

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); 6th 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); 10th 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 χ^2 , с поправкой Йетса для таблиц 2x2 [Гланц, 1998]. Для количественных показателей рассчитывали средние значения (μ) 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. μ – 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 γ -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/м³ [Крисюк, 1989]. Показатель ОА радона варьировал от 415 – 730 Бк/м³ в зимнее время до 200 Бк/м³ весной (среднее значение 441 ± 319 Бк/м³). Расчеты усредненного показателя эквивалентной равновесной объемной активности (ЭРОА) радона (314,4 Бк/м³) 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 ~ 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 [#] | 6 | 140 | 4 | 5 | – | 6 |
| Радиационные параметры | МЭД внешнего γ -излучения, мкЗв/ч | | | | Средняя удельная объемная активность радона, Бк/м ³ | | | | |
| Среднее значение | 0,17 | | | | 441* | | | | |
| Допустимый уровень | 0,3 | | | | 200 | | | | |

Примечание. * – превышение ПДК, [#] – 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 ($p < 0,001$).

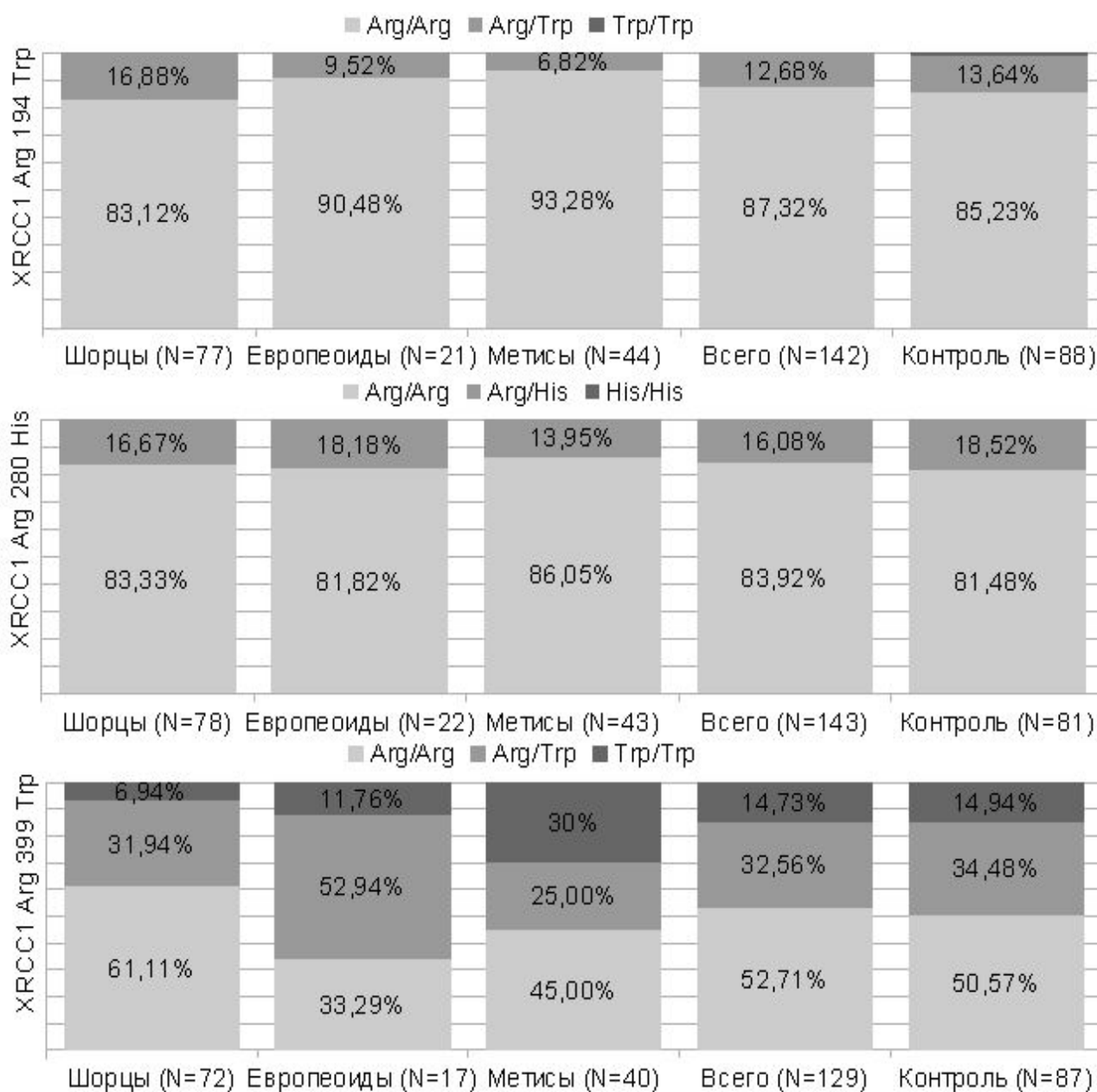


Рис. 1 Частота генотипов эксцизионной репарации оснований *XRCC1* в опытной и контрольной группах.

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.

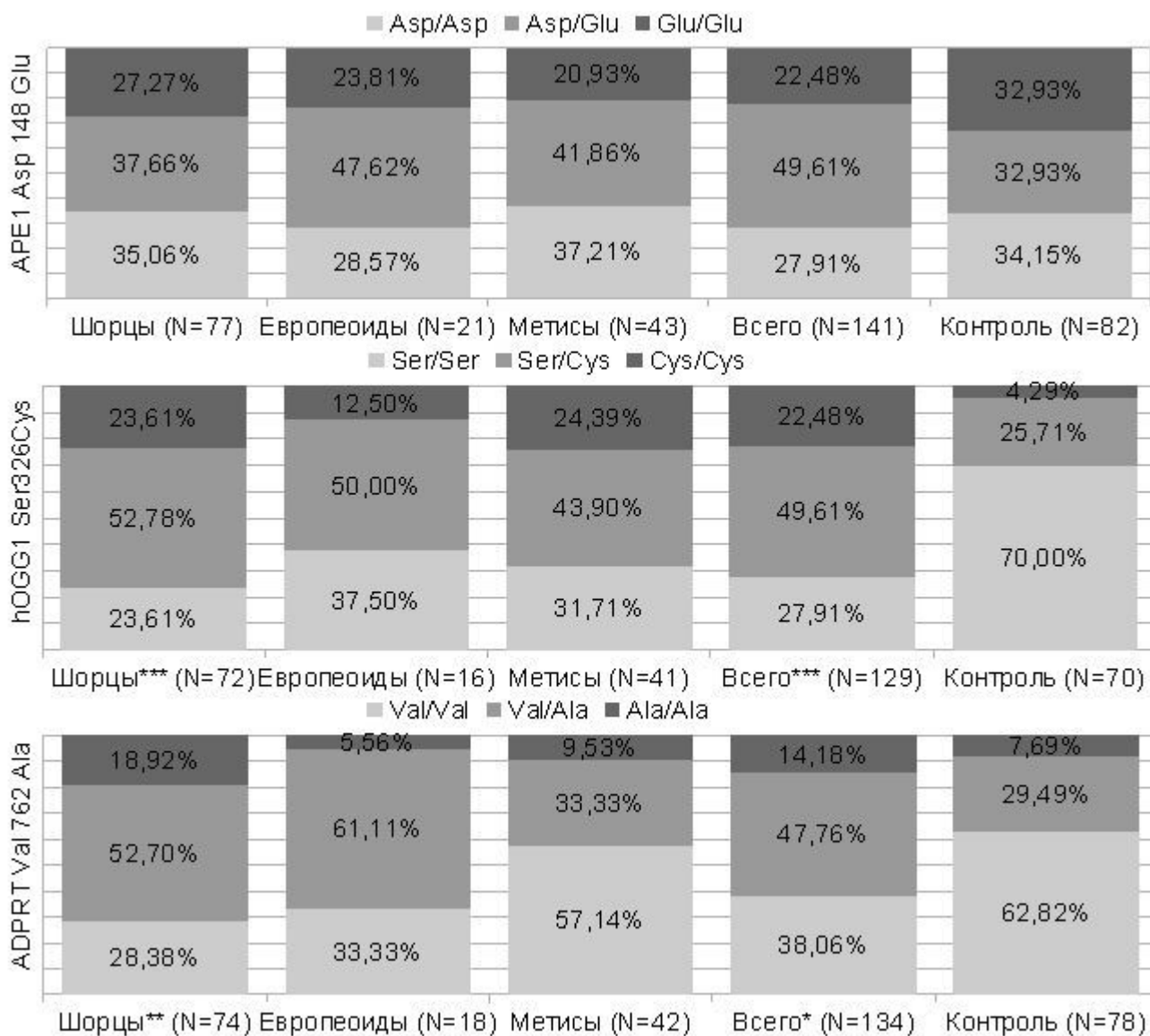


Рис. 2 Частота генотипов эксцизионной репарации оснований *APE1*, *hOGG1*, *ADPRT* в опытной и в контрольной группах.

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

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

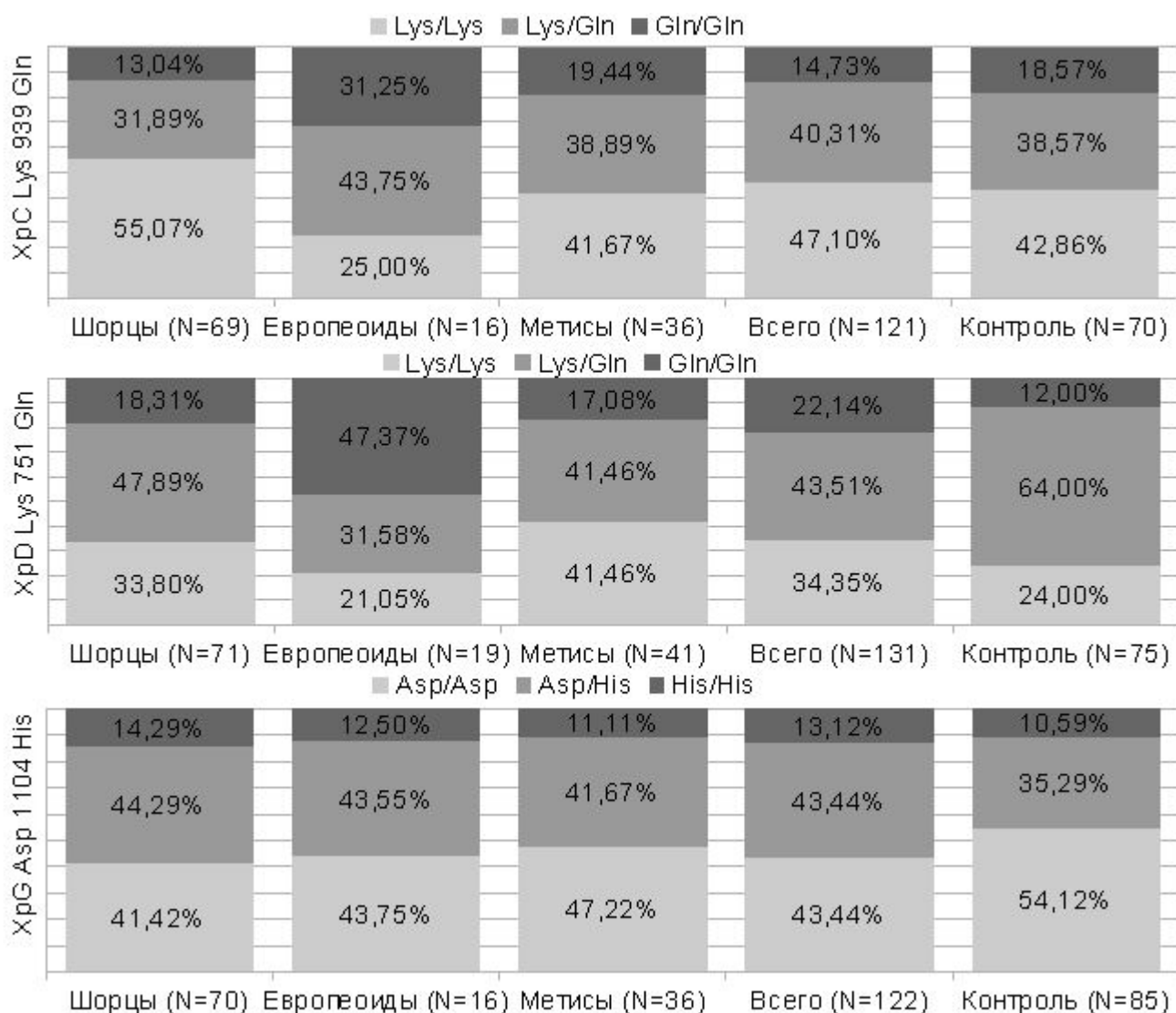


Рис. 3 Частота генотипов эксцизионной репарации нуклеотидов *XpC*, *XpD*, *XpG*, в опытной и в контрольной группах.

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; Hao 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 χ^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.

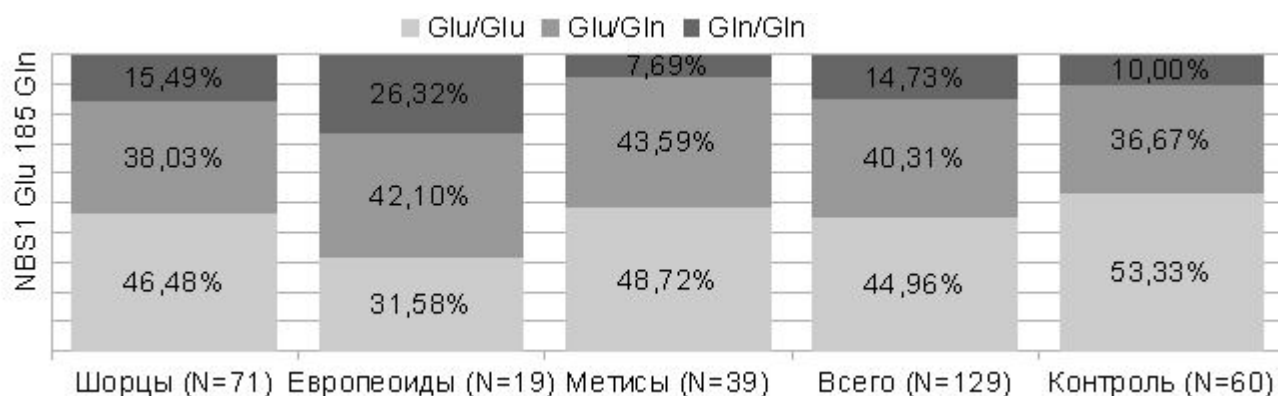


Рис. 4 Частота генотипов репарации двойных разрывов нуклеотидов *NBS1* в опытной и контрольной группах.

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 | 4,63 ± 0,28* | 3,84 ± 0,51 | Asp/Asp | 4,42 ± 0,29 | 5,09 ± 0,53* |
| 3,63 ± 0,31 | p = 0,005 | 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. μ – 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 локусов 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).

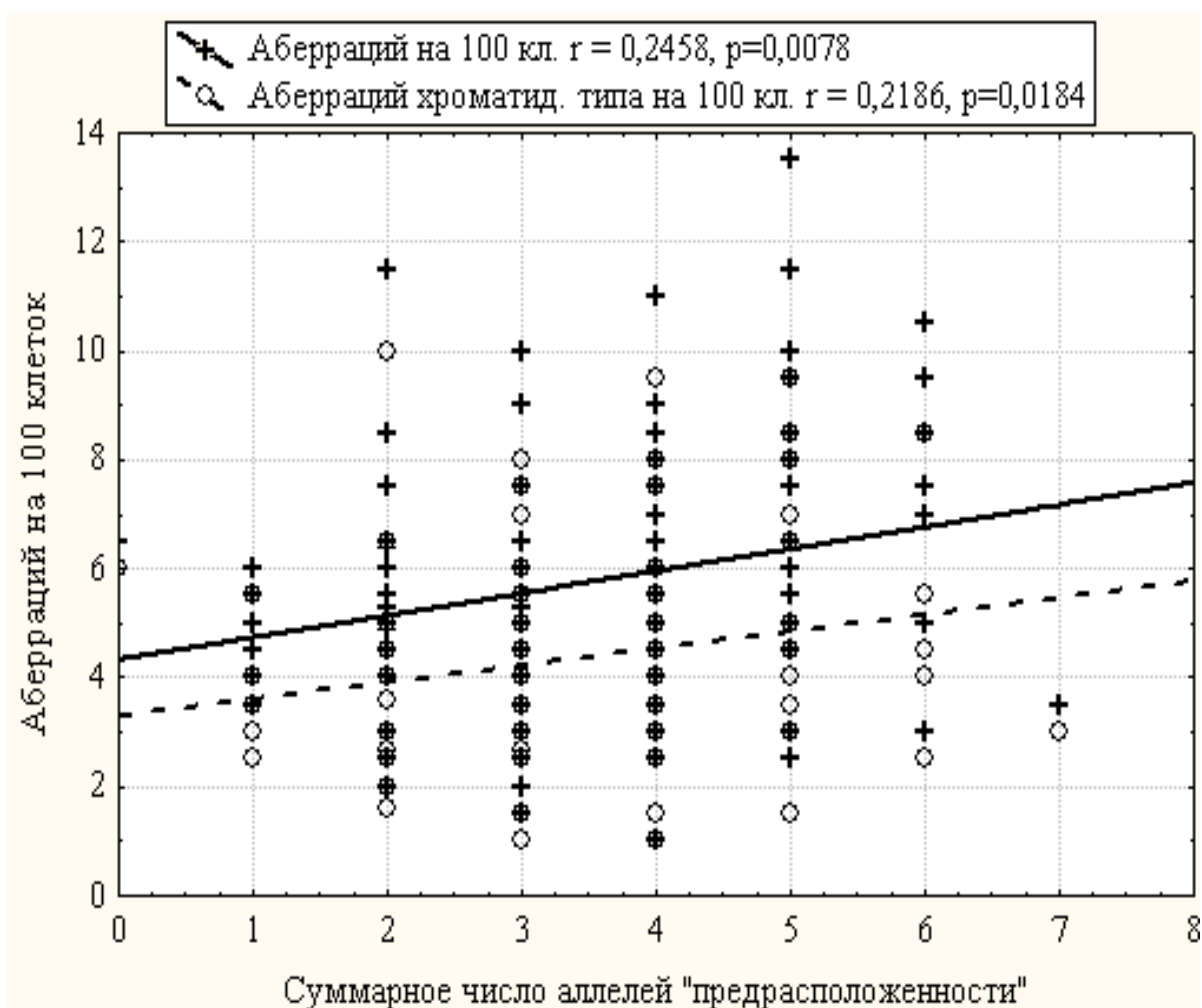


Рис. 5. Частота хромосомных aberrаций и число аллелей «предрасположенности». (r – коэффициент корреляции Спирмена).

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. μ – 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 аберраций, 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 аберраций, 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 аберраций 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 α -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. Мультиаберрантные 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 / 6th 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 / 10th 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^{1/16}. 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