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 изучению генетических полиморфизмов, ассоциированных с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиационного излучения, и анализу радиационно-индуцированных изменений в генетическом материале работников уранодобывающих предприятий, жителей близлежащих районов и медицинских работников, подвергающихся хроническому радиационному облучению на рабочем месте.

Хроническое влияние малых доз радиоактивного излучения на организм человека, в частности на его генетический материал, остаётся слабо изученной областью, особенно в контексте генетической устойчивости. Исследование генетических полиморфизмов, ассоциированных с радиочувствительностью или устойчивостью к малым дозам радиации, является важным, поскольку эти полиморфизмы могут использоваться в качестве маркеров. Такие маркеры позволят оценивать индивидуальную радиочувствительность лиц, подвергающихся хроническому воздействию малых доз радиации, для оптимизации профессионального отбора и профилактики заболеваний в группе риска.

Ограниченность данных о генетических факторах устойчивости к хроническому радиационному облучению в малых дозах подчеркивает значимость данного исследования.

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 потенциальные 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. Индивидуальные различия в эффективности этих защитных систем организма могут существенно влиять на радиочувствительность и устойчивость к хроническому воздействию малых доз радиации. Понимание механизмов работы систем репарации ДНК и их вариабельности позволит разработать методы оценки индивидуальной радиочувствительности, оптимизировать профессиональный отбор и внедрить эффективные профилактические меры для защиты

здоровья. Таким образом, исследования в этой области имеют высокую научную и практическую значимость, способствуя снижению рисков для здоровья и повышению безопасности в условиях радиационного воздействия, что особенно актуально для стран с развитой урановой промышленностью, таких как Казахстан.

Хроническое воздействие малых доз радиации может влиять на иммунную систему, потенциально ослабляя её и снижая способность организма противостоять инфекциям, однако имеющиеся данные противоречивы. Кроме того, вызывают интерес реакция организма путем эпигенетических изменений (метилирование ДНК, модификации гистонов, экспрессия некодирующих РНК) в ответ на длительное радиационное облучение в малых дозах. Эти эффекты сложны и, очевидно, зависят от многих факторов, в том числе индивидуальных особенностей. Исследования в этой области важны для понимания последствий долгосрочного действия малых доз радиации на здоровье человека, разработки мер профилактики и обеспечения безопасности групп риска, таких как работники урановой промышленности и население регионов с повышенным радиационным фоном.

Цель исследования

Определение молекулярных маркеров, позволяющих оценить генетическую устойчивость и индивидуальную чувствительность к радиационному воздействию путём исследования полиморфизмов и мутаций функционально важных генов у лиц, подверженных малым дозам радиации.

Задачи исследования:

1. Сформировать коллекцию образцов крови, коллекцию образцов ДНК работников урановой промышленности, жителей близлежащих районов, медицинских работников, подверженных воздействию малых доз радиации на рабочем месте, а также жителей районов с нормальным радиационным фоном (группа контроля).
2. Изучить ассоциации значимых полиморфизмов генов, регулирующих клеточный цикл, апоптоз и ангиогенез, вовлеченных в систему репарации ДНК, с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации.
3. Изучить уровень мутационных изменений в генах иммунной системы при хроническом воздействии малых доз радиации.
4. Разработать способ оценки генетической устойчивости к хроническому воздействию малых доз радиации.

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 (p21), 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 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 диссертационной работы заключается в раскрытии вероятных молекулярных механизмов радиационной устойчивости. Проведённое исследование позволило установить, что определённые аллельные варианты генов системы репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза, а также иммунного ответа, ассоциированы с устойчивостью к хроническому воздействию радиации в малых дозах. 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 толчком для дальнейших исследований в данной области.

Практическая ценность

Практическая ценность работы заключается в возможности использования генетических полиморфизмов в качестве маркеров для оценки и систематического мониторинга индивидуальной устойчивости к хроническому воздействию радиации в малых дозах среди работников урановых рудников, медицинских работников радиологического профиля, а также жителей радиационно опасных территорий. Такие маркеры позволят выявлять лиц с повышенной чувствительностью или устойчивостью к радиационному воздействию и производить грамотный профессиональный отбор и своевременно принимать профилактические меры. Такой подход будет способствовать повышению уровня профессиональной безопасности и снижению риска развития радиационно обусловленных заболеваний. Результаты исследования могут быть внедрены в медицинскую практику, сферу радиационной гигиены и профессиональной генетики, а также использованы при разработке нормативно-методических документов и совершенствовании системы генетического мониторинга среди групп риска.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полиморфизм в 6-м интроне гена p53 ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации, при этом аллель A ассоциируется с повышенной радиорезистентностью, аллель G – с пониженной радиорезистентностью.
2. Инсерционный полиморфизм в 3-м интроне гена p53 ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации, при этом инсерция ассоциируется с повышенной радиорезистентностью, делеция – с пониженной радиорезистентностью.
3. Полиморфизм Arg72Pro (rs1042522) в 4-м экзоне гена p53 ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации, при этом аллель C (Pro) ассоциируется с повышенной радиорезистентностью, аллель G (Arg) – с пониженной радиорезистентностью.
4. Полиморфизм в 31-м кодоне гена p21 (CDKN1A) ассоциирован с устойчивостью к хроническому воздействию малых доз радиации, при этом аллель A ассоциируется с повышенной радиорезистентностью, аллель C – с пониженной радиорезистентностью.
5. Разработан метод оценки генетической устойчивости к хроническому воздействию малых доз радиации, который может быть применен для отбора персонала в сферах деятельности, связанных с повышенным радиационным фоном.

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 p53 и p21 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 p53 и в 31 кодоне гена p21. Выявленные достоверные различия в распределении аллелей и генотипов по некоторым из изученных полиморфизмов между этническими группами, а также несоответствия в найденных ассоциациях между ними, что говорит о важности учета этнического генетического фона в подобных исследованиях. Полученные данные свидетельствуют о потенциале использования полиморфизмов генов p53 и *p21* в качестве молекулярно-генетических маркеров индивидуальной радиочувствительности, 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. Хотя по гену APC статистически значимых различий не выявлено, некоторые выявленные тенденции требуют дальнейшего изучения.
3. Уровень мутационных изменений в гене IFNα-2b у работников уранодобывающих предприятий и медицинских работников, находящихся под воздействием малых доз радиации на рабочем месте, достоверно не отличался от такового в контрольной группе. Несмотря на то, что в нашем исследовании свидетельств повышения уровня мутационных изменений под воздействием длительного низковозового облучения, получено не было, учитывая несоответствующие литературные данные, а также относительно небольшое покрытие при секвенировании в нашей работе,

необходимы дополнительные исследования для подтверждения/опровержения наших данных.

4. На основе выявленных молекулярно-генетических маркеров разработан метод оценки генетической устойчивости к хроническому воздействию малых доз радиации, который может быть применен для отбора персонала в сферах деятельности, связанных с повышенным радиационным фоном.

Связь работы с государственными программами и планами

Диссертационная работа выполнена в соответствии с государственными программами и проектами Министерства науки и высшего образования и Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Исследование проводилось в рамках следующих инициатив: «Разработка молекулярно-генетической характеристики ДНК работников урановых рудников и создание электронной базы данных генотипов лиц, подвергшихся хроническому воздействию малых доз радиации» (2011–2015 гг.); «Снижение профессионального риска развития заболеваний среди работников урановой промышленности Республики Казахстан» (2013–2015 гг.); а также «Исследование и разработка методов снижения радиационного риска для населения, проживающего в зоне влияния хранилищ радиоактивных отходов» (2018–2020 гг.). 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 состоит из 125 страниц, включает разделы: термины, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение. Список использованных источников включает 262 наименования. Работа содержит 18 таблиц и 14 рисунков.