

THE SEARCH FOR GENETIC MARKERS IN THE DEVELOPMENT OF BRONCHOPULMONARY PATHOLOGY – THE STUDY OF *MLH1* (rs1799977) POLYMORPHISM OF THE MISMATCH DNA REPAIR

Andrushchenko T.A., Goncharov S.V., Dosenko V.E.

ПОШУК ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ РОЗВИТКУ БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ ПАТОЛОГІЇ – ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ *MLH1* (rs1799977) РЕПАРАЦІЇ «НЕВІДПОВІДНОСТЕЙ» ДНК

Б

ронхолегенева патологія (БЛП) професійної етіології посідає провідні позиції у структурі професійних захворювань і лишається вагомим проблемою медицини праці [1]. Нині надзвичайно актуальним є пошук генетичних маркерів до розвитку багатьох мультифакторних захворювань і підвищеної чутливості організму до певних несприятливих факторів. У структурі шкідливих і небезпечних професійних факторів, які зумовлюють розвиток БЛП, наявні такі, що можуть призводити до порушень у системі репарації ДНК: пил фіброгенної дії різного походження, хімічні речовини, фізичні фактори. Це, у свою чергу, може індукувати мутагенез у працівників певних професійних груп.

У клітині існує спеціальний механізм, що підтримує цілісність генетичної інформації і

відновлює «status quo» – це репарація ДНК. Найчастішими джерелами пошкодження спадкової інформації є ультрафіолетове випромінювання, радіація, хімічні речовини, помилки реплікації, апуринація і дезамінування [2]. Особливе місце серед клітинних систем посідає репарація «невідповідностей» ДНК-MMR (від англ. Mismatch repair). Завдяки системі MMR можна зберегти генетичну інформацію при попаданні організмів в умови, коли значно підвищується частота мутацій [3]. У результаті помилок за дії ДНК-полімерази, а також при рекомбінації у знову синтезованих ланцюгах ДНК з'являються некомплементарні залишки нуклеозидів: замість канонічних пар G-C і A-T у ДНК з'являються пари G-G, A-A, A-C, G-T, які локально викривляють подвійну спіраль макромолекули.

¹АНДРУЩЕНКО Т.А.,
²ГОНЧАРОВ С.В.,
²ДОСЕНКО В.Є.

¹ДУ «Інститут медицини праці ім. Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України», м. Київ
²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

УДК [575.113: 616.23/24-057] : 005

Ключові слова:
SNP, *MLH1*, бронхолегенева патологія.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАЗВИТИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ – ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА *MLH1* (rs1799977) РЕПАРАЦИИ «НЕСООТВЕТСТВИЙ» ДНК

¹Андрущенко Т.А., ²Гончаров С.В.,
²Досенко В.Е.

¹ГУ «Институт медицины труда им. Ю.И. Кундиева Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев
²Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев

В статье представлены результаты исследования полиморфизма гена *MLH1* (rs1799977) у шахтеров и работников асбестоцементных заводов с профессионально обусловленной бронхолегочной патологией.

Цель работы – изучить распределение частот генотипов гена *MLH1* (rs1799977) у работников вредных и опасных отраслей промышленности для выявления маркеров риска развития бронхолегочной патологии.

Материалы и методы. У 90 человек с бронхолегочной патологией и 124 респондентов исследова-

ния, которые работали в таких же условиях, но в анамнезе без заболеваний дыхательной системы, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени изучен полиморфизм гена *MLH1* (rs1799977) репарации «несоответствий» ДНК.

Результаты. Полученные результаты указывают на значение полиморфизма *MLH1* (rs1799977) в формировании бронхолегочной патологии в определенных профессиональных группах. Установлено, что генотип *MLH1*•A/G – ассоциированный с риском развития бронхолегочной патологии, а генотип *MLH1*•A/A способствует резистентности к развитию данных заболеваний.
Выводы. Установлен генотип, ассоциированный с риском развития бронхолегочной патологии, это гетерозиготы *MLH1*•A/G ($P \leq 0,002$, $\chi^2 = 9,00$; OR=2,32; 95% CI: 1,29-4,21). Также определен генотип, который, возможно, способствует резистентности к развитию данных заболеваний: доминантные гомозиготы *MLH1*•A/A ($P \leq 0,003$, $\chi^2 = 8,73$; OR=0,43; 95% CI: 0,24-0,79).

Ключевые слова: **SNP, *MLH1*, бронхолегочная патология.**

© Андрущенко Т.А., Гончаров С.В., Досенко В.Є. СТАТТЯ, 2018.

№ 3 2018 ENVIRONMENT & HEALTH 4

кули [4]. Оскільки локальний дефект симетричний щодо обох ланцюгів, то виникає додаткова складність з видаленням дефекту ДНК і вирізанням «неправильного» нуклеозиду із знову синтезованого ланцюга, залишаючи вихідний ланцюг інтактним [5]. Видалення помилок реплікації важливе, оскільки більша частина пошкоджень ДНК блокує передачу генетичної інформації наступному поколінню, а решта, якщо їх не видалити, збережеться у геномі нащадків і призведе до драматичних змін у молекулах білків [5].

Від 1993 року досліджувалися гени, локалізовані на 2-й і 3-й хромосомах, які асоційовані з синдромом Лінча (спадковий рак товстої кишки (РТК) та злоякісними пухлинами інших локалізацій. Було з'ясовано, що причиною виникнення РТК є гермінальні мутації генів *MMR* – *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* [6]. У результаті помилок реплікації, втрати компліментарності ланцюгів ДНК відбуваються заміни основ, інсерції, делеції та утворюються петлі, які розпізнаються білками *MSH2/MSH6*, *MSH2/MSH3*. Ці білкові комплекси рекрутують до місць з порушеною структурою ДНК, де, у свою чергу, інші білки *MLH1/PMS2*, *MLH1/MLH3* залучають екзо- та ендонуклеази до вирізання аномального фрагмента ДНК, а фактори реплікації – PCNA, ДНК-полімерази відновлюють нормальну структуру ДНК [6]. У міжнародній базі даних зареєстровано 126 поліморфних варіантів (від англ. SNP – single nucleotide polymorphism) генів *MLH1* і *MSH2*, більшість з яких локалізована на інтронній ділянці [7]. Ген *MLH1* (від англ. mutL (*E. coli*) homolog 1), локалізований на 3-й хромосомі, представлений 19 екзонами і 757 кодонами, є геном-супресором групи генів «загального контролю». Гени-супресори зростання пухлин згідно з концепцією, запропонованою американськими онкологами Кінзлером та Фогельштейном, поділяються на дві групи : перша група – «зберігачі клі-



ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

тинного цикла» (від англ. gatekeepers), друга група – «загального контролю» (від англ. caretakers) [6]. *MLH1* кодує відповідний білок, який складається з 756 амінокислот, регулює заміну неправильно спарених основ ДНК та інактивується метилюванням [8]. Отже, враховуючи патогенетичну складову пошкоджень ДНК у розвитку БЛП, пошук маркерів індивідуальної схильності до цієї патології серед поліморфізмів генів *MMR* є актуальним.

Мета роботи – вивчити розподіл частот генотипів гена *MLH1* (rs1799977) у працівників шкідливих і небезпечних галузей промисловості для виявлення маркерів ризику розвитку БЛП.

Методика. У дослідження взято дві категорії працівників шкідливих і небезпечних галузей промисловості України (n=214). Перша категорія – це працівники азбестоцементних заводів (АЦЗ) (n=94), їхній вік – (42,9±5,1) років, шкідливий стаж – (15,8±3,7) років. Друга категорія респондентів дослідження – шахтарі вугільних шахт України (n=120), вік шахтарів – (52,5±5,2) роки, підземний стаж – (22,1±4,3) роки. Для порівняльного аналізу були сформовані групи дослідження і контролю. Групу дослідження склали працівники АЦЗ і шахтарі з БЛП (хронічним бронхітом, хронічним обструктивним захворюванням легенів, пневмоконіозом). Верифікація БЛП відбувалася на підставі результатів дослідження функції зовнішнього дихання і дифузійної здатності альвеоло-капілярної мембрани (DLCo від англ. diffusing capacity of the lung for carbon-

monoxide) під час обстеження у клініці професійних захворювань ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН України». Оцінювання результатів дослідження проводили за загальноприйнятими показниками зазначених методів. До контрольної групи увійшли працівники АЦЗ і шахтарі, в анамнезі яких не було БЛП, але їхній стаж та умови праці були співставними з даними респондентів групи дослідження.

Матеріалом для дослідження була венозна кров, яку забирали у стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з антикоагулянтом (калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти) (11,7 ммоль/л) («Sarstedt», Німеччина). Було створено уніфікований банк генетичного матеріалу осіб, які мали контакт з генотоксичними агентами (пиллом фіброгенної дії, хімічними речовинами та фізичними факторами) для оцінки віддалених наслідків впливу техногенних факторів з застосуванням сучасних молекулярно-генетичних технологій. ДНК виділяли із лейкоцитів периферичної крові з використанням наборів «NeoPrep100DNA», «NEOGENE», Україна. За допомогою 7500 Fast Real-time PCR System («Applied Biosystems», США) та TaqManSNP визначали генотипи гена *MLH1* (rs1799977) і проводили аналіз за дискримінацією алелів.

Отримані результати статистично опрацьовували з використанням програм Orion 7.0, Statistica (10), Excel 2000. При цьому вірогідність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм, значення $P < 0,05$ вважали достовірним.



Результати та обговорення.

Для вивчення асоціації генотипів гена *MLH1* (rs1799977) з ризиком розвитку БЛП було визначено його частоти.

Так, частота алельних варіантів гена *MLH1* (rs1799977) була у групі контролю такою: А/А – 56,0%; А/Г – 36,0%, Г/Г – 8,0%, відповідно у групі дослідження домінантні гомозиготи А/А – 35,6%, гетерозиготи А/Г – 56,7%, мінорні гомозиготи Г/Г – 7,7% ($P \leq 0,008$). Аналіз частот генотипів гена *MLH1* (rs1799977) у популяції шахтарів і працівників АЦЗ представлено у таблиці 1.

Слід відзначити, що отримані значення частот генотипів були близькими до популяційних частот європеїдів, які, за літературними даними, становлять домінантні гомозиготи – *MLH1*•А/А – 45-55%, гетерозиготи *MLH1*•А/Г – 35-45%, мінорні гомозиготи *MLH1*•Г/Г

– до 10% [6, 8].

Отримані результати вказують на те, що розподіл алельних варіантів частот генотипів гена *MLH1* (rs1799977) суттєво відрізняється у контрольній групі та у групі дослідження (рис.).

За допомогою методу співвідношення шансів (OR) було встановлено генотип, асоційований з ризиком розвитку БЛП, це гетерозиготи *MLH1*•А/Г – 2,32 (1,29-4,21). Також встановлено генотип, який, можливо, сприяє резистентності до розвитку БЛП у працівників шкідливих і небезпечних галузей промисловості, це домінантні гомозиготи *MLH1*•А/А – 0,43 (0,24-0,79); аналіз асоціацій генотипів гена *MLH1* (rs1799977) у популяції шахтарів і працівників АЦЗ представлено у таблиці 2.

Розмір вибірки та відсутність інших молекулярних маркерів

генів репарації ДНК у дослідженні могли б істотно доповнити картину розподілу частот генотипів генів репарації ДНК у популяції шахтарів і працівників АЦЗ.

Тим не менш, наявність достовірних відмінностей навіть при аналізі декількох десятків зразків частот генотипів визначає доцільність подальших досліджень у цьому напрямку.

Таким чином, отримано результати про значення поліморфізму *MLH1* (rs1799977) репарації «невідповідностей» ДНК у формуванні схильності до розвитку БЛП, який раніше розглядався дослідниками виключно як онкомаркер патології різних типів і локалізацій, у тому числі і раку легенів, проте отримані результати вказують на асоціацію між зміненими алелями гена *MLH1* та ймовірністю ризику розвитку БЛП.

Висновки

У результаті дослідження встановлено генотип, асоційований з ризиком розвитку бронхолегеневої патології, це гетерозиготи *MLH1*•А/Г ($P \leq 0,002$, $\chi^2=9,00$; OR=2,32; 95% CI : 1,29-4,21). Також визначено генотип, який сприяє резистентності до розвитку зазначених захворювань: домінантні гомозиготи *MLH1*•А/А ($P \leq 0,003$, $\chi^2=8,73$; OR=0,43; 95% CI : 0,24-0,79).

Таблиця 1

Частотний розподіл генотипів гена *MLH1* (rs1799977) у популяції шахтарів і працівників азбестоцементних заводів

Ген, поліморфізм, відомості про SNP ID	Генотипи					
	Домінантні гомозиготи, %		Гетерозиготи, %		Мінорні гомозиготи, %	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
<i>MLH1</i> (rs1799977)	56,0	35,6	36,0	56,7	8,0	7,7

Таблиця 2

Аналіз асоціацій генотипів гена *MLH1* (rs1799977) у популяції шахтарів і працівників азбестоцементних заводів

Генний поліморфізм	Генотип	OR, 95% CI P, χ^2
<i>MLH1</i> (rs1799977)	А/А	0,43 (0,24-0,79); $P \leq 0,003$; $\chi^2=8,73$
	А/Г	2,32 (1,29-4,21); $P \leq 0,002$; $\chi^2=9,0$
	Г/Г	0,97 (0,32-2,91); $P \leq 0,9$

ЛІТЕРАТУРА

- Измеров Н.Ф. Профессиональные заболевания органов дыхания (Национальное руководство). Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. С. 119-48.
- Андрущенко Т.А., Басанець А.В. Порухення системи репарації ДНК у шахтарів, індуковані дією професійних факторів. *Український*



THE SEARCH FOR GENETIC MARKERS IN THE DEVELOPMENT OF BRONCHOPULMONARY PATHOLOGY – THE STUDY OF *MLH1* (rs1799977) POLYMORPHISM OF THE MISMATCH DNA REPAIR

¹Andrushchenko T.A., ²Goncharov S.V.,
²Dosenko V.E.

¹State Institution «Kundiiiev Institute of Occupational Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv

²Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

The results of the research on the polymorphism of *MLH1* (rs1799977) gene in miners and workers of the asbestos cement plants with the occupationally determined respiratory pathology are presented in the article.

Objective: We studied the distribution of the genotype frequencies of *MLH1* (rs1799977) gene in workers of hazardous and harmful industries for the identification of the risk markers of the development of bronchopulmonary pathology.

Materials and methods: With the help of polymerase chain reaction in real time, we studied the

polymorphism of *MLH1* (rs1799977) gene of the repair of DNA «mismatches» in 90 patients with bronchopulmonary pathology and 124 respondents of the research, working under the same conditions, but without respiratory diseases.

Results: The obtained results indicate the importance of *MLH1* (rs1799977) polymorphism in the formation of bronchopulmonary pathology in certain occupational groups. *MLH1*•A/G genotype was associated with the risk of bronchopulmonary pathology, and *MLH1*•A/A genotype stimulated the resistance to the development of mentioned diseases.

Conclusions: We established that genotype: heterozygotes *MLH1*•A/G ($P \leq 0.002$, $\chi^2 = 9.00$; OR=2.32; 95% CI: 1.29-4.21) associated with the development of bronchopulmonary pathology and genotype: dominant homozygotes *MLH1*•A/A ($P \leq 0.003$, $\chi^2 = 8.73$; OR=0.43; 95% CI: 0.24-0.79) probably contributed to the resistance of the development of these diseases.

Keywords: SNP, *MLH1*, bronchopulmonary pathology.

журнал з проблем медицини праці. 2015. № 4 (45). С. 69-78.

3. Vilenchik M.M., Knudson A.G. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. Vol. 97, № 10. P. 5381-5386.

4. Kuschel B., Auranen A., McBride S., Novik K.L., Antoniou A. Variants in double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* 2002. № 11. P. 1399-1440.

5. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л., 2004. 253 с.

6. Lanza G., Gafa R., Maestri I., Santini A., Matteuzzi M., Cavazzini L. Immunohistochemical pattern of *MLH1/MSH2* expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mol. Pathol.* 2002. Vol. 15 (7). P. 741-749.

7. Suter C.M., Martin D.L., Ward R.L. Germline epimutation of *MLH1* in individuals with multiple cancers. *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36. P. 497-501.

8. Herman J.G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Sem. Cancer Biol.* 1999. № 9. P. 359-367.

REFERENCES

- Izmerov N.F. Professionalnye zabolivaniia organov dykhaniiia (Natsionalnoe rukovodstvo) [Professional Diseases of the Respiratory Organs : National Guide]. Moscow : GEOTAR-Media ; 2015 : 119-148 (in Russian).
- Andrushchenko T.A. and Basanets A.V. *Ukrainskyi zhurnal z problem medytsyny pratsi*. 2015 ; 4 (45) : 69-78 (in Ukrainian).
- Vilenchik M.M. and Knudson A.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000 ; 97 (10) : 5381-5386.
- Kuschel B., Auranen A., McBride S., Novik K.L. and Antoniou A. *Hum. Mol. Genet.* 2002 ; 11 : 1399-1440.
- Zhestianikov V.D. *Reparatsiya DNK i ee biologicheskoe znachenie* [Reparation of DNA and Its Biological Significance]. Leningrad ; 2004 : 253 p. (in Russian).
- Lanza G., Gafa R., Maestri I., Santini A., Matteuzzi M. and Cavazzini L. *Mol. Pathol.* 2002 ; 15 (7) : 741-749.
- Suter C.M., Martin D.L. and Ward R.L. *Nat. Genet.* 2004 ; 36 : 497-501.
- Herman J.G. *Sem. Cancer Biol.* 1999 ; 9 : 359-367.

Надійшло до редакції 17.05.2018

Рисунок
Частота алельних варіантів гена *MLH1* (rs1799977) у популяції шахтарів і працівників азбестоцементних заводів

