

В.С. Никифоров^{1,2}, А.В. Аклеев^{1,2}**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ TP53 И MDM2 В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ**

1. Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск. E-mail: nikiforovx@mail.ru
2. Челябинский государственный университет, Челябинск

В.С. Никифоров – аспирант, м.н.с.; А.С. Аклеев – д.м.н., проф., директор Уральского научно-практического центра радиационной медицины

Реферат

Цель работы: Исследование уровней транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 у жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз.

Материал и методы: Оценку транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 провели у 95 человек. В основную группу исследования вошли 80 человек, подвергшихся комбинированному внешнему и внутреннему облучению, средняя накопленная доза на красный костный мозг составила $0,86 \pm 0,08$ Гр (диапазон доз составил от 0,1 до 3,65 Гр). В контрольную группу вошли лица, проживающие в сходных социально-экономических условиях на территории Южного Урала, у которых накопленные дозы облучения красного костного мозга не превышали 70 мГр. Оценка профиля активности генов проводилась методом ПЦР в реальном времени. Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла сравнения с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» в каждом образце.

Результаты и выводы: В ходе анализа мы не получили статистически значимых различий между исследуемыми группами, однако было отмечено тенденция к снижению транскрипционной активности генов в группе облученных лиц. Корреляционный анализ показал слабую отрицательную зависимость для исследуемых генов не только от величины накопленной дозы, но и от возраста исследуемых лиц. При изучении влияния дозы облучения прослеживалась тенденция снижения транскрипционной активности генов, статистические значимые различия были показаны для гена MDM2 в группе лиц, чьи накопленные дозы превышали 2 Гр ($p = 0,044$). В ходе анализа влияния возрастных особенностей на транскрипционную активность было отмечено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена TP53 с увеличением возраста пациентов ($p = 0,02$). Исследуя факторы нерадиационной природы, произвели сравнительную оценку уровней транскрипционной активности генов по половому и этническому признаку, а также рассмотрели фактор курения. Из полученных данных был сделан вывод, что мужчины и женщины не отличаются в уровнях транскрипционной активности TP53 и MDM2 в группе сравнения и облученных лиц. Аналогичный вывод можно сделать, разделив исследуемую группу по этническому составу: профиль экспрессии генов TP53 и MDM2 среди облученных лиц славянской и татарской-и-башкирской национальностей не показал различий. При исследовании влияния фактора курения, активность исследуемых генов находилась на одинаковом уровне у курящих и некурящих лиц.

Ключевые слова: хроническое облучение, экспрессия генов, транскрипция, TP53, MDM2, малые дозы, радиобиологический ответ

Поступила: 02.03.2018. Принята к публикации: 14.06.2018

Введение

Воздействие ионизирующего излучения на организм человека индуцирует в нем комплекс реакций, начинающихся с молекулярного уровня организации и способных, в зависимости от вида, дозы и продолжительности облучения, приводить к определенным нарушениям на клеточном, тканевом и организменном уровне. В связи с этим в последние годы интенсивно изучается транскрипционная активность генов, вовлеченных в систему клеточного ответа после облучения. Одним из таких генов является ген TP53, который кодирует транскрипционный фактор p53 и является супрессором злокачественных новообразований [1]. Нормальное функционирование белка p53 резко уменьшает вероятность накопления в организме аномальных клеток с различными изменениями генома, которые способствуют неопластической трансформации клеток и прогрессии возникших опухолевых клонов [2]. После активации p53 функционирует как специфичный к последовательности транскрипционный фактор, способный осуществлять позитивную регуляцию различных систем репарации поврежденной ДНК, а также изменять активность генов, принимающих участие в остановке клеточного цикла или индукции апоптоза [3, 4]. Огромный интерес со сто-

роны исследователей к белку p53 обусловлен тем, что нарушение его функциональной активности часто связано с изменением его молекулярной структуры. В опухолях более чем 60 различных типов обнаружены мутации гена TP53 [5]. Подавляющее большинство представлено миссенс-мутациями, которые приводят к изменению конформации молекулы белка p53, затрагивая все вышеуказанные его функции: происходит потеря или ослабление способности связывать и активировать гены с p53-респонсивными элементами, репрессировать другие специфические гены-мишени, ингибировать репликацию и репарацию ДНК [6].

В данном механизме немаловажную роль играет также ген MDM2, как основной регулятор TP53. Являясь одной из транскрипционных мишеней, этот белок прочно связывается с p53 и ингибирует его биологическую активность. Данный механизм обеспечивает отрицательную регуляторную связь, контролирующую экспрессию p53, и поддерживает его активность в нормальных клетках в отсутствии стресса [7].

Многочисленные исследования показали, что онкопротеин MDM2 также активируется при раках различного типа, а в некоторых случаях MDM2 может ингибировать процесс канцерогенеза [8]. MDM2 функционирует на разных уровнях в клетке, что является следствием его сложной структуры, взаимодействия с

большим количеством белковых молекул и регулированию посредством многочисленных посттрансляционных модификаций [9].

Помимо онкологических заболеваний, с недавнего времени стала изучаться роль TP53 в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Было обнаружено, что семейство NAD-зависимых деацетилаз представляет собой комплекс мишеней в развитии патологии сердца. Под контролем этих белков находятся различные ферменты, метаболиты, а также транскрипционные факторы, регулирующие рост и развитие ряда тканей, в том числе миокарда [10]. Нарушение в работе комплекса этих белков приводит к деацетилированию p53. Увеличение активности p53 индуцирует переход сердечной гипертрофии к сердечной недостаточности посредством подавления индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1). Поскольку известно, что p53 способствует апоптозу, который, в свою очередь, также участвует в появлении сердечной недостаточности, p53 можно рассматривать как одну из ключевых молекул в иницировании развития заболеваний сердца [11].

Изменения в структуре и, как следствие, в работе данного гена могут отражать последствия воздействия определенных канцерогенных факторов, в том числе ионизирующего излучения. Экспериментально доказано изменение транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 при действии радиации в широком диапазоне доз. При облучении клеточных культур в диапазоне доз 1 и 2 Гр было зарегистрировано увеличение экспрессии гена TP53 спустя 2 и 6 ч после облучения [12, 13]. Активация гена MDM2 была также зарегистрирована спустя 2 ч при облучении нормальных фибробластов человека в дозе 4 Гр, и спустя 4 ч – в дозе 2 Гр [14, 15]. Однако при изучении воздействии малых доз в течение суток после облучения не было отмечено изменений активности вышеуказанных генов. Так, при облучении нормальных фибробластов в дозе 0,02 Гр и облучении клеток кожи в дозе 0,05 Гр профили генов оставались постоянными в течение 24 ч в первом случае и в течение 30 ч во втором после воздействия [14, 16]. Следует отметить, что вышеописанные данные были получены при изучении раннего радиационно-индуцированного ответа.

На сегодняшний день существует лишь небольшое количество работ, где рассматривается влияние хронического облучения на организм в отдаленный период. В одном из таких исследований, проведенном на 28 работниках, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения с накопленными дозами около 19 мГр, было показано изменение транскрипционной активности 256 генов, регулирующих клеточный цикл, процесс репарации и апоптоза, часть из которых находится под контролем TP53 [17]. Исследование активности генов у лиц, перенесших острую лучевую болезнь, не показало различий в уровнях представленности мРНК генов TP53 и MDM2, однако были отмечены изменения в содержании зрелых miR-34 и miR-21, регулирующих работу p53-зависимой системы защиты генома [18].

Таким образом, изучение транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 представляет научный интерес, т.к. изменение баланса в работе этих генов вследствие влияния ионизирующего излучения может служить причиной трансформации клеток и развития ряда заболеваний.

Цель работы: исследовать уровень экспрессии генов TP53 и MDM2 в отдаленный период у лиц прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз.

Материал и методы

Объектом для исследования служила периферическая кровь 95 жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию вследствие деятельности ПО «Маяк». В группу исследования вошли 80 человек, рожденных до 1950 г. Средний возраст составил 74,4 года (67–87 лет), поглощенные дозы – от 0,1 до 3,65 Гр ($0,86 \pm 0,08$ Гр) на красный костный мозг (ККМ). Образцы крови были получены через 60–70 лет после начала воздействия. Контрольную группу составили 15 человек, проживающих в сходных социально-экономических условиях на территории Южного Урала, поглощенные дозы у которых не превышали 0,07 Гр в ККМ.

Группу обследованных составили лица обоего пола, преимущественно трех национальностей (русские, татары, башкиры). Следует отметить, что при отборе пациентов для исследования действовали следующие критерии исключения: лица, имеющие в анамнезе аутоиммунные, онкологические, хронические воспалительные заболевания в фазе обострения, принимающие цитостатики, антибиотики. Лица, проходившие диагностическое облучение в течение 6 предшествующих месяцев до момента взятия образца крови, также не были включены в выборку исследования. В соответствии с действующими международными нормами (Хельсинская декларация 1964 г.) и с разрешения этического комитета УНПЦ РМ, у всех пациентов, участвующих в данном исследовании, было получено информированное согласие на забор образцов крови и на дальнейшие исследования.

Кровь брали из локтевой вены утром натощак в стерильные контейнеры Tempus™ Blood RNA Collection Tubes. Тотальную РНК экстрагировали колоночным методом с использованием набора Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом фирмы производителя. Количественную и качественную оценку полученных образцов РНК проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Соотношение оптических плотностей, измеренных при 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}), для очищенной РНК, выделенной из всех образцов, составляло $2,08 \pm 0,04$. Реакции обратной транскрипции для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием набора реактивов (ООО «Тест ген»), содержащего обратную транскриптазу MMLV и случайные гексануклеотидные праймеры, со-

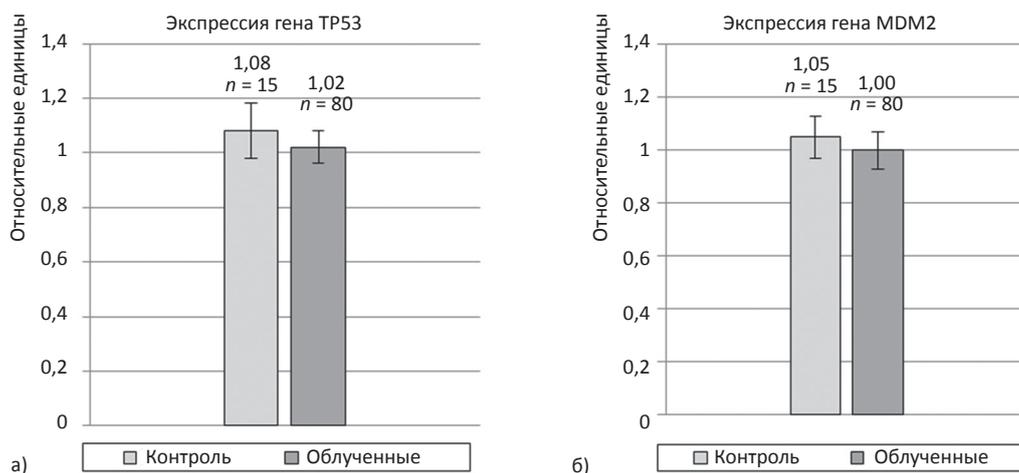


Рис. 1. Уровни транскрипционной активности генов TP53 (а) и MDM2 (б) в клетках периферической крови у облученных лиц и группы контроля

гласно протоколу фирмы производителя. Полученные образцы кДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени. Для анализа уровня экспрессии генов TP53 и MDM2 применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР). Амплификацию исследуемых генов проводили на амплификаторе Real-time CFX96 (Bio-Rad, США) в объеме 20 мкл, содержащем готовую реакционную смесь для ПЦР, кДНК, а также специфические праймеры (ООО «Тест-ген», Россия). Для каждой тест-системы была определена эффективность путем построения калибровочной кривой.

Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла сравнения (Ct) с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» COMT в каждом образце. Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов использовали метод $\Delta\Delta C_t$. Анализ результатов осуществляли с использованием статистической программы Past. Для оценки значимости различий в группах применялся непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования уровней транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, представлены на рис. 1.

В ходе анализа не было получено статистически значимых различий между исследуемыми группами, однако была отмечена тенденция к снижению транскрипционной активности генов в группе облученных лиц. Корреляционный анализ показал слабую отрицательную зависимость для этих генов не только от величины накопленной дозы, но и от возраста исследуемых лиц.

Для того чтобы проследить влияние дозы облучения на профиль транскрипционной активности исследуемых генов, было сформировано три дозовых подгруппы: подгруппа людей с дозами менее 1 Гр, с дозами от 1 до 2 Гр, а также лица с накопленными дозами более 2 Гр. Результаты представлены на рис. 2.

В случаях с геном TP53 не было выявлено значимых различий в активности этого гена у представленных дозовых подгрупп, однако прослеживалась тенден-

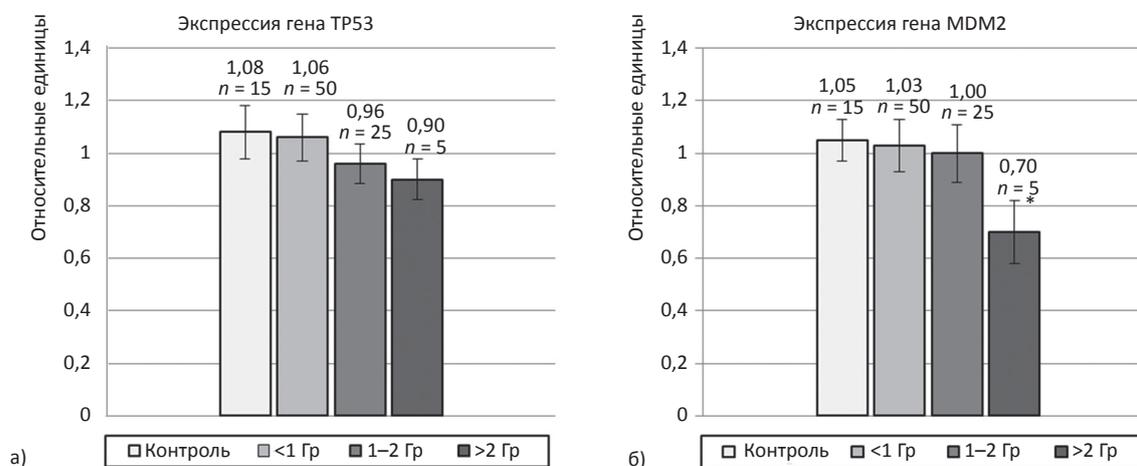


Рис. 2. Транскрипционная активность генов TP53 (а) и MDM2 (б) в клетках периферической крови у лиц с разными накопленными дозами. * – достоверное различие ($p < 0,05$) от контрольной группы, а также облученных лиц с дозами облучения более 2 Гр для гена MDM2 по критерию Манна-Уитни для двух независимых выборок

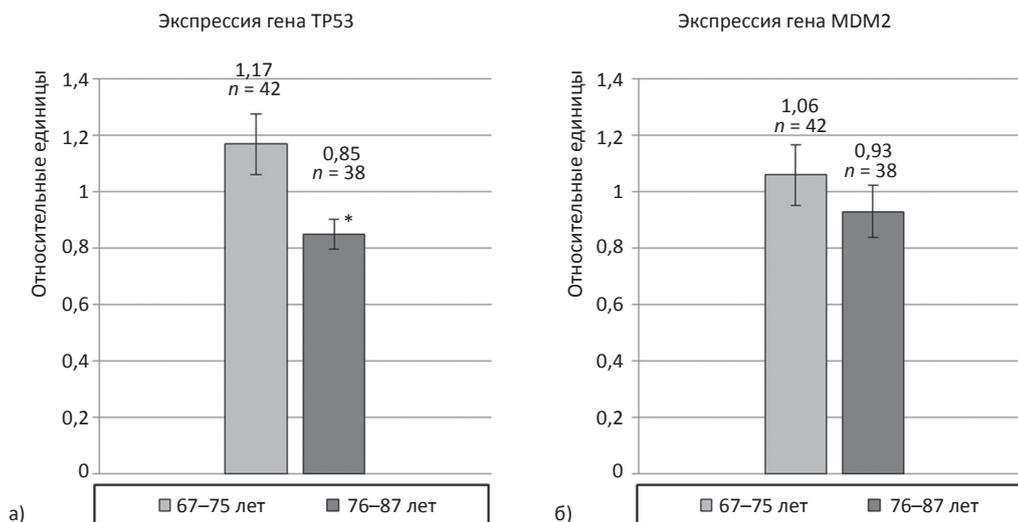


Рис. 3. Транскрипционная активность генов TP53 (а) и MDM2 (б) в клетках периферической крови в двух возрастных подгруппах, * – достоверное различие ($p < 0,05$) подгруппы 76–78 лет от подгруппы возрастом 67–75 лет для гена TP53 по критерию Манна–Уитни

ция к снижению профиля с увеличением дозы. В то же время уровень экспрессии гена MDM2 у лиц с дозами более 2 Гр существенно отличался от групп лиц с более низкими дозами ($p = 0,044$) – рис. 2.

Разделив группу облученных лиц на две подгруппы с возрастными диапазонами 67–75 лет (средний возраст 70,5 лет) и 76–87 лет (средний возраст 78,6 лет) оценили связь между возрастом пациентов и вариацией активности исследуемых генов – рис. 3. В группе лиц, чей средний возраст приближался к 80 годам, было отмечено значимое снижение активности гена TP53 по сравнению с более молодой возрастной группой ($p = 0,02$).

С целью исследования факторов нерадиационной природы была произведена оценка уровней активности генов по половому, этническому и возрастному показателям, а также был исследован фактор влияния курения у исследуемых групп лиц.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что мужчины ($n = 35$) и женщины ($n = 60$) не отличаются по активности генов TP53 и MDM как в группе сравнения, так и в группе облученных лиц. Аналогичный вывод можно сделать, разделив исследуемую группу по этническому составу: профиль активности генов среди облученных лиц славянской ($n = 47$) и татарской-башкирской ($n = 33$) национальностей составил соответственно $1,02 \pm 0,08$ и $1,03 \pm 0,10$ для TP53 и $1,01 \pm 0,09$ и $1,01 \pm 0,11$ для MDM2 соответственно.

При исследовании влияния фактора курения были получены данные, которые показывают одинаковый профиль активности генов как у некурящих, так и у курящих лиц, входящих в группу исследования – табл. 2.

Ионизирующее излучение является генотоксическим и канцерогенным фактором. Изучение экспрессии генов спустя 60–70 лет после начала хронического облучения, т.е. при реализации отдаленных эффектов,

Таблица 1

Транскрипционная активность генов TP53 и MDM2 у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в зависимости от пола и этнической принадлежности

	Относительная экспрессия гена TP53		Относительная экспрессия гена MDM2	
	Контроль (n)	Облученные (n)	Контроль (n)	Облученные (n)
Общая группа $n = 95$	$1,08 \pm 0,10$ (15)	$1,02 \pm 0,06$ (80)	$1,05 \pm 0,08$ (15)	$1,00 \pm 0,07$ (80)
Мужчины $n = 35$	$1,12 \pm 0,17$ (5)	$1,00 \pm 0,10$ (30)	$1,05 \pm 0,14$ (5)	$1,02 \pm 0,08$ (30)
Женщины $n = 60$	$1,08 \pm 0,13$ (10)	$1,00 \pm 0,11$ (50)	$1,04 \pm 0,10$ (10)	$1,00 \pm 0,09$ (50)
Русские $n = 54$	$1,09 \pm 0,14$ (7)	$1,02 \pm 0,08$ (47)	$1,02 \pm 0,12$ (7)	$1,01 \pm 0,09$ (47)
Татары и башкиры $n = 41$	$1,02 \pm 0,12$ (8)	$1,03 \pm 0,10$ (33)	$1,03 \pm 0,12$ (8)	$1,01 \pm 0,11$ (33)

Таблица 2

Транскрипционная активность генов TP53 и MDM2 в зависимости от фактора курения

Наименование гена	Некурящие $n = 56$	Курящие $n = 24$
TP53	$1,05 \pm 0,07$	$1,03 \pm 0,11$
MDM2	$1,02 \pm 0,08$	$1,03 \pm 0,12$

имеет практическое значение для понимания механизмов действия ионизирующего излучения.

В ходе исследования не было обнаружено достоверных различий при изучении транскрипционной активности генов у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, однако была отмечена тенденция к снижению активности генов в группе облученных лиц. Анализ в дозовых подгруппах позволил отметить снижение транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 с увеличением поглощённой дозы.

Механизм такого эффекта может быть связан с гиперметилированием CpG-динуклеотидов в CpG-островках промоторов исследуемых генов. Присоединение метильной группы к азотистым основаниям является одним из основных механизмов транскрипционной инактивации генов. В ряде исследовательских работ было установлено, что ионизирующее излучение может индуцировать эпигенетические модификации, причем была показана их сохранность в организме на протяжении длительного периода времени. Так, в группе облученных работников ПО «Маяк» доля лиц с гиперметилированием CpG-островков промоторов ряда генов, в том числе TP53, статистически значимо превышала показатели по сравнению с необлученными лицами [19].

Помимо дозовой зависимости была выявлена возрастная динамика изменения экспрессии генов. Доказано, что профиль экспрессии ряда генов с возрастом претерпевает изменения. Хотя эта зависимость и оказывает незначительное влияние на отдельные гены, она широко распространена во всем транскриптоме [20]. Отметим, что выборка людей, принимавших участие в исследовании, была исключительно пожилого и старческого возраста. Изменение экспрессии генов, ассоциированных со старением, вероятнее всего, также можно связать с развитием у людей патологических состояний. Напомним, что в исследовании не были включены лица, в анамнезе болезни которых был факт наличия аутоиммунных, онкологических, и хронических воспалительных заболеваний в фазе обострения. Однако большинство пациентов имело заболевания сердечно-сосудистой системы. Сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространёнными у лиц данной возрастной категории [21]. Не исключено, что выраженная тенденция к снижению экспрессии генов TP53 и MDM2 у лиц старческого возраста указывает на наличие у них в анамнезе заболеваний этой системы.

Нельзя исключать и влияние других факторов, сопровождающих человека на протяжении всей его жизни (профессиональная вредность, характер питания, вредные привычки и др.). Результаты многих исследований показывают связь онкологических заболеваний с курением. Являясь канцерогенным фактором, курение ассоциировано с развитием у человека ряда онкологических заболеваний. Показано также, что курящие женщины более уязвимы к возникновению рака, нежели курящие мужчины [22]. Молекулярный механизм развития злокачественных опухолей, вызванный табакокурением, до сих пор остается неизвестным, однако можно предположить, что причина таких эффектов стоит в дисбалансе работы протоонкогенов и генов онкосупрессоров, а также генов, контролирующих иммунный надзор. В нашем исследовании мы не обнаружили различий в профилях экспрессии генов TP53 и MDM2 среди курящих и некурящих лиц.

Выводы

1. Не было получено достоверных различий при изучении транскрипционной активности генов TP53 и MDM2 у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, однако была отмечена тенденция к снижению активности генов в группе облученных лиц.

2. При сравнении групп с разными накопленными дозами было показано снижение транскрипционной активности исследуемых генов у людей, чьи накопленные дозы находились в диапазоне 2 Гр и более, по сравнению с лицами, чьи накопленные дозы были значительно меньше.

3. При изучении возрастных особенностей активности исследуемых генов была обнаружена тенденция к снижению транскрипционной активности гена MDM2, отмечено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена TP53 с возрастом пациентов.

4. Не было отмечено различий в показателях транскрипционной активности генов между мужчинами и женщинами, а также среди облученных лиц славянской и татарской-и-башкирской национальностей. Изучение влияния фактора курения также не показало различий в профиле активности исследуемых генов как у некурящих, так и у курящих лиц из группы исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Napoli M., Flores E.R. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy // *Brit. J. Cancer*. 2017. Vol. 116. № 2. P. 149–155. DOI: 10.1038/bjc.2016.384.
2. Kruiswijk F., Labuschagne C.F., Vousden K.H. P53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2015. Vol. 16. № 7. P. 393–405. DOI: 10.1038/nrm4007.
3. Ryan K.M., Phillips A.C., Vousden K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2001. Vol. 13. № 3. P. 332–337.
4. Banin S., Moyal L., Shieh S., et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage // *Science*. 1998. Vol. 281. № 5383. P. 1674–1677.
5. Leroy B., Anderson M., Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade // *Hum. Mutat.* 2014. Vol. 35. № 6. P. 672–688. DOI: 10.1002/humu.22552.
6. Zerdoumi Y., Aury-Landas J., Bonaiti-Pellie C. et al. Drastic effect of germline TP53 missense mutations in Li-Fraumeni patients // *Hum. Mutat.* 2013. Vol. 34. № 3. P. 453–461. DOI: 10.1002/humu.22254.
7. Moll U.M., Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction // *Mol. Cancer Res.* 2003. Vol. 1. № 14. P. 1001–1008.
8. Ebrahim M., Mulay S.R., Anders H.J. et al. MDM2 beyond cancer: podoptosis, development, inflammation, and tissue regeneration // *Histol. Histopathol.* 2015. Vol. 30. № 11. P. 1271–1282. DOI: 10.14670/HH-11-636.
9. Park H.S., Park J.M., Park S. et al. Subcellular localization of MDM2 expression and prognosis of breast cancer // *Int. J. Clin. Oncol.* 2014. Vol. 19. № 5. P. 842–851. DOI: 10.1007/s10147-013-0639-1.
10. Borradaile N.M., Pickering J.G. NAD(+), sirtuins, and cardiovascular disease // *Curr. Pharm. Des.* 2009. Vol. 15. № 1. P. 110–117.
11. Sano M., Minamino T., Toko H. et al. P53-induced inhibition of hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload //

- Nature. 2007. Vol. 446. № 7134. P. 444–448. DOI: 10.1038/nature05602.
12. Batchelor E., Mock CS., Bhan I. et al. Recurrent Initiation: A Mechanism for Triggering p53 Pulses in Response to DNA Damage // *Mol. Cell*. 2008. Vol. 30. № 3. P. 277–289. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.016.
13. Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage // *Science*. 1998. Vol. 282. № 5393. P. 1497–1501.
14. Ding L.H., Shingyoji M., Chen F. et al. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: A comparative study of low and high doses // *Radiat. Res*. 2005. Vol. 164. № 1. P. 17–26.
15. Вележанинов И.О., Шадрин Д.М., Пылина Я.И. и соавт. Качественные отличия реакции нормальных фибробластов человека на воздействие ионизирующего излучения в малых и высоких дозах // Тр. междунар. конф. «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды». – Сыктывкар. 2014. С. 31–35.
16. Zhao R., Gish K., Murphy M. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays // *Genes. Dev*. 2000. Vol. 14. № 8. P. 981–993.
17. Morandi E., Severini C., Quercioli D. et al. Gene expression changes in medical workers exposed to radiation // *Radiat. Res*. 2009. Vol. 172. № 4. P. 500–508. DOI: 10.1667/RR1545.1.
18. Шуленина Л.В., Галстян И.А., Надеждина Н.М. и соавт. Экспрессия зрелых микроРНК, участвующих в функционировании p53-зависимой системы сохранения стабильности генома, у лиц, облученных в клинически значимых дозах // Саратовский научно-медицинский журнал. 2014. Т. 10. № 4. С. 749–753.
19. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г. и соавт. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия // Радиационная биология. 2017. Т. 57. № 4. С. 341–356.
20. Jones M.J., Goodman S.J., Kobor M.S. DNA methylation and healthy human aging // *Aging Cell*. 2015. Vol. 14. № 6. P. 924–932. DOI: 10.1111/ace1.12349.
21. Nichols M., Townsend N., Scarborough P. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update // *Eur. Heart J*. 2014. Vol. 35. № 42. P. 2950–2959. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu299.
22. Paul S., Amundson S.A. Differential Effect of Active Smoking on Gene Expression in Male and Female Smokers // *J. Carcinog. Mutagen*. 2014. Vol. 5 (6). DOI: 10.4172/2157-2518.1000198.

Для цитирования: Никифоров В.С., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов TP53 и MDM2 в отдаленный период у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2018. Т. 63. №4. С. 33–39. DOI: 10.12737/article_5b83b6185814e7.31842273

Radiation Medicine

Medical Radiology and Radiation Safety. 2018. Vol. 63. No. 4. P. 33–39

DOI: 10.12737/article_5b83b6185814e7.31842273

Transcriptional Activity of TP53 and MDM2 in Chronically Exposed People at Later Time Points

V.S. Nikiforov^{1,2}, A.V. Akleyev^{1,2}

1. Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia. E-mail: nikiforovx@mail.ru
2. Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

V.S. Nikiforov – Postgraduate Student, Junior Researcher;
A.V. Akleyev – Dr. Sci. Med., Prof., Director, Urals Research Center for Radiation Medicine

Abstract

Purpose: To study the levels of transcriptional activity of TP53 and MDM2 genes in the residents of the Techa riverside villages chronically exposed at a wide dose range.

Material and methods: transcriptional activity of TP53 and MDM2 genes was assessed in 95 persons. The main study group included 80 people exposed to combined external and internal radiation (peripheral blood samples were taken 60–70 years after the beginning of chronic radiation exposure), mean accumulated dose to red bone marrow was 0.86 ± 0.08 Gy (doses varied in the range 0.1–3.65 Gy). The control group consisted of 15 people living in similar socio-economic conditions in the Southern Urals; the accumulated doses to red bone marrow did not exceed 0.07 Gy. Gene transcription activity profile was studied with real-time PCR assay. The data were analyzed using a comparative CT method with normalization to the “housekeeping” gene transcription in each sample. Statistical analysis was performed using the software PAST.

Results and conclusion: In the course of the analysis we did not receive statistically significant differences between the study groups, but there was a tendency to a decrease in gene transcription in the group of exposed persons. The correlation analysis showed a weak negative dependence for TP53 and MDM2 genes, and this dependence was characterized not only by the accumulated dose value but was also associated with the age of the individuals under study. A tendency to a decrease in the transcription activity of the genes under study was noted when studying the effect of the dose. Statistically significant differences were shown for MDM2 gene in the group of individuals whose accumulated doses exceeded 2 Gy ($p = 0.044$). The analysis of age-peculiarities on gene transcription revealed a statistically significant decrease in TP53 gene transcription with increasing age of patients ($p = 0.02$). Non-radiation factors including smoking were also studied. The levels of gene transcription were compared between men and women of 2 main ethnicities (Bashkirs/Tartars and Slavs). Results of the study showed that neither sex nor ethnicity had any effect on the levels of TP53 and MDM2 gene transcription in the study groups. The effect of smoking on the activity of the genes under study was negligible.

Key words: chronic irradiation, gene expression, TP53, MDM2, low doses, radiobiological response

REFERENCES

- Napoli M, Flores ER. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2017;116(2):149–55. DOI: 10.1038/bjc.2016.384.
- Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. P53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(7):393–405. DOI: 10.1038/nrm4007.
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(3):332–7.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998;281(5383):1674–7.

5. Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat.* 2014;35(6):672-88. DOI: 10.1002/humu.22552.
 6. Zerdoumi Y, Aury-Landas J, Bonaïti-Pellie C, et al. Drastic effect of germline TP53 missense mutations in Li-Fraumeni patients. *Hum Mutat.* 2013;34(3):453-61. DOI: 10.1002/humu.22254.
 7. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction. *Mol Cancer Res.* 2003;1(14):1001-8.
 8. Ebrahim M, Mulay SR, Anders HJ, et al. MDM2 beyond cancer: podoptosis, development, inflammation, and tissue regeneration. *Histol Histopathol.* 2015;30(11):1271-82. DOI: 10.14670/HH-11-636.
 9. Park HS, Park JM, Park S. et al. Subcellular localization of MDM2 expression and prognosis of breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2014;19(5):842-51. DOI: 10.1007/s10147-013-0639-1.
 10. Borradaile NM, Pickering JG. NAD(+), sirtuins, and cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(1):110-7.
 11. Sano M, Minamino T, Toko H, et al. P53-induced inhibition of hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature.* 2007;446(7134):444-8. DOI: 10.1038/nature05602. PMID: 17334357.
 12. Batchelor E, Mock CS, Bhan I. et al. Recurrent Initiation: A Mechanism for Triggering p53 Pulses in Response to DNA Damage. *Mol Cell.* 2008;30(3):277-89. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.016.
 13. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 1998;282(5393):1497-501.
 14. Ding LH, Shingyoji M, Chen F, et al. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: A comparative study of low and high doses. *J Radiat Res.* 2005;164(1):17-26.
 15. Velegzhaninov IO, Shchadrin DM, Pylina AV, et al. Qualitative differences in reaction of normal human fibroblasts to radiation exposure at high and low doses. The third international conference «Biology effects of low doses of ionizing radiation and radioactive pollution on the environment». Syktyvkar; 2014. p. 31-35. Russian.
 16. Zhao R, Gish K, Murphy M. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 2000;14(8):981-93.
 17. Morandi E, Severini C, Quercioli D, et al. Gene expression changes in medical workers exposed to radiation. *J Radiat Res.* 2009;172(4):500-8. DOI: 10.1667/RR1545.1.
 18. Shchulena LV, Galstyan IA, Nadezhina NM, et al. Expression of mature micro-RNA involved in the functioning of p53-dependent system of maintaining the genome stability of the individuals exposed to radiation at clinically relevant doses. *Saratov Medical Scientific Journal.* 2014;10(4):749-53. Russian.
 19. Kuzmina NS, Lapteva NSh, Rusinova GG, et al. Hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in human in the long-term period after radiation exposure. *Radiation Biology.* 2017;57(4):341-56. Russian.
 20. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell.* 2015;14(6):924-32. DOI: 10.1111/accel.12349.
 21. Nichols M, Townsend N, Scarborough P. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J.* 2014;35(42):2950-9. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu299.
 22. Paul S, Amundson SA. Differential Effect of Active Smoking on Gene Expression in Male and Female Smokers. *J Carcinog Mutagen.* 2014;5(6). DOI:10.4172/2157-2518.1000198.
- For citation:** Nikiforov VS, Akleyev AV. Transcriptional Activity of TP53 and MDM2 in Chronically Exposed People at Later Time Points. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2018;63(4):33-9. Russian.
DOI: 10.12737/article_5b83b6185814e7.31842273