АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности «6D070100- Биотехнология»
Ботбаева Даурена Муслимовича на тему: «Разработка способа оценки генетической устойчивости к хроническому воздействию малых доз радиации»

Общая характеристика работы

Казахстан является одной из ведущих стран мира по запасам урана, а работники, занятые в его добыче, и местные жители могут подвергаться воздействию хронического радиационного облучения в малых дозах. Данная диссертационная работа посвящена поиску ассоциаций генетических полиморфизмов генов, участвующих в ключевых молекулярно-клеточных процессах, связанных с радиорезистентностью организма, с длительным профессиональным воздействием малых доз ионизирующего излучения, а также анализу радиационно-индуцированных изменений генетического материала работников уранодобывающих предприятий, жителей близлежащих районов и медицинских работников, подвергающихся хроническому радиационному воздействию.

Хроническое влияние малых доз радиоактивного излучения на организм человека, в частности на его генетический материал, остаётся слабо изученной областью. Исследование генетических вариантов, ассоциированных с радиочувствительностью или радиорезистентностью, представляет научный и практический интерес, поскольку они могут рассматриваться в качестве маркеров. В перспективе, такие маркеры могут быть использованы для оценки индивидуальной генетической предрасположенности к радиочувствительности лиц, подвергающихся хроническому воздействию малых доз радиации, для совершенствования подходов к профессиональному отбору и разработки профилактических мероприятий в группах повышенного риска.

Ограниченность сведений о генетических факторах, связанных с индивидуальными различиями в ответе на хроническое воздействие малых доз ионизирующего излучения, свидетельствует о необходимости исследований в данном направлении.

Актуальность темы исследования

Воздействие высоких доз радиации на генетический материал человека хорошо изучено и связано с серьезными повреждениями ДНК, мутациями и повышенным риском онкологических заболеваний. Однако влияние малых доз радиации при длительном облучении остается недостаточно исследованным аспектом. Это особенно актуально для лиц, подвергающихся профессиональному или экологическому облучению, когда низкие дозы радиации накапливаются в течение длительного времени.

Казахстан, занимая второе место в мире по разведанным запасам природного урана и производя значительную часть мирового урана (по данным World Nuclear Association), сталкивается с особыми вызовами, связанными с хроническим радиационным воздействием. Хроническое воздействие малых доз радиации может приводить к накоплению мутаций в генетическом материале, что увеличивает риск развития заболеваний, прежде всего онкологических, кроме того, имеются риски появления наследственных патологий. Таким образом, добыча и переработка урана создают риски для здоровья работников и местных жителей, что подчеркивает важность исследований долгосрочных эффектов низких доз радиации.

Важную роль в защите генетического материала играют системы репарации ДНК, которые восстанавливают повреждения, вызванные радиацией. Генетическая вариабельность компонентов систем репарации ДНК может обусловливать индивидуальные различия в эффективности устранения радиационно-индуцированных повреждений и, как следствие, в радиочувствительности организма. Понимание механизмов работы систем репарации ДНК и роли генетической вариабельности в их

функционировании создает предпосылки для разработки методов оценки индивидуальной радиочувствительности, совершенствования подходов к профессиональному отбору и внедрения эффективных профилактических мер. Таким образом, исследования в этой области имеют важное значение, способствуя снижению рисков для здоровья и повышению безопасности в условиях радиационного воздействия, что особенно актуально для стран с развитой урановой промышленностью, таких как Казахстан.

Помимо систем репарации ДНК, определенный интерес представляет возможная роль иммунного ответа в формировании индивидуальной реакции на хроническое воздействие малых доз ионизирующего излучения. Предполагается, что длительное радиационное воздействие может влиять на функционирование иммунной системы, однако имеющиеся данные остаются ограниченными и нередко противоречивыми. Дальнейшее изучение генетических факторов, связанных с иммунным ответом, может способствовать более полному пониманию механизмов индивидуальной радиочувствительности.

Цель исследования

Определение генетических вариантов, ассоциированных с радиорезистентностью, путем исследования полиморфизмов и мутаций функционально значимых генов у лиц, подвергшихся хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения.

Задачи исследования:

1. Сформировать коллекцию образцов крови и ДНК работников урановой промышленности, жителей прилегающих территорий, медицинских работников, подвергающихся воздействию низких доз ионизирующего излучения в профессиональной деятельности, а также жителей регионов с естественным радиационным фоном (контрольная группа).
2. Изучить ассоциацию полиморфизмов генов, регулирующих клеточный цикл, апоптоз и ангиогенез, а также участвующих в системе репарации ДНК, с резистентностью к воздействию низких доз ионизирующего излучения.
3. Исследовать уровень мутационных изменений в генах иммунной системы при хроническом воздействии низких доз ионизирующего излучения.
4. Разработать методический подход к оценке генетической предрасположенности к хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения.

Объекты исследования

Объектом исследования явилась ДНК работников уранодобывающих и перерабатывающих предприятий и жителей близлежащих районов в Казахстане, а также медицинских работников, подвергшихся малодозовому радиационному облучению в Италии. Эти группы представляют уникальный источник данных для изучения последствий длительного радиационного воздействия. В качестве контроля использовалась ДНК здоровых доноров из регионов с нормальным радиационным фоном.

Предмет исследования

Полиморфизм ДНК, ассоциированный с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации, а также изменения в ДНК, вызванные хроническим воздействием малых доз радиации.

Методы исследования

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLP), Реал-тайм ПЦР (RT-PCR), Секвенирование по Сэнгеру, TaqMan Assay.

Научная новизна

В исследовании впервые проведена оценка влияния малых доз ионизирующего излучения на изменения в геноме работников уранодобывающих предприятий Казахстана, и впервые представлены данные об ассоциациях аллельных вариантов некоторых генов, регулирующих клеточный цикл, апоптоз и ангиогенез, вовлеченных в систему репарации ДНК, с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации. По полиморфизмам генов *TP53* и *CDKN1A*, участвующих в регуляции клеточного цикла и апоптоза, были выявлены достоверные генотипические и аллельные различия между профессионально облучёнными группами и контрольной выборкой, что обосновывает возможность использования этих генов в качестве биомаркеров генетической предрасположенности к чувствительности к радиационной экспозиции. В то же время, изученные значимые полиморфизмы в генах *VEGF, RAD51, XPD, XRCC1* и *IFNα-2b* не показали ассоциацию с устойчивостью к воздействию малодозовой радиации. Это исследование явилось одним из первых фундаментальных работ в Казахстане, посвящённых генетическим аспектам профессионального радиационного риска, формируя научно-практическую базу для дальнейших разработок в области радиационной эпидемиологии, генетического скрининга и профилактической медицины.

Теоретическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе индивидуальных различий в ответе на хроническое воздействие малых доз ионизирующего излучения. Проведённое исследование позволило выявить ассоциации отдельных аллельных вариантов генов, участвующих в процессах репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза с длительным хроническим воздействием малых доз ионизирующего излучения. Полученные данные указывают на то, что молекулярные механизмы радиационной устойчивости могут действовать на разных уровнях биологической регуляции. Исследование расширяет понимание многоуровневой природы радиационной устойчивости, предполагая взаимодействие между различными системами. Проведенная работа послужит основой для дальнейших исследований в данной области.

Практическая ценность

Практическая ценность работы заключается в получении данных, которые могут служить основой для разработки генетических маркеров оценки предрасположенности к индивидуальному ответу на хроническое воздействие малых доз ионизирующего излучения у работников урановых рудников, медицинских работников радиологического профиля, а также жителей радиационно опасных территорий. В перспективе такие маркеры могут использоваться для выявления лиц с повышенной чувствительностью или устойчивостью к радиационному воздействию и производить грамотный профессиональный отбор и своевременно принимать профилактические меры. Полученные результаты могут найти применение в радиационной гигиене, медицине труда и профессиональной генетике, а также использоваться при разработке нормативно-методических документов и совершенствовании программ генетического мониторинга.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полиморфизм в интроне 6 гена *TP53* ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения: аллель A связан с более высокой радиорезистентностью, тогда как аллель G — с более низкой радиорезистентностью. Инсерционный полиморфизм в интроне 3 гена *TP53* также ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения: наличие инсерции связано с более высокой радиорезистентностью, а делеции — с более низкой радиорезистентностью.
2. Полиморфизм Arg72Pro (rs1042522), расположенный в экзоне 4 гена *TP53*, ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения: аллель C (Pro) связан с более высокой радиорезистентностью, тогда как аллель G (Arg) — с более низкой радиорезистентностью.
3. Полиморфизм в кодоне 31 гена *CDKN1A* ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения: аллель C связан с более высокой радиорезистентностью, тогда как аллель A — с более низкой радиорезистентностью.
4. Предложена методика оценки генетической предрасположенности к хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения. Она может быть использована при отборе персонала для работы в условиях повышенного радиационного фона.

Основные результаты и выводы исследования

1. Сформирована коллекция образцов крови и коллекция образцов ДНК работников урановой промышленности (511 образцов), жителей близлежащих районов (100 образцов), медицинских работников, подверженных воздействию малых доз радиации на рабочем месте (21 образец), а также жителей районов с нормальным радиационным фоном (300 образцов).
2. Были выявлены значимые ассоциации четырех полиморфных участков генов TP53 и CDKN1A с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации. Статистически значимые различия в распределении генотипов и аллелей были выявлены между группами работников СТКХК и контролей, между группами шахтёров месторождения «Балкашинское» и контролями в 3-м интроне, 6-м интроне, 4-м экзоне гена TP53 и в 31 кодоне гена CDKN1A. Выявленные отдельные различия в распределении аллелей и генотипов между этническими группами не оказали существенного влияния на общую картину выявленных ассоциаций, а наблюдавшиеся расхождения, вероятно, могут быть обусловлены ограниченным объемом выборки, особенно среди лиц казахской национальности. Полученные данные свидетельствуют о потенциале использования полиморфизмов генов TP53 и CDKN1A в качестве молекулярно-генетических маркеров генетической предрасположенности к радиочувствительности/радиорезистентности, которые могут быть применены для оценки профессионального риска и проведения обоснованного медико-генетического отбора лиц, работающих в условиях ионизирующего излучения. Несмотря на то, что гены VEGF, RAD51, XPD, XRCC1 и APC являются ключевыми в механизмах радиационной устойчивости, наше исследование не выявило значимых различий в распределении аллелей и генотипов между группами в исследованных полиморфизмах данных генов.
3. При анализе гена IFNα-2b у работников уранодобывающих предприятий и медицинских работников, подвергающихся хроническому воздействию малых доз ионизирующего излучения на рабочем месте, мутационные изменения не были выявлены. Несмотря на то, что в нашем исследовании свидетельств повышения уровня мутационных изменений под воздействием длительного низковозового облучения, получено не было, учитывая неоднозначность имеющихся литературных данных, а также

относительно небольшое покрытие при секвенировании в нашей работе, необходимы дополнительные исследования для подтверждения/опровержения наших результатов.

4. На основе выявленных молекулярно-генетических вариантов предложен один из возможных подходов к оценке генетической предрасположенности к индивидуальному ответу на хроническое воздействие малых доз ионизирующего излучения, который после дальнейшей валидации может рассматриваться для использования при профессиональном отборе в сферах деятельности, связанных с повышенным радиационным фоном.

Связь работы с государственными программами и планами

Научно-техническая программа (НТП): О.0457 «Сохранение и пополнение коллекций растений, животных и микроорганизмов, а также сохранение уникальных генетических банков для обеспечения сохранения биологического разнообразия Казахстана» (2011–2015 гг.). Задание 1**:** «Создание банка ДНК работников урановых рудников, подвергшихся хроническому воздействию низких доз ионизирующего излучения, и их молекулярно-генетическая характеристика. Создание электронной базы данных генотипов лиц, подвергшихся хроническому воздействию низких доз радиации». Научно-техническая программа (НТП): О.0592 «Разработка отечественных геномно-протеомных и клеточных технологий для нужд медицины, сельского хозяйства и охраны окружающей среды Казахстана» (2012–2014 гг.). Задание 2: «Молекулярно-генетический мониторинг последствий воздействия низких доз ионизирующего излучения у персонала предприятий по добыче и переработке урана». Практическая часть научной работы была реализована на базе Института молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина, а также на кафедре фармакологии и биотехнологии Университета Болоньи (Италия) в 2018 году.

Апробация работы:

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих научных конференциях: Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Мир Фараби» (2014–2018 гг., Алматы, Казахстан); Конференция «Медико-биологические и радиоэкологические проблемы уранодобывающих регионов», посвященная 10-летию Института радиобиологии и радиационной защиты (2015 г., Астана, Казахстан); Международная научная конференция молодых ученых, посвящённая 40-летию Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (2019 г., Алматы, Казахстан); XVIII Международная научно-практическая конференция «Российская наука в современном мире» (2018 г., Москва, Россия); Материалы Международной научно-практической конференции «Сәтбаев оқулары – 2021» (2021 г., Алматы, Казахстан).

Структура диссертации

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 14 печатных трудах, включая 2 статьи в международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Knowledge с импакт-фактором, 7 статей в изданиях, входящих в перечень Комитета по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования, 5 тезисов в материалах международных конференций, а также получены 1 акт внедрения, 1 патент и 1 патент на полезную модель.

Структура и объем диссертационной работы:

Диссертационная работа изложена на 148 страницах и включает следующие разделы: определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, список использованных источников и приложения.

Список использованных источников включает 282 наименования. Работа содержит 26 таблиц и 19 рисунков.