

На правах рукописи



Солтаева Арбият Магомед - Ханиповна

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО
ЗАГРЯЗНЕНИЯ У ДЕТЕЙ ЧЕЧЕНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ОКСИДАТИВНОГО ОТВЕТА,
ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И РЕПАРАЦИИ ДНК

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель: **Рубанович Александр Владимирович**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Осипов Андреев Николаевич,**
доктор биологических наук заведующий лабораторией радиационной биофизики, ФГБУ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России.

доктор биологических наук,
доцент **Жукова Ольга Владимировна,**
заведующая лабораторией генетики человека, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита диссертации состоится «23» мая 2013г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, дом 3. Факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «__» апреля 2013г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

В последние годы, в связи с увеличением объемов добычи нефти в России, одним из серьезных загрязнителей окружающей среды нашей страны является нефть и нефтепродукты. Проблема загрязнения окружающей среды продуктами первичной переработки нефти особенно остро стоит в Чеченской Республике, которая несколько последних десятилетий относится к числу самых неблагоприятных в экологическом отношении территорий на Северном Кавказе. Несмотря на то, что крупные промышленные предприятия не функционируют в последние годы, мощными источниками загрязнения окружающей среды на территории Чеченской республики являются многочисленные горящие нефтяные скважины, а также открытое горение нефти и ее переработка на кустарных мини-заводах (Джамбетова и др., 2009; Солтаева и др., 2011).

Компоненты нефти (полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), бенз[а]пирен, фенолы, тяжелые металлы и др.) и продукты ее переработки оказывают токсическое, мутагенное, канцерогенное действие на живые организмы, что также приводит к нарушению генетической структуры природных популяций (Petrilli et al, 1980; Dickson et al, 1980; Granella et al, 1991; Granella et al, 1995; Бочков с соавт., 1989; Сериков, Оразбаев, 2002).

Важную роль в ограничении оксидативного стресса, возникающего как ответ на экзогенные и эндогенные интоксикации, влияние техногенных загрязнений окружающей среды и излучения играют специализированные системы ферментативных антиоксидантов. Необходимые для защиты от активных форм кислорода, выработанные в процессе эволюции во всех типах клеток, действие которых зависит от полиморфизма детерминируемых их генов.

В настоящее время систематические данные о влиянии нефтехимических продуктов на генетическое здоровье населения, проживающего на загрязненных территориях, малочисленны. В частности, полностью отсутствуют данные о возможном генотоксическом влиянии нефтехимических продуктов на детей младшего школьного возраста, организм которых наиболее чувствителен к негативным факторам окружающей среды.

Цель работы и задачи исследования.

Анализ ассоциаций генетического полиморфизма с цитогенетическими показателями в буккальных эпителиоцитах детей чеченской популяции, проживающих в разных природно-климатических зонах и при различных уровнях загрязнения окружающей среды продуктами первичной переработки нефти.

Для достижения цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Оценить однородность чеченской популяции в загрязненных и экологически благополучных районах по полиморфным локусам:

- генов 1-й и 2-й фаз биотрансформации ксенобиотиков (гена *CYP1A1* rs2606345, rs4646903, rs1048943, *CYP1B1* rs1056836, *NQO1* rs1800566, *GSTT1*, *GSTM1*);

- генов репарации ДНК (гена *XRCC1* rs1799782, rs25487, гена *XPB* rs1799793, rs13181, *ERCC1* rs11615, *APEX* rs1130409, *ATM* rs664143, *OGG1* rs1052133, *ADPRT* rs1136410, *ABCBI* rs1045642);

- генов оксидативного ответа (*SOD2* rs4880, *CAT* rs7943316, *GCLC* rs17883901);

- гена-триггера *MTHFR* C677T rs1801133.

2. Сравнить частоты микроядер в буккальных эпителиоцитах детей из разных эколого-ландшафтных районов;

3. Провести анализ сопряженности полиморфизма перечисленных генов с уровнем частот микроядер в буккальных эпителиоцитах исследованных выборок детей.

Научная новизна работы.

Впервые определены частоты генов репарации ДНК, детоксикации ксенобиотиков и оксидативного ответа в чеченской популяции.

Впервые показано, что для детей, имеющих контакт с продуктами первичной переработки нефти в непромышленной сфере, характерен повышенный уровень микроядер в клетках буккального эпителия.

Впервые проведен анализ сопряженности генетического полиморфизма ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации и оксидативного ответа с цитогенетическими параметрами у лиц, проживающих в экологически чистых селах и в селах с загрязнением почв нефтепродуктами.

Практическая значимость работы.

Данная работа показывает ключевую роль молекулярно-генетических методов в оценке здоровья населения на донозологическом уровне.

Результаты исследования демонстрируют целесообразность включения разработанных методов в программу проведения предварительных медицинских осмотров; анализа причин возникновения экологозависимых заболеваний; определения повышенного риска профессиональной, мультифакториальной патологии; при формировании групп специалистов устраняющих техногенные аварии и работающих в условиях загрязнения окружающей среды продуктами первичной переработки нефти.

Основные положения, выносимые на защиту.

Частоты генотипов изученных полиморфных вариантов генов у детей чеченской популяции, имеющих контакт с нефтепродуктами и детей контрольной группы не различаются.

Дети чеченской популяции, проживающие в условиях загрязнения почв нефтепродуктами и в экологически благополучных селах, различаются по цитогенетическим показателям.

Генетический полиморфизм по системе ферментов антиоксидантов - *SOD2* rs4880, *CAT* rs7943316, *GCLC* rs17883901 ассоциирован с уровнями цитогенетических аномалий в соматических клетках детей чеченской популяции из разных эколого-ландшафтных районов.

Апробация работы.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Объединенном пленуме научных советов РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды (Москва, 15-16 декабря, 2010г.); Всероссийской конференции «Наука и образование в ЧР: состояние и перспективы» (г. Грозный, 7 апреля 2011 г.); Всероссийской ежегодной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и молодежь» (г. Грозный, 3-4 июня 2011г.); международной молодежной конференции «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы» посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (Москва, 17-18 ноября 2011г.); на заседании Ученого совета Учреждения Российской академии наук Комплексного научно-исследовательского института им. Х.И. Ибрагимова РАН (г. Грозный, 28 ноября 2011г.).

Декларация личного участия автора.

Автором лично проведен сбор биоматериала у детей для исследования. Подготовка цитогенетических препаратов и подсчет микроядер в клетках буккального эпителия детей проведена совместно с к.б.н., доцентом Джамбетовой П.М.. Самостоятельно проведено генотипирование исследуемых выборок по локусам *CYP1A1* (rs2606345, rs4646903, rs1048943, rs1056836), *NQO1* (rs1800566), *GSTM1* (инсерционно-делеционный полиморфизм), *GSTT1* (инсерционно-делеционный полиморфизм), *XRCC1* (rs1799782, rs25487), гена *XPD (ERCC2)* (rs1799793, rs13181), *ERCC1* (rs11615), *APEX1* (rs1130409), *ATM* (rs664143), *OGG1* (rs1052133), *ADPRT (PARP1)* (rs1136410), *ABCB1(MDR1)* (rs1045642), *MTHFR* (rs1801133), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs7943316), *GCLC* (rs17883901). Автором также проведена статистическая обработка полученных результатов, оформлены результаты тезисов и докладов для научных конференций и все материалы диссертации.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 115 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и обсуждение результатов, выводы, список использованной литературы, приложение и список сокращений. Указатель литературы содержит 201 источника, в том числе 131 на иностранном языке. Текст работы иллюстрирован 9 таблицами и 11 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изученные выборки.

Проведено генотипирование по 21 локусу и цитогенетическое обследование у 529 детей чеченской популяции в возрасте от 7 до 11 лет, проживающих в восьми селах разных районов Чеченской Республики. Из них три села с различной степенью загрязнения нефтепродуктами, где в течение 15 лет проводилась первичная переработка нефти кустарным способом (Долинск, Мескер-Юрт, Николаевская). Пять сел, где подобного производства не было, представляют экологически «чистые» высокогорные поселки - Шатой, Зандак и равнинные экологически благополучные села (Гойты, Червленая, Ачхой-Мартан).

Были обследованы только дети из семей коренных жителей региона. Все они относятся к одной национальности - чеченцы. Родители каждого ребенка заполнили анкету, содержащую сведения о ребенке. От всех родителей получено информационное согласие на проведение генетического исследования (Таблица 1).

Таблица 1

Характеристика обследованных районов и групп детей чеченской популяции

Район	Населенный пункт	Число детей		Средний возраст	
		Мальчики	Девочки	Мальчики	Девочки
«Загрязнен- ный» нефтью	Долинск	40	34	8.28±0.16	8.44±0.15
	Мескер-Юрт	46	45	7.87±0.12	8.20±0.13
	Николаевская	15	20	8.33±0.23	8.5±0.20
Экологи- чески «чистый»	Червленая	25	19	8.64±0.10	8.53±0.19
	Гойты	19	21	8.89±0.15	8.67±0.14
	Зандак	18	24	9.22±0.17	8.75±0.17
	Шатой	18	19	8.05±0.22	8.21±0.21
	Ачхой-Мартан	85	81	8.05±0.25	8.20±0.15
	Всего	266	263	8.36±0.07	8.44±0.06
		529 детей			

Материалом исследования являлись клетки слизистых оболочек полости рта - буккальные эпителиоциты и клетки периферической крови.

Несмотря на то, что в настоящее время в Чеченской республике крупные промышленные предприятия разрушены и не функционируют, количество выбрасываемых вредных веществ не уменьшилось, а скорей всего, увеличилось за

счет переработки нефти на кустарных мини-установках и десятка нефтяных скважин, горевших в течение нескольких лет. С конца 1999 года по 2002 год число горящих нефтяных скважин колебалось от 28 до 50, а вокруг г. Грозного было равно 14. К 2001г. уровень загрязнения нефтепродуктами почв территории республики превышает ПДК на 10%. (Оценка природного потенциала, 2001).

И.Я. Шахтамировым с соавторами (2010) получены результаты определения суммы нефтепродуктов в почвах населенных пунктах Чеченской республики (Таблица 2).

Таблица 2

Содержание нефтепродуктов в почвах Чеченской республики
(Шахтамиров и др., 2010).

№ пробы	Район	Сумма нефтепродуктов, мкг/г почвы
7	Грозненский	71,40
15	Ножай - Юртовский	33,30
18	Шалинский	41,90
32	Урус – Мартоновский	16,00
38	Ачхой - Мартоновский	24,30
49	Шелковской	62,20

Таблица 3

Показатели загрязнения почв нефтепродуктами в экологически чистых и загрязненных нефтепродуктами селах Чеченской республики
(по данным Биткаевой и др., 2011)

Геоступень	Населенные пункты	Нефтепродукты мкг/г почвы
1 Горная	Зандак (Шатой)	18,0(24,7)
2 Равнинная	Гойты/Мескер-юрт (Долинск)	19,0/42,5
3 Низменная	Червленая/Николаевская	21,7/135,0

Кариологический анализ буккального эпителия.

Цитогенетические исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека» (Беляева и др., 2005) и классификацией Л. П. Сычевой (Сычева, 2007).

Биоматериал у обследуемых детей брали со слизистой щеки в области коренных зубов стерильным шпателем и затем равномерно распределяли по поверхности предметного стекла. Из материала, полученного от одного ребенка, готовили по 2 предметных стекла. Материал высушивали при

комнатной температуре и погружали в свежеприготовленный фиксатор: смесь этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1).

Препараты помещали на 1 час в 2,5% раствор ацето-орсеина (orcein Merck) при 37 °С для окраски хроматина, затем докрашивали цитоплазму 1% раствором светлого зеленого (light green, ICN Biomedicals Inc.) при комнатной температуре в течение 1 мин. На шифрованных препаратах учитывали частоту клеток с микроядрами. На каждом препарате изучали по 1000 клеток.

Генотипирование по генам кандидатам.

Образцы крови собирали в эппендорфы, содержащие K_2EDTA , и хранили при $t = - 18^{\circ}C$. ДНК выделяли из клеток периферической крови с помощью наборов Diatom DNA Prep 200, основанных на использовании гуанидинтиоционата и Nucleus - соберната (фирма Изоген, Москва).

Генотипирование проводили методом аллель-специфической тетрапраймазной ПЦР. Праймеры подбирали с использованием программы Primer3, находящейся в открытом доступе (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Статистические методы анализа.

Статистическую обработку результатов исследований проводили стандартными методами с помощью пакета WinSTAT 2003.1, интегрированного в Excel. При сравнении межгрупповых различий частот микроядер использовали непараметрический критерий U-критерий Манна-Уитни. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) с помощью критерия χ^2 . Проводили ROC-анализ для точной оценки зависимости чувствительности теста (Se) от специфичности (Sp) при изменении порогового значения числа микроядер. ROC-кривая – графическая характеристика качества количественного классификатора; зависимость доли верных положительных классификаций от доли ложных положительных классификаций при варьировании порога решающего правила. Преимуществом применения ROC-кривой является её инвариантность относительно отношения цены ошибки I и II рода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты цитогенетического обследования детей чеченской популяции.

Для реализации поставленных задач в рамках данного исследования нами проведен микроядерный тест на клетках слизистой оболочки щеки для 529 детей, из которых 200 человек проживают в экологически загрязненных нефтехимическими веществами районах и 329 человек в экологически «чистых» селах.

В результате анализа уровня цитогенетических нарушений нами выявлена значимо повышенная частота цитогенетических нарушений у детей, проживающих в условиях загрязнения окружающей среды нефтепродуктами. Так, наблюдалось трехкратное повышение частоты микроядер у детей, проживающих в «загрязненных» нефтепродуктами селах Мескер-Юрт ($1,98 \pm 0,34$) и Долинск ($1,72 \pm 0,39$) по сравнению с частотой микроядер у детей из экологически «чистых» территорий Гойты ($0,43 \pm 0,18$), Червленая ($0,48 \pm 0,22$), Ачхой - Мартан ($0,54 \pm 0,11$). В высокогорных селах наблюдалась повышенная частота микроядер - Зандак ($0,74 \pm 0,28$) и Шатой ($0,84 \pm 0,36$). Мы предполагаем, что причиной этих отличий внутри «чистого» района может служить повышенный фон природной ионизирующей радиации и УФ – облучения в горной местности. Экзогенными природными источниками повреждений ДНК являются солнечный свет, естественный фон ионизирующей радиации (Засухина, 2011). В тоже время в «загрязненном» Николаевске отмечен более низкий уровень микроядер ($0,49 \pm 0,29$), что, возможно, связано с невысокой концентрацией ПАУ, в том числе бенз[а]пирена, анализы содержания, которых не проводились.

Средние частоты микроядер достоверно отличались, составляя у детей в «загрязненных» районах 1.54 ± 0.23 на 1000 просмотренных клеток и 0.58 ± 0.09 в «чистых» районах на 1000 клеток ($p=4.8 \cdot 10^{-9}$) (рис.1).

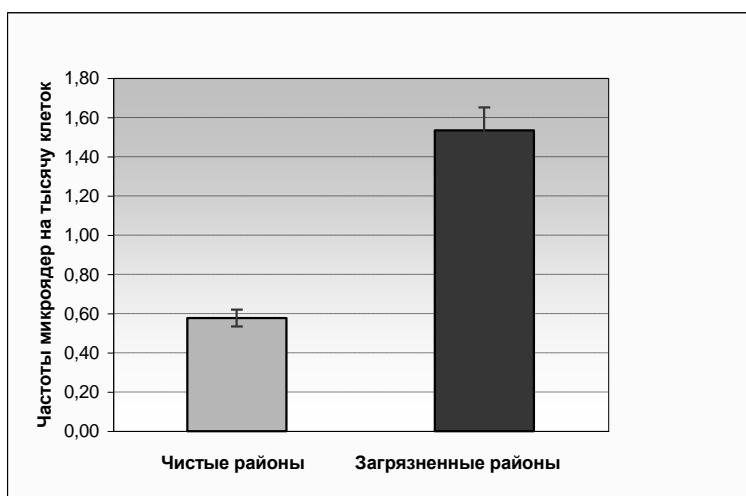


Рисунок 1. Средние частоты микроядер у детей, проживающих в «чистых» и загрязненных нефтепродуктами районах.

У 58% детей из экологически чистых населенных пунктов не было зарегистрировано микроядер. По 3 микроядра на 1000 клеток имели всего 2% детей. В «загрязненных» нефтепродуктами районах число детей, не имевших микроядер на 1000 клеток, составило только 33%, и в то же время у 27% детей было выявлено по 1 микроядру, по 2 и 3 микроядра имели 20% и 8% детей соответственно. Повышенное количество микроядер (4 и больше) зарегистрировано только у детей из загрязненных нефтепродуктами территорий (рис.2).

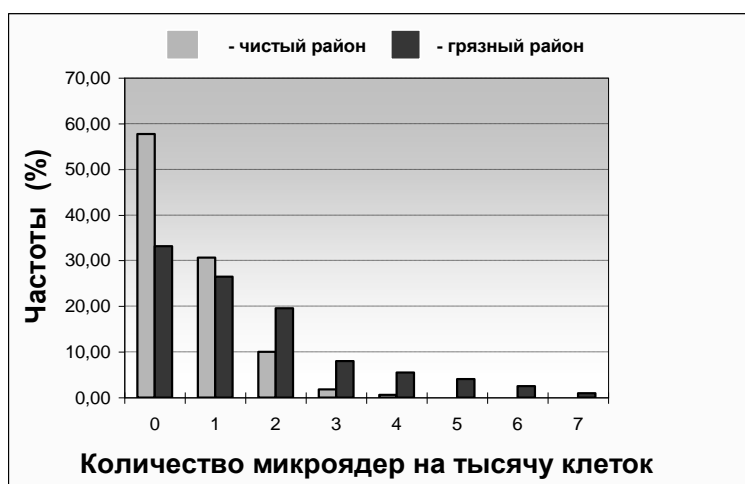


Рисунок 2. Распределение частот клеток с микроядрами у детей, проживающих в загрязненных и экологически «чистых» районах.

Эффективность микроядерного теста для обнаружения генотоксического действия продуктов нефтепереработки подтверждается результатами ROC-анализа (рис.3).

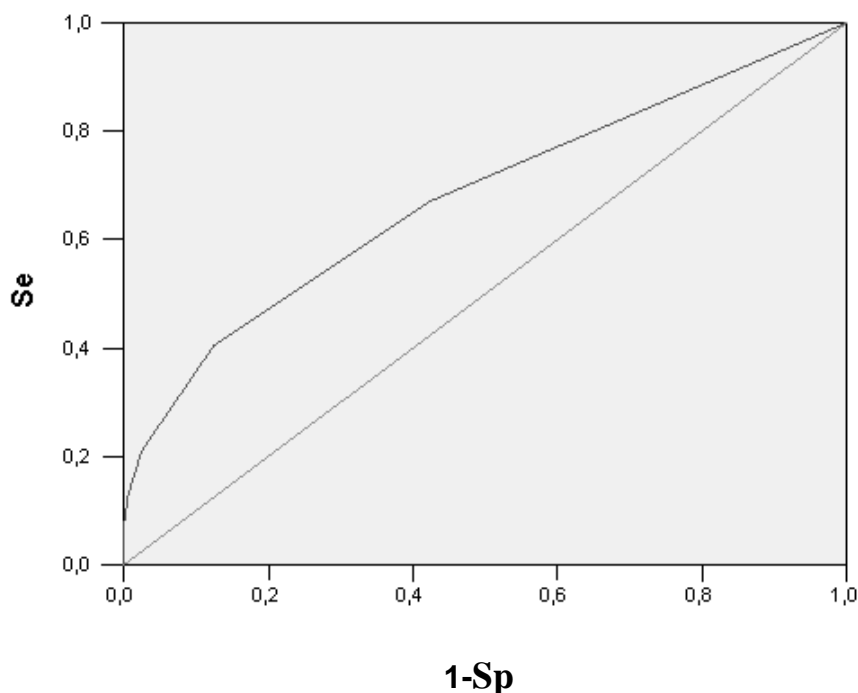


Рисунок 3. ROC-кривая, построенная по распределениям, представленным на рисунке 2.

Кривая отражает зависимость чувствительности теста (Se) от специфичности (Sp) при изменении порогового значения числа микроядер, превышение которого свидетельствует о наличии загрязнения окружающей среды. Площадь под ROC-кривой равна $AUC=0,677 \pm 0,025$ ($p\text{-value} = 8 \cdot 10^{-12}$).

Изучение полиморфных вариантов генов у детей чеченской популяции.

Результаты изучения аллельных вариантов генов оксидативного ответа *SOD2* C47T, *CAT* T21A, *GCLC* C129T представлены в таблице 4.

Таблица 4

Частоты генотипов полиморфных генов *SOD2* C47T, *CAT* C129T, *GCLC* C129T у детей, проживающих на территории, загрязненной нефтепродуктами и в группе сравнения

№ п/п	Локусы и генотипы		Контроль			Экспонированные		
			N	%	P	N	%	P
1	<i>SOD2</i> C47T rs4880	T/T	108	34,07	0,42	49	34,03	0,18
		T/C	160	50,47		63	43,75	
		C/C	49	15,46		32	22,22	
2	<i>CAT</i> T21A rs7943316	T/T	151	46,60	0,27	78	41,49	0,05
		T/A	146	45,06		77	40,96	
		A/A	27	8,33		33	17,55	
3	<i>GCLC</i> C129T rs17883901	C/C	282	88,68	0,29	144	89,44	0,48
		C/T	36	11,32		17	10,56	
		T/T	0	0		0	0	

N - количество человек;

% - частота встречаемости данного генотипа;

P – значимость отличий от распределения Харди-Вайнберга.

Проведенный анализ полиморфизма гена *SOD2* C47T показал, что частота гетерозиготного генотипа T/C в экспонированной группе составляет 43,8%, что несущественно отличается от таковой в группе контроля - 50,5%. Определено, что частота мажорного генотипа T/T в группе экспонированных лиц и в группе сравнения составила 34,0% и 34,1% соответственно. Среди экспонированных лиц частота минорного генотипа C/C гена *SOD2* C47T составила 22,2%, а в контрольной группе частота встречаемости данного генотипа - 15,5%.

В данной работе частота гетерозиготного генотипа T/A гена *CAT* T21A в группе экспонированных лиц и в группе сравнения составила 41,0% и 45,1% соответственно. Частота мажорного генотипа T/T у детей из загрязненных сел (46,6%) и в контрольной группе (41,5%) одинакова, в то время как частота минорного генотипа A/A гена *CAT* T21A у детей из экспонированной группы существенно выше (17,6%) встречаемости данного генотипа у детей из экологически «чистых» населенных пунктов (8,3%).

Как видно из табл. 4. распределение частот генотипов гена *GCLC* C129T одинаково в контрольной и в экспонированной группах (значимость отличий от распределения Харди-Вайнберга составила $p = 0,29$ и $p = 0,48$ соответственно). Частота мажорного генотипа C/C составила 89%, гетерозиготного генотипа C/T - 11%, минорного T/T - 0%.

Распределение генотипов изученных полиморфных вариантов генов оксидативного ответа *SOD2* C47T, *CAT* T21A, *GCLC* C129T, как в контрольной выборке, так и в группе экспонированных соответствовало ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга.

Исследование и анализ частот полиморфных генов детоксикации ксенобиотиков.

Нами были установлены частоты генотипов и аллелей полиморфных генов детоксикации ксенобиотиков *CYP1B1*(G1294C), *CYP1A1*(T606G, A4889G, T3801C), *GSTM1*, *GSTT1* и *NQO1*(609C>T) у детей, проживающих на загрязненной нефтепродуктами территории, и в группе контроля (табл. 5).

В контрольной группе отклонение от равновесия Харди – Вайнберга, обусловленное избытком гетерозигот, обнаружено для *CYP1B1* G1294C ($p=0.008$), также избыток гетерозигот наблюдается по локусу *CYP1A1* A4889G ($p=0.010$). В остальных случаях частоты аллельных вариантов соответствовали распределению Харди-Вайнберга.

Проведенное в данной работе исследование частоты генотипов и аллелей локуса *CYP1A1* T3801C не выявило существенных различий между экспонированной и контрольной группой, и составили в экспонированной группе: T/T - 88,4%, C/C – 0%, T/C - 11,6%; в контрольной группе - 84,7% ,0% и 15,26%, соответственно.

Распределение частот генотипов локуса *CYP1A1* T606G в экспонированной группе (T/T - 27,1%, T/G - 57,8%, G/G - 15,1%) также не отличалось от группы сравнения (T/T - 34,5%, T/G - 48,9%, G/G - 16,6%). Частоты гомозиготных генотипов локуса *CYP1A1* A4889G по мажорному (A/A) и минорному аллелю (G/G) отличались незначительно в экспонированной (85,4% и 0%) и контрольной группах (90,4% и 0%). По гетерозиготному генотипу A/G наблюдается повышенная частота в экспонированной группе (14,6%), по сравнению с контрольной (9,6%). В проведенном исследовании частота нулевого генотипа по гену *GSTM1* не различалась и составляла 56,1% и 53,0% в группе контроля и группе экспонированных детей, соответственно (табл.5).

Как видно из табл. 5., нами не выявлено различий в частоте встречаемости как нулевого генотипа Del/Del гена *GSTT1* в группе экспонированных лиц 12,5% и в группе сравнения 11,4% так и нормального аллеля I/* 87,5% и 88,7%. Полученные результаты соответствуют данным литературы: частота делеции гена *GSTT1* варьирует от 15% до 30% в европеоидных популяциях. (Баранов В.С. с соавт., 2000; Garte et al., 2001).

Распределения частот генотипов гена *NQO1* 609C>T в группе сравнения и в экспонированной группе также не различаются. Частота генотипа C/C составила 57,2% и 60,8%, C/T - 36,8% и 33,6% ,T/T около 6%.

Полученные частоты как для генов *GSTT1* и *GSTM1*, так и для остальных полиморфных вариантов генов системы детоксикации ксенобиотиков, изученных в настоящей работе близки к значениям в других европеоидных популяциях.

Таблица 5

Частоты генотипов и аллелей полиморфных генов *CYP1B1* (G1294C), *CYP1A1* (T606G, A4889G, T3801C), *GSTM1*, *T1*, *NQ01* в изученной выборке

№ п/ п	Локусы и генотипы		Контроль			Экспонированные		
			N	%	P	N	%	P
1	<i>CYP1A1</i> T3801C rs4646903	C/C	0	0,00	0.2	0	0,00	0.42
		T/C	49	15,26		20	11,56	
		T/T	272	84,74		153	88,44	
2	<i>CYP1A1</i> T606G rs2606345	G/G	54	16,62	0.85	29	15,10	0.02
		T/G	159	48,92		111	57,81	
		T/T	112	34,46		52	27,08	
3	<i>CYP1A1</i> A4889G rs1048943	A/A	282	90,38	0.010	169	85,35	0.29
		A/G	30	9,62		29	14,65	
		G/G	0	0		0	0	
4	<i>CYP1B1</i> G1294C rs1056836	C/C	213	65,94	0.008	134	69,07	0.16
		C/G	107	33,13		51	26,29	
		G/G	3	0,93		9	4,64	
6	<i>GSTM1</i>	D/D	183	56,13	-	106	53,00	-
		I*	143	43,87		94	47,00	
7	<i>GSTT1</i>	D/D	37	11,35	-	25	12,50	-
		I*	289	88,65		175	87,50	
8	<i>NQ01</i> 609C>T	C/C	163	57,19	0.99	87	60,84	0.69
		C/T	105	36,84		48	33,57	
		T/T	17	5,96		8	5,59	

Здесь и далее* означает произвольный аллель.

N - количество человек;

% - частота встречаемости данного генотипа, аллеля;

P - значимость отличий от распределения Харди-Вайнберга.

Изучение и анализ полиморфных вариантов генов ферментов репарации

Проведенное исследование полиморфизма генов репарации установило, что в обеих исследуемых группах статистически значимых различий в распределении частот генотипов нет. В гене *XRCC1* C589T контрольной и экспонированной группах выявлены одинаковые частоты генотипов (C/C - 93,8% и 92,9%; C/T - 6,2% и 7,1%; T/T - 0% и 0% соответственно). Аналогичная картина наблюдается по генам: *XRCC1* G1996A (A/A - 11,5% и 11,9%; G/A - 46,4% и 49,5%; G/G - 42,1% и 38,5%), *APEX1* T444G (G/G - 44,7% и 44,1%; G/T - 45,7% и 46,9%; T/T - 9,5% и 9,0%), *ATM* G5557A (G/G - 16,3% и 18,8%; G/A -

83,7% и 81,2%; A/A - 0% и 0%), *OGGI* C977G (C/C - 51,72% и 54,1%; C/G - 38,2% и 37,5%; G/G - 10,0% и 8,5%).

Генотипирование *ABCB1* T3435C показало, что в экспонированной группе частота минорного генотипа выше C/C - 25,61%, чем в группе контроля - 16,88%, а частоты мажорного и гетерозиготного генотипа в обеих группах отличаются незначительно (T/C - 49,5% и 45,5%, T/T - 33,4% и 28,7%).

Разница частот мажорного, гетерозиготного и минорного генотипов гена *ADPRT* 285T>C в обеих изучаемых группах составила: C/C - 3,42% и 1,66%, T/C - 30,43% и 24,86%, T/T - 66,15% и 73,48%.

При изучении распределения генотипов гена *ERCC1* T354C у детей из загрязненных районов выявлено, что частоты минорного, гетерозиготного и мажорного генотипов (C/C - 21,39%, T/T - 19,65%, T/C - 46,2%) незначимо отличаются от частот генотипов детей из контрольной группы (C/C - 32,91%; и T/T - 20,89%; T/C - 58,9%).

При исследовании полиморфизма гена эксцизионной репарации *XPB* T2251G (Lys751Gln) у детей чеченской популяции выявлено, что частоты генотипов в обеих исследуемых выборках одинаковы: T/G - 55,0%; T/T - 24,26%; G/G - 20,7% в экспонированной группе и T/G - 48,7%; T/T - 25,0%; G/G - 26,3% в контрольной.

Частоты гетерозиготного и мажорного генотипов гена *XPB* G862A у детей из загрязненных сел незначимо выше (G/G - 32,1%, G/A - 51,2%) по сравнению с детьми из контрольной группы (G/G - 30,3%, G/A - 46,5%). При этом частоты минорного генотипа A/A в изученных выборках составили: 16,7% и 23,00%, соответственно.

Для изученных полиморфных вариантов генов репарации в обследованных выборках распределение генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Изучение и анализ полиморфных вариантов гена *MTHFR* C677T

При анализе частот генотипов гена *MTHFR* C677T у детей из контрольной группы и из загрязненных районов не были установлены значимые различия: C/C - 62,9% и 63,7%, C/T - 33,8% и 31,8%, T/T - 3,34% и 4,5%. Распределение частот генотипов соответствует ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга.

Изучив частоту полиморфных вариантов генов оксидативного ответа, детоксикации ксенобиотиков и генов репарации ДНК мы не обнаружили значимых различий в выборках обследуемых детей, за исключением минорного генотипа гена *CAT* T21A. У детей из загрязненных нефтепродуктами районов частота минорного генотипа в 2 раза выше по сравнению с детьми из контрольной группы. Ген *CAT* кодирует гемсодержащий фермент тканевого дыхания антиоксидантной защиты класса оксидоредуктаз катализирующий разложение перекиси водорода, образующиеся в ходе различных окислительных процессов в организме с образованием кислорода и воды. Возможно, что полиморфизм данного гена T21A связан с изменением активности фермента у минорного варианта (Young et al., 2006).

Ассоциативное исследование полиморфных маркеров изученных генов с уровнями цитогенетических нарушений у обследованных детей

Нами проведен анализ сопряженности полиморфных вариантов изученных генов систем биотрансформации ксенобиотиков, репарации и оксидативного ответа с частотой микроядер в эпителиоцитах слизистой оболочки ротовой полости у детей чеченской популяции, проживающих в разных эколого-ландшафтных районах: равнинных загрязненных нефтепродуктами и равнинно - высокогорных незагрязненных. Изменчивость цитогенетических показателей для выборки в целом оказалась достаточно высокой (в загрязненных районах 1.54 ± 0.23 и 0.58 ± 0.09 в «чистых» районах на 1000 клеток), чтобы обеспечить возможность поиска генотипических ассоциаций.

В настоящей работе выявлена сопряженность локуса *SOD2* с частотой микроядер в буккальных эпителиоцитах детей из загрязненных нефтепродуктами районов. У носителей минорного варианта 47С она была достоверно выше чем у детей с мажорным аллелем 47Т/* (2.16 ± 0.61 против 1.62 ± 0.15 ; $p=0.007$ по тесту Манна - Уитни). Для детей из чистых районов эти различия не были статистически значимыми: 47С - 0.69 ± 0.24 против $0,53 \pm 0,08$ для носителей мажорного аллеля 47Т/* гена *SOD2*.

Результаты исследований показали, что частота микроядер в клетках слизистой оболочки щеки детей из загрязненных районов выше у носителей минорного генотипа 21А гена *CAT* ($1,79 \pm 0,26$), чем у носителей мажорного и гетерозиготного генотипа ($1,57 \pm 0,61$), однако эти различия не были статистически значимыми.

На уровне однолокусных эффектов достоверные ассоциации получены также для полиморфных вариантов гена глутаматцистеинлигазы *GCLC*. При анализе частоты микроядер у детей из загрязненных зон установлено достоверное повышение частоты микроядер у детей с минорным вариантом гена *GCLC*. Частота микроядер в этой группе составила $24 \pm 1,02$, что в 1,4 раза выше, чем в группе носителей мажорного аллеля этого гена, в которой частота микроядер равнялась - $1,69 \pm 0,28$, ($p=0,027$ по тесту Манна - Уитни).

Минорный вариант 129 Т сайта *GCLC* C129Т обуславливает пониженную активность промотора и, как результат, более низкий уровень глутатиона в плазме крови у гомозигот Т/Т (Cortes-Wanstreet et al., 2009).

В исследованиях Сальниковой Л.Е. и других (2010) показано протективное влияние варианта 21А *CAT* на радиационно-индуцированный уровень хромосомных aberrаций. У ликвидаторов аварии ЧАЭС, гетерозиготные по сайту *SOD2* С47Т, уровень хромосомных aberrаций значимо не превышал контрольное значение этого же показателя, а также частоты aberrаций в лимфоцитах человека на спонтанном и индуцированном уровне не зависят от полиморфизма С47Т гена *SOD2*. Уровень спонтанных и индуцированных aberrаций для носителей разных генотипов локуса *GCLC* значимо не различался.

В настоящей работе анализ двухлокусных сочетаний в выборках показал, что в когорте детей из загрязненных районов сочетание минорных вариантов генов *SOD2* и *GCLC* ассоциирован с повышенной частотой микроядер, а у детей из незагрязненных районов такой сопряженности нет.

Дети с минорными вариантами генотипов гена С/Т *GCLC* и 21А гена *CAT* из загрязненных территорий более чувствительны к нефтехимическому загрязнению. У таких детей выявлена повышенная частота микроядер в буккальных эпителиоцитах щеки, по сравнению с детьми из экологически благополучных районов. Дети с двухлокусным сочетанием минорных генотипов 47С генов *SOD2* и 21А *CAT* имеют повышенный уровень частот микроядер в буккальных эпителиоцитах как в «чистых», так и в «грязных» районах.

Сочетание минорных генотипов генов *SOD2*47С, *CAT* 21А и *GCLC* увеличивает частоты микроядер в эпителиоцитах, т.е. является «предрасполагающим» генотипом (рис.4). Регрессионный анализ зависимости частоты микроядер от суммарного числа минорных аллелей генов оксидативного ответа (*GCLC*, *SOD2* и *CAT*) показал, что эта зависимость четче выражена для детей из загрязненных нефтепродуктами территорий (p-value = 0,016).

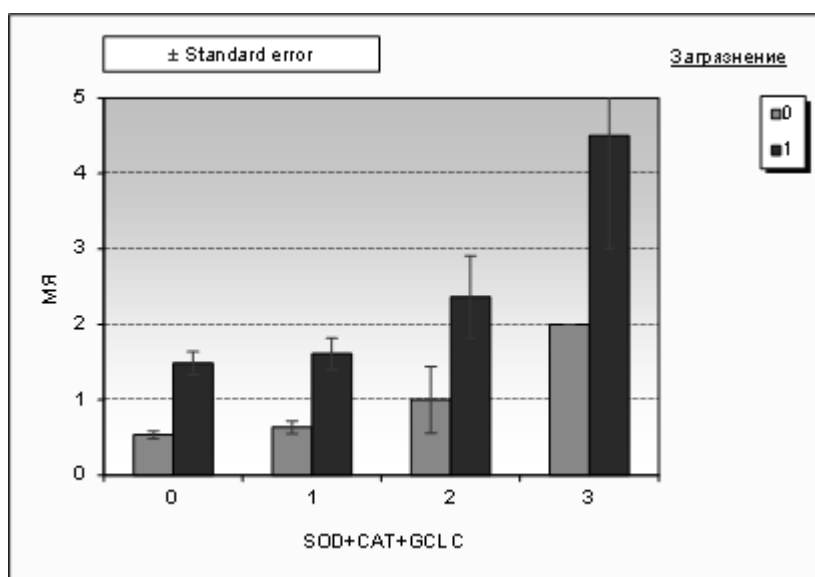


Рисунок.4. Зависимость частоты микроядер от суммарного числа минорных аллелей генов оксидативного ответа у детей чеченской популяции (0 – чистый район, 1 – загрязненный район)

Таким образом, проведенный анализ сопряженности полиморфных вариантов генов оксидативного ответа, репарации и детоксикации ксенобиотиков с цитогенетическими аномалиями подтвердил данные литературы о существовании так называемых «защитных» и

«предрасполагающих» генотипов (Сидорова, 2004, 2005; Григорьева, 2007). Показано, что у детей чеченской популяции, проживающих в районах с повышенным уровнем загрязнения нефтепродуктами, «протективными» генами являются мажорные (преобладающие по частоте) аллели генов оксидативного ответа (*SOD2*, *CAT* и *GCLC*) и их комбинации.

ВЫВОДЫ:

1. Показана однородность сравниваемых групп детей чеченской популяции по аллельным вариантам полиморфных генов 1-й и 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков, оксидативного ответа, репарации ДНК и гена *MTHFR*.

2. При кариологическом анализе буккальных эпителиоцитов детей, проживающих в загрязненных районах Чеченской республики, обнаружен достоверно повышенный уровень частоты микроядер по сравнению с данным показателем в контрольной группе;

3. Согласно ROC-анализу наличие в буккальных эпителиоцитах более двух микроядер однозначно свидетельствует о загрязнении окружающей среды генотоксикантами.

4. Уровень микроядер в клетках буккального эпителия детей, проживающих в зоне загрязнения нефтепродуктами, статистически значимо сопряжен с полиморфными вариантами генов оксидативного ответа (*SOD2*, *GCLC*, и *CAT*), а именно пропорционален числу минорных аллелей данных локусов ($p = 0,016$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Абилов С.К. Сычева Л.П., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В. Комплексное исследование мутагенного действия загрязнений почв нефтепродуктами в Чеченской республике // «Санитария и гигиена» г. Москва, №5, 2011.С.50-55.

2. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В., Абилов С.К. Анализ сопряженности цитогенетических аномалий у детей чеченской популяции в связи с полиморфизмом генов детоксикации ксенобиотиков и генов оксидативного ответа // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН г. Нальчик, №4, 2012.С.256-262.

3. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В., Абилов С.К. Связь полиморфных вариантов генов детоксикации ксенобиотиков, *SOD2* и *CAT* с частотой микроядер у детей // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН г. Нальчик, № 1, 2013.С.201-205.

Статьи в сборниках и тезисы конференций:

1. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Абилов С.К., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В. Сравнительное ассоциативное исследование частот микроядер у чеченских детей, проживающих на чистых и загрязненных территориях // Сб. научных трудов посвященный 35-летию образования биолого-химического факультета и факультета геоэкологии ЧГУ, Грозный. 2010. №2.С.95.
2. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Абилов С.К., Сычева Л.П. Исследование ассоциации частот клеток с микроядрами у детей, проживающих на чистых и загрязненных нефтепродуктами территориях, с полиморфизмом генов детоксикации и репарации // Материалы объединенного пленума научных советов РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды, 15-16 декабря, Москва. 2010.С.173-175.
3. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Абилов С.К., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В. Исследование полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков у чеченских детей // Материалы между. молодежной конференции «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы» посвященной 75-летию со дня рождения ак. Ю.П. Алтухова, 17-18 ноября, Москва. 2011.С.42.
4. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М. Генетический полиморфизм генов детоксикации у чеченских детей, проживающих на чистых и загрязненных территориях // Всероссийская ежегодная научно- практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, конференция «Наука и молодежь» 3-4 июня, Грозный. 2011.С.63.
5. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Сычева Л.П. Исследование врожденных морфогенетических вариантов и микроядер у детей, проживающих на чистых и загрязненных нефтепродуктами территориях ЧР // «Вестник Академии наук Чеченской Республики», №3. 2011.С. 159-164.
6. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Сычева Л.П. Исследование ВМГВ и микроядер у детей, проживающих на чистых и загрязненных нефтепродуктами территориях ЧР // Материалы Всероссийской конференции «Наука и образование в ЧР: состояние и перспективы», Грозный. 2011.С. 268-270.
7. Солтаева А. М.-Х., Джамбетова П.М., Рубанович А.В., Абилов С.К. Исследование взаимосвязи полиморфизма генов оксидативного ответа с частотой микроядер в клетках буккального эпителия детей // Международный сборник научных трудов, посвященный году Германии в России «Естественные и гуманитарные науки – устойчивому развитию общества». М.: ООО «ПКЦ Альтекс», 2012.С. 233-240.