

**ВАЛИДАЦИЯ СВЯЗИ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА
С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ
У РАБОТНИКОВ РАДИАЦИОННОГО ПРОИЗВОДСТВА**

М. В. Халюзова

Научный руководитель: д.б.н Н.В. Литвяков

Северский биофизический научный центр ФМБА России

Россия, Томская обл., ЗАТО Северск, г. Северск, пр. Коммунистический, 87, 636039

E-mail: gedonna@yandex.ru

**THE VALIDATION OF THE ASSOCIATION BETWEEN GENE POLYMORPHISMS
AND THE CYTOGENETIC ABNORMALITIES FREQUENCY
IN THE COHORT OF RADIATION FACILITY EMPLOYEES**

M. V. Khalyuzova

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litviakov

Seversk Biophysical Research Centre

Russia, Tomsk Region, Seversk, Kommunistichesky av., 87, 636070

E-mail: gedonn@yandex.ru

Abstract. *The results from the research into the association between polymorphisms of genes-candidates for individual radiosensitivity and the frequency and spectrum of cytogenetic abnormalities are analyzed. These polymorphisms have been previously identified in our microarray studies using “Cancer_SNP_Panel GT-17-211” (“Illumina”, USA) in 2013. The study was conducted among Siberian Group of Chemical Enterprises healthy employees (n = 158) exposed to professional irradiation in a dose range of 100–300 mSv. We have found that 16 SNPs are associated with the frequency of dicentric and ring (the radiation exposure markers). We have found that 9 SNPs are confirmed to be associated with the frequency of dicentric (INSR rs1051690, TNKS rs33945943, CYP24A1 rs751087, GSK3B rs4624596, GSK3B rs4688046, GSK3B rs10934500, GSK3B rs1574154, GSK3B rs2873950, VCAM1 rs2392221) and 14 SNPs are confirmed to be associated with the frequency of ring (ESR1 rs488133, PIN1 rs889162, PIN1 rs2233679, CYP2C19 rs4986894, CYP24A1 rs751087, APAF1 rs2288729, MPDU1 rs4227, GSK3B rs4624596, GSK3B rs4688046, GSK3B rs10934500, GSK3B rs10934503, GSK3B rs1574154, GSK3B rs2873950, VCAM1 rs2392221).*

Введение. Известно, что основными цитогенетическими индикаторами радиационного воздействия являются нестабильные хромосомные aberrации (ХА), в частности, дицентрические и кольцевые хромосомы. Их повышенная индукция у отдельных индивидов при одинаковой дозе облучения может служить показателем индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ). Для идентификации генетических маркеров, которые могли бы использоваться в качестве предикторов повышенной частоты индукции цитогенетических аномалии при долговременном контакте с ионизирующим излучением (ИИ), было проведено крупномасштабное (микрочиповое) исследование ассоциации однонуклеотидных полиморфных вариантов (single nucleotide polymorphisms – SNPs) с частотой и спектром ХА у работников Сибирского химического комбината (СХК), крупнейшего в мире

предприятия атомной отрасли, подвергавшихся длительному радиационному воздействию в диапазоне доз 100-300 мЗв [1]. Именно при этом диапазоне доз на дозовой кривой выхода хромосомных аномалий наблюдается плато, когда частота ХА не возрастает с повышением дозы облучения [2]. Объектом исследования явилась кровь 86 здоровых работников СХК, подвергавшихся долговременному радиационному воздействию в процессе профессиональной деятельности. ДНК из крови выделяли при помощи колоночного метода, наборами «QIAamp DNA MiniKit (50)» («Qiagen», Германия). Микрочиповое исследование ассоциации 1 262 SNPs с частотой и спектром ХА проводили при помощи «Cancer_SNP_Panel GT-17-211» («Illumina», США). Анализ полученных данных проводили с помощью программы «SNPassoc». В результате было идентифицировано 40 SNPs, ассоциированных с повышенной частотой различных типов ХА, из них 28 SNPs были связаны с повышенной частотой индукции дицентрических и кольцевых хромосом – маркеров радиационного воздействия [1].

Для подтверждения выявленных ассоциаций далее было проведено несколько серий валидационных исследований на расширенной выборке работников СХК подвергавшихся долговременному радиационному воздействию [3] в том числе и у работников, облученных в диапазоне 100-300 мЗв, итоги которых представлены ниже.

Материалы и методы исследования. Объектом для исследования служила ДНК крови 158 здоровых работников СХК, подвергавшихся радиационному воздействию в процессе профессиональной деятельности. Средняя доза внешнего облучения составила $176,9 \pm 4,07$ мЗв, медиана – 171,1 мЗв, интерквартильный размах – 136,7–207,3 мЗв. Для всех обследованных лиц был проведен стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Генотипирование ДНК по всем 40 SNPs проводили методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами оригинального дизайна.

Результаты. По результатам валидационного исследования обнаружено, что у носителей мутантного GG-генотипа гена *INSR* rs1051690 частота дицентрических хромосом в 3 раза выше, чем у носителей «дикого» и гетерозиготного генотипов (p -value = 0,045), в то время как у носителей мутантного AA-генотипа *TNKS* rs33945943 частота дицентрических хромосом выше в 2,4 раза (p -value = 0,012).

Для полиморфизма *CYP24A1* rs751087 была продемонстрирована сильная ассоциация с высокой частотой дицентрических и кольцевых хромосом. Установлено, что наличие мутантного GG-генотипа гена цитохрома P450 rs751087 увеличивает частоту дицентрических хромосом в 3,9 раза (p -value = 0,0003), а частоту кольцевых хромосом – в 3,1 раза (p -value = 0,010). Валидационное исследование 6 полиморфных вариантов гена *GSK3B* подтвердило выявленные ранее ассоциации с кольцевыми хромосомами, более того для пяти из шести SNPs также были показаны сильные ассоциации и с повышенной частотой дицентрических хромосом. У носителей минорных генотипов по изученным SNPs частота кольцевых aberrаций выше, чем у носителей «диких» и гетерозиготных генотипов в 2,2–4,5 раза (p -value – 0,0002–0,002), а частота дицентрических хромосом – в 3,9–5 раз (p -value – 0,0004–0,0001). Также были валидированы сильные ассоциации *VCAM1* rs2392221 с частотой дицентрических и кольцевых хромосом. У носителей мутантного TT-генотипа частота дицентрических хромосом в среднем в 5 раз выше, чем у носителей «дикого» CC- и гетерозиготного CT- генотипов (p -value = 0,007), в то время как частота колец выше в 11,5 раза (p -value = 0,0000), что свидетельствует о возможности использования данного маркера для тестирования высокого уровня ИРЧ.

Валидационные исследования подтвердили связь *CYP2C19* rs4986894 с частотой кольцевых хромосом. У носителей минорного генотипа *CC* частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей мажорного и гетерозиготного генотипов в 6,9 раза (p -value = 0,00003). Также подтверждена связь полиморфизма гена *ESR1* rs488133 с повышенной частотой кольцевых хромосом. У носителей мутантного аллеля *T* частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей доминантного аллеля *C* в 3,9 раза (p -value = 0,001).

Настоящие исследования также подтвердили связь полиморфных вариантов rs889162 и rs2233679 гена *PIN1* с кольцевыми хромосомами. У носителей минорного аллеля *T* полиморфизма rs2233679 частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей доминантного аллеля *C* в 3 раза (p -value = 0,005), в то время как у носителей редкого генотипа *AA* по полиморфизму rs889162 частота кольцевых хромосом выше в 3 раза (p -value = 0,0000). Валидационные исследования подтвердили и выявленную ранее ассоциацию полиморфизма *APAF1* rs2288729 с кольцевыми хромосомами. У носителей минорного генотипа *TT* частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей мажорного *CC*- и гетерозиготного *CT*-генотипов в 2,7 раза (p -value = 0,008). Подтверждена ассоциация *MPDUI* rs4227 с повышенным уровнем кольцевых хромосом: у носителей мутантного генотипа *GG* наблюдалось повышение частоты кольцевых хромосом по сравнению с носителями «дикого» и гетерозиготного генотипов в 4 раза (p -value = 0,0004).

Заключение. Таким образом, на выборке работников, подвергавшихся радиационному воздействию в дозе 100–300 мЗв, удалось подтвердить установленные ранее ассоциации с повышенной частотой кольцевых и дицентрических хромосом для 16 из 28 SNPs. Их них 9 SNPs ассоциированы с повышенной частотой индукции дицентрических хромосом: rs1051690, rs33945943, rs751087, rs4624596, rs4688046, rs10934500, rs1574154, rs2873950, rs2392221. В то время как связь с повышенной частотой кольцевых aberrаций была валидирована для 14 SNPs: rs488133, rs889162, rs2233679, rs4986894, rs751087, rs2288729, rs4227, rs4624596, rs4688046, rs10934500, rs10934503, rs1574154, rs2873950, rs2392221. При этом 7 из 16 SNPs имеют связь как с дицентрическими, так и с кольцевыми хромосомами; 11 SNPs ассоциированы более чем с двумя типами ХА, что может свидетельствовать об общности механизмов их индукции при радиационном воздействии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвяков Н.В., Гончарик О.О., Фрейдин М.Б. и др. Оценка связи полиморфизмов генов с частотой и спектром цитогенетических аномалий у здоровых работников сибирского химического комбината, подвергавшихся радиационному воздействию (microarray исследования) // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53. – № 2. – С. 137–150.
2. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В. и др. Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, – № 3. – С. 283–296.
3. Халюзова М.В., Литвяков Н.В., Сазонов А.Э. и др. Валидация результатов широкогеномного исследования связи полиморфных локусов с повышенной частотой маркёров радиационного воздействия // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13. – № 3. – С. 70–79.