опытной группы, суммарно в опытной группе и контрольной группе.

Высокая частота минорных аллелей *hOGG1* 326Cys и *ADPRT* 762Ala (0,45 – 0,55) характерна для монголоидных популяций [Sigimura et al., 1999; Nao et al., 2004; Zhang et al., 2005], для европеоидных популяций показана частота данных вариантов 0,15 – 0,20 [Vodicka et al., 2007]. За исключением двух указанных локусов, наши данные согласуются с частотами генотипов, полученными для европеоидов в исследованиях, проведенных в Италии, Финляндии, Чехии [Lunn, 1999; Tuimala, 2002; Vodicka, 2007]. Можно также отметить, что частота аллелей *XRCC1* 194 Trp и

*XRCC1* 280His значительно выше (0,20 – 0,30) в монголоидных популяциях в сравнении с европеоидами (0,05 – 0,10), что дает основание предполагать повышение частот этих вариантов у шорцев, однако установленные для шорцев и всей опытной группы частоты не отличаются от частот европеоидов. С учетом неоднородности этнического состава опытной группы проведено сопоставление частот генотипов в этнических группах (шорцы, европеоиды, метисы) с использованием критерия  $\chi^2$ , которое не выявило значимых межгрупповых различий. Частота минорных аллелей *hOGG1* 326Cys и *ADPRT* 762Ala повышена в группе воспитанников школы-интерната г. Таштагол по сравнению с контрольной выборкой. Данная особенность отражает смешанный этнический состав опытной группы, представленной монголоидами (шорцами), европеоидами и потомками смешанных браков.

Отсутствие межэтнических различий в частотах генотипов репарации позволило в дальнейшем рассматривать опытную группу как единую выборку для проведения ассоциативного исследования генотипов репарации с цитогенетическими показателями в условиях постоянного генотоксического воздействия радонового излучения.

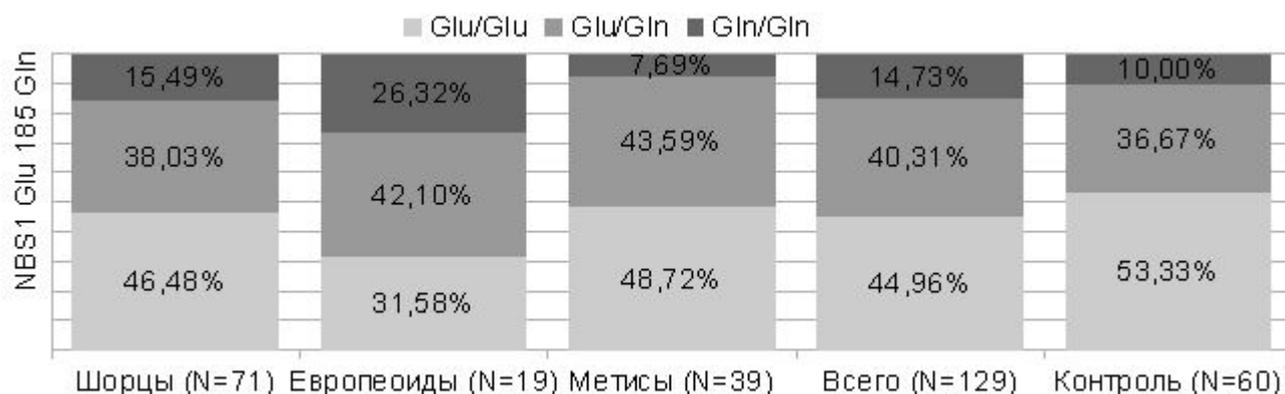


Рис. 4 Частота генотипов репарации двойных разрывов нуклеотидов *NBS1* в опытной и контрольной группах.

Примечание. Приведены частоты генотипов по каждому локусу в 3 этнических подгруппах опытной группы, суммарно в опытной группе и в контрольной группе.

**Хромосомные aberrации в лимфоцитах детей и подростков с различными генотипами по исследованным нуклеотидным заменам в генах репарации.** На начальном этапе с помощью теста Краскела-Уоллиса были выявлены генотипы,

ассоциированные с показателями суммарной частоты хромосомных aberrаций, одиночных фрагментов и обменов хромосомного типа. В отношении суммарной частоты aberrаций значимые ассоциации были обнаружены только для замены *hOGG1* Ser326Cys ( $H = 6,04$ ,  $p = 0,049$ ). Показатель частоты хроматидных фрагментов был ассоциирован с локусами *ADPRT* Val762Ala ( $H = 8,60$ ,  $p = 0,013$ ) и *XpG* Asp1104His ( $H = 6,34$ ,  $p = 0,041$ ), близкие к достоверным различия также обнаружены для локуса *APE1* Asp148Glu ( $H = 4,71$ ,  $p = 0,09$ ). Частота обменов хромосомного типа была ассоциирована с заменами в локусах *hOGG1* Ser326Cys ( $H = 6,07$ ,  $p = 0,048$ ) и *ADPRT* Val762Ala ( $H = 9,56$ ,  $p = 0,008$ ). В контрольной группе не выявлено значимых ассоциаций генотипов с показателями ХА. Проведенная таким образом предварительная оценка ассоциаций наследственных вариантов с цитогенетическими показателями позволила определить 3 однонуклеотидные замены для дальнейшего парного сравнения генотипов и гаплотипов обследованных.

**Парные сравнения генотипов.** Проведенные сравнения гомозигот по мажорному аллелю с гетерозиготами и гомозиготами по минорному аллелю в 3 рассмотренных локусах позволили выявить ряд тенденций. Суммарная частота aberrаций повышена у носителей гетерозиготного генотипа *hOGG1* 326 Ser/Cys в сравнении с гомозиготами Ser/Ser. Также показано увеличение частоты одиночных фрагментов у носителей генотипов *ADPRT* 762 Val/Ala и *XpG* 1104 His/His в сравнении с гомозиготами по мажорному аллелю. Увеличение частоты обменов хромосомного типа наблюдается только у носителей генотипа *ADPRT* 762 Ala/Ala (табл. 3). Учитывая коррекцию на множественные сравнения (критическое значение составило  $p_{cor} = 0,005$ ), статистически значимые различия обнаружены в отношении одиночных фрагментов у носителей генотипа *ADPRT* 762 Val/Ala. Обнаруженная ассоциация этого показателя согласуется с представлениями о продукте гена *ADPRT* как ферменте эксцизионной репарации оснований, устраняющей главным образом хроматидные повреждения. Замена *ADPRT* Val762Ala связывается со снижением функциональной активности белка и повышенной предрасположенностью к развитию некоторых форм рака [Locket et al., 2004; Li et al., 2006]. В работе [Zhang et al., 2005] обнаружено небольшое повышение риска рака для замены *ADPRT*

Val762Ala и 5-кратное возрастание риска для сочетания *ADPRT* 762Ala/Ala *XRCC1* 399Gln/Gln. Показано, что ферментативная активность *ADPRT* стимулируется одно – и двухцепочечными разрывами ДНК [Lindahl et al., 1995]. Предположение о сниженной активности белка *ADPRT* 762Ala/Ala [Lockett et al., 2004] подтверждается клиническими данными. У носителей Ala/Ala генотипа отмечено повышение риска рака легких (у курильщиков) [Liang et al., 2003], а также риска рака пищевода и простаты [Hao et al., 2004; Lockett et al., 2004].

Таблица 3. Ассоциация генотипов *hOGG1*, *ADPRT*, *XpG* с частотой хромосомных aberrаций ( $\mu \pm s$ ).

Всего aberrаций на 100 клеток					
<i>hOGG1</i>	Ser/Ser		Ser/Cys		Cys/Cys
	Ser326Cys	5,07 ± 0,41		6,16 ± 0,31* p = 0,023	
Одиночных фрагментов на 100 клеток					
<i>ADPRT</i> 762 Val/Ala			<i>XpG</i> 1104 Asp/His		
<i>ADPRT</i> 762	Val/Ala	Ala/Ala	<i>XpG</i> 1104	Asp/His	His/His
Val/Val	<b>4,63 ± 0,28*</b>	3,84 ± 0,51	Asp/Asp	4,42 ± 0,29	5,09 ± 0,53*
3,63 ± 0,31	<b>p = 0,005</b>	p > 0,05	3,78 ± 0,29	p > 0,05	p = 0,015
Обменов хромосомного типа на 100 клеток					
<i>ADPRT</i> 762 Val/Ala			<i>hOGG1</i> 326 Ser/Cys		
<i>ADPRT</i> 762	Val/Ala	Ala/Ala	<i>hOGG1</i> 326	Ser/Cys	Cys/Cys
Val/Val	0,16 ± 0,04	0,37 ± 0,07*	Ser/Ser	0,18 ± 0,04	0,10 ± 0,06
0,15 ± 0,04	p > 0,05	p = 0,023	0,22 ± 0,06	p > 0,05	p > 0,05

Примечание.  $\mu$  – средняя частота,  $s$  – ст. ошибка средней,  $p_{cor} = 0,005$ .

**Сравнения сочетаний генотипов.** Анализ гаплотипов по 3 локусам *ADPRT*, *XpG*, *hOGG1* с использованием метода отношения шансов (OR) в группах, разделенных по уровню aberrаций контрольной группы, не выявил статистически значимых ассоциаций. Для исследования эффектов сочетаний аллельных вариантов

был проведен произвольный подсчет суммарного числа аллелей «предрасположенности» для каждого обследованного. Были выбраны 4 аллельных варианта: *hOGG1* 326Cys, *ADPRT* 762Ala, *XpG* 1104His, для которых была показана ассоциация с частотой aberrаций, а также вариант *APE1* 148Glu. Гетерозиготный генотип рассматривался нами в качестве 1 аллеля «предрасположенности», гомозиготные генотипы *APE1* 148Glu/Glu, *hOGG1* 326Cys/Cys, *ADPRT* 762Ala/Ala, *XpG* 1104His/His, – в качестве 2 аллелей «предрасположенности». Всего по данным 4 локусам обследовано 119 человек, количество минорных аллелей распределилось следующим образом: нет аллелей «предрасположенности» – 1 обследованный; 1 – 11; 2 – 21; 3 – 28; 4 – 31; 5 – 19; 6 – 6; 7 – 2. На рис.5 приведен коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ).

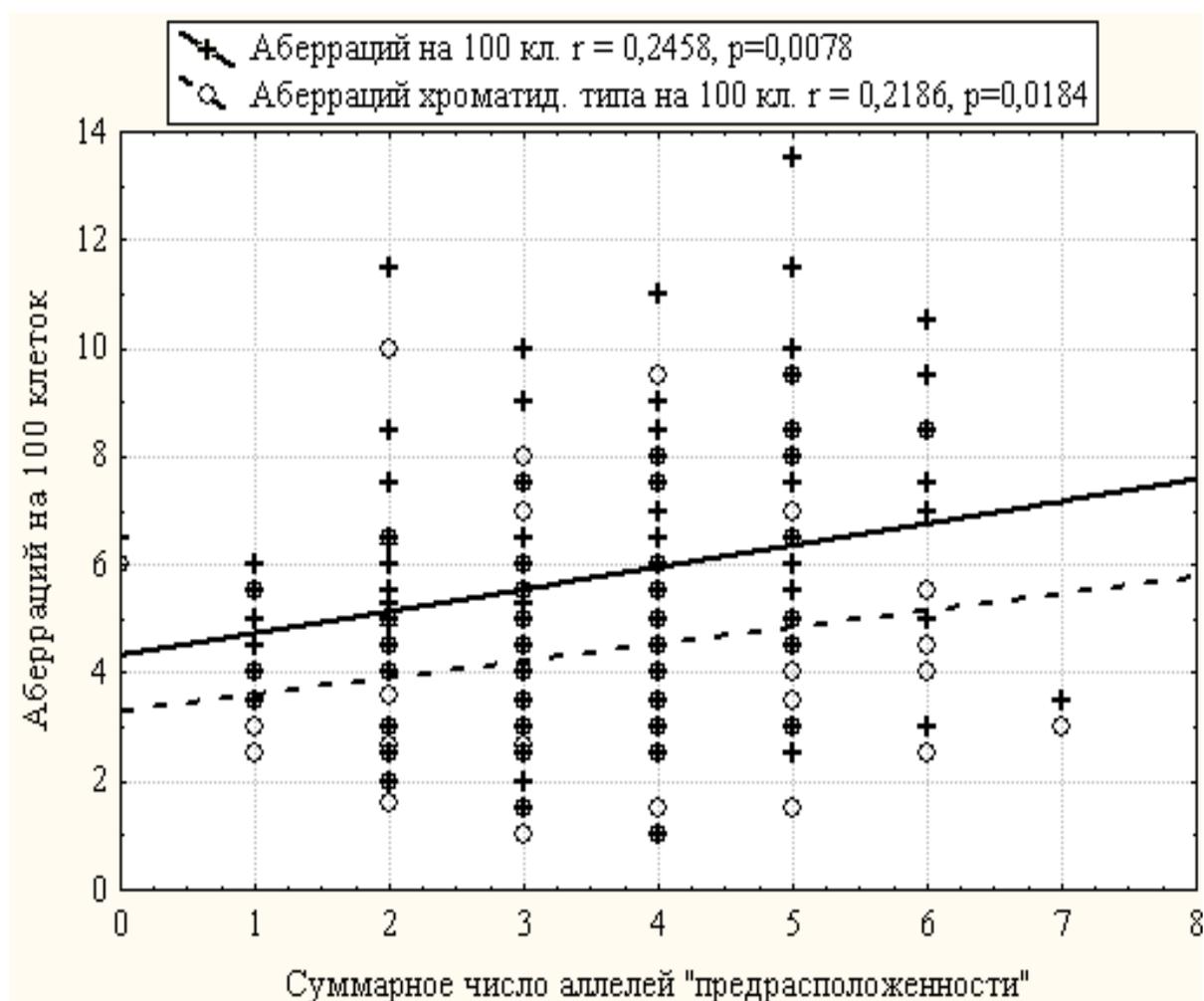


Рис. 5. Частота хромосомных aberrаций и число аллелей «предрасположенности». ( $r$  – коэффициент корреляции Спирмена).

Распределение числа aberrаций на 100 клеток и хроматидных aberrаций отличалось от нормального, поэтому был выбран непараметрический критерий Спирмена ( $r_s$ ) для выявления корреляции между суммарным числом аллелей «предрасположенности» и уровнем aberrаций. Поскольку общее число случаев превышало 50, на основе коэффициента  $r_s$  было рассчитано значение Т-критерия Стьюдента (использовались критические значения для выборки размером 100 обследованных) [Гланц, 1998]. Значение Т-критерия для суммарной частоты aberrаций ( $r_s = 0,2458$ ) составило  $T = 2,708$  (критическое значение  $T = 2,626$ , для  $p = 0,01$ ), для показателя частоты aberrаций хроматидного типа ( $r_s = 0,2186$ ) –  $T = 2,392$  (критическое значение  $T = 2,364$ , для  $p = 0,02$ ). Кроме того, установлено статистически достоверно ( $p = 0,002$ ) более низкое значение показателя ХА на 100 клеток в группе обследованных – носителей 0–3 замен ( $5,02 \pm 0,30$ ) в сравнении с обследованными носителями 4–7 замен ( $6,36 \pm 0,31$ ) по данным 4 локусам (табл.4).

Таблица 4. Число хромосомных aberrаций ( $\mu \pm s$ ) и суммарное число аллелей «предрасположенности».

Число aberrаций на 100 клеток	0 – 3 (N = 61)	4 – 7 (N = 58)	U – критерий Манна-Уитни
Общее количество aberrаций	$5,02 \pm 0,30$	$6,36 \pm 0,31$	$U = 1214,$ $Z = -2,955, p = 0,002$
Хроматидного типа	$3,78 \pm 0,26$	$4,88 \pm 0,27$	$U = 1241,$ $Z = -2,818, p = 0,005$
Хромосомного типа	$1,25 \pm 0,13$	$1,48 \pm 0,13$	$p > 0,05$
Парных фрагментов	$1,10 \pm 0,11$	$1,29 \pm 0,11$	$p > 0,05$
Дицентрических хромосом	$0,05 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,02$	$p > 0,05$

Примечание.  $\mu$  – средняя частота,  $s$  – ст. ошибка средней,  $p_{\text{кор}} = 0,01$ .

Аналогичная тенденция ( $p = 0,005$ ) обнаружена в отношении aberrаций хроматидного типа, ( $3,78 \pm 0,26$ ) и ( $4,88 \pm 0,27$ ) соответственно. Обнаруженные эффекты «накопления» числа aberrаций с увеличением замен выявлены для

ферментов, относящихся к одному ЭРО-пути, исключение составляет XpG. Схожая картина усиления эффектов повреждений ДНК показана в работе [Vodicka et al., 2007], где была установлена ассоциация сочетаний этих замен с частотой aberrаций, индуцированных радиацией и окислительным стрессом, у жителей Чехии. В качестве маркера использовалось число минорных аллелей по заменам: *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg280His, *XRCC1* Arg399Gln, *hOGG1* Ser326Cys. Увеличение суммарного числа этих замен в разных комбинациях проявляло отрицательную корреляцию с уровнем репарации окислительных повреждений ДНК.

### Выводы.

1. Анализ потенциально воздействующих генотоксических факторов позволил выявить стабильное воздействие сверхнормативных концентраций радона на обследованную выборку, что является наиболее вероятным источником кластогенных эффектов, обнаруженных в ходе комплексного экологического мониторинга на территории школы-интерната г.Таштагола.
2. В исследуемой группе детей и подростков, экспонированных радоном, стабильно выявляется повышенная в сравнении с контрольной группой частота хромосомных aberrаций, в том числе специфических маркеров радиационного воздействия: дицентрических и кольцевых хромосом.
3. Повышенный уровень одиночных фрагментов связан с носительством аллельного варианта *ADPRT* 762Val/Ala.
4. Сочетание в генотипе 4 аллельных вариантов *APE1* 148Glu, *hOGG1* 326Cys, *ADPRT* 762Ala, *XpG* 1104His приводит к увеличению общего числа хромосомных aberrаций и является фактором риска в условиях хронического действия генотоксических факторов.

## Список работ по теме диссертации

### *Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ*

1. Дружинин В.Г., Ахматьянова В.Р., Головина Т.А., Волков А.Н., Минина В.И., **Ларионов А.В.**, Макеева Е.А. Чувствительность генома и особенности проявления генотоксических эффектов у детей-подростков, подвергающихся воздействию радона в условиях проживания и обучения // Радиационная биология, радиоэкология. 2009. Т. 49. № 5. С. 568 – 573.
2. **Ларионов А.В.**, Шапошникова А.В., Дружинин В.Г. Цитогенетические нарушения в оценке токсико-генетического риска длительного воздействия малых доз  $\alpha$ -облучения // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2009. Т. 11 (27). № 1(3). С. 499 – 504.
3. Дружинин В.Г., Волков А.Н., Головина Т.А., **Ларионов А.В.**, Минина В.И., Шапошникова А.В. Мультиабerrантные клетки в лимфоцитах периферической крови у жителей Кузбасса // Медицинская генетика. 2009. № 5. С. 29 – 34.
4. Волков А.Н., Глушков А.Н., Головина Т.А., Дружинин В.Г., **Ларионов А.В.**, Минина В.И., Сорокина Н.В. Уровень хромосомных aberrаций у лиц с различными фенотипами ацетилирования и генотипами *NAT2*, проживающих в условиях комплексного воздействия радона и тяжелых металлов // Медицинская генетика. 2009. № 7. С. 24 – 29.
5. Минина В.И., Дружинин В.Г., Глушков А.Н., Головина Т.А., Апалько С.В., Волков А.Н., Ахматьянова В.Р., Лунина А.А., **Ларионов А.В.** Генотоксические эффекты комплексного воздействия радона и тяжелых металлов в зависимости от полиморфизма генов ферментов монооксигеназной системы // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 3. С. 53 – 60.
6. Дружинин В.Г., Алукер Н.Л., Ахальцева Л.В., Головина Т.А., Ингель Ф.И., **Ларионов А.В.**, Сорокина Н.В., Толочко Т.А., Шапошникова А.В. Комплексный подход к оценке экологических факторов токсико-генетического риска у детей из Горной Шории // Гигиена и санитария. 2010. № 3. С. 12 – 18.
7. Мейер А.В., Толочко Т.А., Лунина А.А., **Ларионов А.В.**, Минина В.И., Дружинин В.Г. Влияние полиморфизмов генов репарации ДНК на показатели нестабильности

генома детей и подростков в условиях повышенной концентрации радона // Медицинская генетика. 2010. № 2. С. 3 – 8.

*Другие публикации*

8. Druzhinin V.G., Golovina T.A., Ahmatianova V.R., Minina V.I., Volkov A.N., **Larionov A.V.**, Makeeva E.V. Genome sensitivity and genotoxic effects features in children-teenagers affected by radon radiation in living and educational environment / 6<sup>th</sup> Conference of the Pan African Environmental Mutagen Society (PAEMS 2008). November 2 – 5 2008, Cape Town, South Africa. P. 81.
9. Дружинин В.Г., Алукер Н.Л., Ахматьянова В.Р., Волков А.Н., Глушков А.Н., Головина Т.А., Егорова Н.А., Лавряшина М.Б., **Ларионов А.В.**, Макеева Е.А., Минина В.И., Толочко Т.А., Шапошникова А.В., Ульянова М.В., Ингель Ф.И., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А., Юрченко В.В. Индивидуальная чувствительность генома и особенности проявления генотоксических эффектов у людей, длительно подвергающихся воздействию повышенных концентраций радона. Изучение возможных механизмов модификации эффектов / Тез. докл. итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы», 8 – 10 декабря 2008. М.: 2008. С. 124 – 126.
10. Дружинин В.Г., Ахальцева Л.В., Волков А.Н., Головина Т.А., Ингель Ф.И., **Ларионов А.В.**, Минина В.И., Шапошникова А.В. Особенности проявления генотоксических эффектов у детей, длительно подвергающихся воздействию повышенных концентраций радона в условиях проживания и обучения / Тез. докл. V Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 21 – 28 июня 2009. М.: 2009. Ч. 1. С. 417.
11. Дружинин В.Г., Алукер Н.Л., Головина Т.А., Ингель Ф.И., **Ларионов А.В.**, Сорокина Н.В., Шапошникова А.В. Чувствительность генома и особенности проявления генотоксических эффектов у детей, длительно подвергающихся воздействию повышенных концентраций радона в условиях проживания и обучения / Материалы Международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей

- радиации и радиоактивное загрязнение окружающей среды». Сыктывкар. Коми Научный центр УрО РАН. 2009. С. 43 – 46.
12. **Ларионов А.В.**, Минина В.И., Дружинин В.Г., Лунина А.А., Головина Т.А., Толочко Т.А. Полиморфизм генов репарации ДНК и индивидуальная радиочувствительность генома человека в условиях хронического воздействия радона / Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современная Россия: проблемы социально-экономического и духовно-политического развития». Волгоград. М.: ООО «Глобус». 2009. С. 85 – 88.
13. Druzhinin V.G., Golovina T.A., Glushkov A.N., **Larionov A.V.**, Minina V.I., Shaposhnikova A.V., Volkov A.N. Long-term exposition by domestic radon radiation and genotoxic effects in children from Western Siberia / 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (ICEM). 2009 August 20 – 25. Firenze – Italy. P. 189.
14. Vladimir Druzhinin V., Glushkov A., **Larionov A.**, Lunina A., Meyer A., Minina V., Tolochko T., Volkov A. Correlation between reparation genes polymorphism and chromosomal aberrations in long-term radon exposure condition // Annual meetings of the Europe Environmental Mutagen Society (EEMS 2010). September 12 – 15 2010. Oslo. Norway. P. 312 – 313.

Подписано к печати 26.12.2011.  
Формат 60x84<sup>1/16</sup>. Бумага офсетная №1  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,25 Тираж 100. Заказ № 1331  
Отпечатано в типографии ООО РПК «Радуга»  
650004, г. Кемерово, ул. Соборная, 6