

UTJECAJ POLIMORFIZAMA GENA ZA POPRAVAK DNA NA RAZINU POSTOJANIH OŠTEĆENJA GENOMA U LJUDSKIM LIMFOCITIMA IZAZVANIH NAKON IZLAGANJA IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU OD 2 Gy

*Mirta Milić¹, Ružica Rozgaj¹, Vilena Kašuba¹, Dragan Kubelka²,
Sabrina Angelini³ i Patrizia Hrelia³*

¹Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

²Državni zavod za radiološku i nuklearnu sigurnost, Zagreb, Hrvatska

³Department of Pharmacology, University of Bologna, Bologna, Italija

mmilic@imi.hr

UVOD

Utjecaj individualne predispozicije u staničnom odgovoru na izloženost niskim dozama ionizirajućeg zračenja značajniji je od utjecaja duljine trajanja te izloženosti [1,2]. Varijacije mogu biti rezultat promjena u ekspresiji gena, ali i posljedica polimorfizama gena koji kodiraju za proteine uključene u različite mehanizme popravka oštećene DNA [3-8].

Cilj istraživanja bio je primjenom mikronukleus (MN) testa utvrditi razinu postojanih oštećenja u genomu limfocita periferne krvi ispitanika profesionalno izloženih zračenju i odgovarajuće kontrolne skupine nastalih nakon izlaganja ionizirajućem zračenju pri dozi od 2 Gy, te istražiti povezanost statusa polimorfnosti gena koji sudjeluju u popravku DNA s nastalim oštećenjima i dinamikom stanične diobe.

MATERIJAL I METODE

U istraživanju je sudjelovalo 40 zdravih dobrovoljnih darivatelja venske krvi oba spola: 20 zdravstvenih radnika nepušača profesionalno izloženih niskim dozama ionizirajućeg zračenja, te 20 ispitanika odgovarajuće dobi, spola i navika pušenja koji su predstavljali kontrolnu skupinu. Krv za potrebe MN-testa izvađena je u sterilne heparinizirane spremnike, dok su uzorci namijenjeni izolaciji DNA uzimani u spremnike s etilendiamintetraocetnom kiselinom. Svi uzorci krvi ozračeni su gama-zračenjem doze 2 Gy. Zračenje je provedeno u posebnom nosaču ("fantomu") od pleksi stakla koji je bio postavljen na udaljenosti od 80 cm od izvora izotopa kobalta ⁶⁰Co (uređaj Alcyon, CGR-MeV smješten u Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu).

Kulture limfocita za MN-test pripremljene su u triplikatu prema standardnoj metodi [9]. Analiza preparata provedena je pod svjetlosnim mikroskopom, pri povećanju od 1000 \times . Po uzorku je pregledano 1000 binuklearnih limfocita s očuvanim citoplazmama u kojima je utvrđivana učestalost i raspodjela MN [10] te indeks diobe jezgara [11].

Genomska DNA izolirana je iz limfocita periferne krvi prema modificiranom protokolu [12] ili protokolu tvrtke QUIAGEN za izolaciju genomske DNA limfocita iz pune krvi (mini KIT). Uzorci su razrijeđeni do koncentracije od 10 ng μL^{-1} i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do početka postupka amplifikacije. Na izoliranoj DNA provedeno je određivanje polimorfizama gena koji sudjeluju u: A) popravku isijecanjem baza – gen APE1 (apurinska/apirimidinska endonukleaza, Asp148Glu), gen hOGG1 (ljudska 8 - oksoogvanin glikozilaza, Ser326Cys), gen XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein-group 1, Arg194Trp); B) popravku isijecanjem nukleotida – gen XPD (Xeroderma pigmentosum-group D, Lys751Gln); C) popravku dvolančanih lomova u molekuli DNA – gen XRCC3 (X-ray repair cross-complementing protein-group 3, Thr241Met), gen PARP1 (poli ADP riboza-polimeraza 1, Val762Ala); D) popravku nehomolognih krajeva – gen MGMT (metil-gvanin DNA metil-transferaza, Leu84Phe).

U statističkoj analizi rezultata primijenjeni su t-test i neparametrijski Mann-Whitney U-test (MW), za usporedbu parametara među skupinama, multipla regresijska analiza za analizu utjecaja parametara na cijelu skupinu, te Spearmanova korelacija za analizu promatranih parametara i parametara oštećenja (STATISTICA 9, StatSoft, Tulsa, SAD).

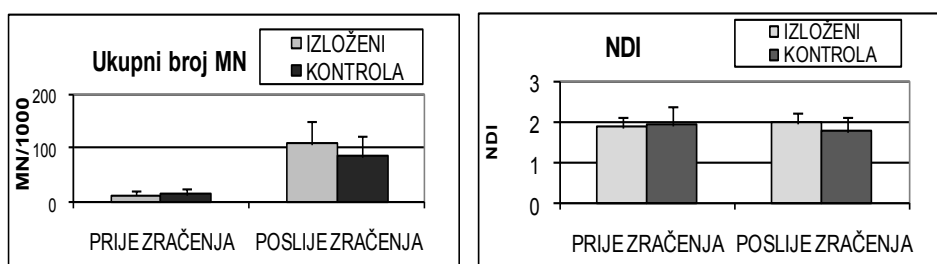
REZULTATI

Značajke ispitivane populacije s obzirom na dob, spol, duljinu radnog staža i prosječnu dozu zračenja registriranu dozimetrima (zbroj registriranih doza za vrijeme trajanja rada u zoni zračenja) prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Opće značajke istraživane populacije

Značajke	Izložena skupina	Kontrolna skupina
Broj ispitanika	20	20
Broj žena/muškaraca	9/11	9/11
Dob \pm S.D. / (Raspon)	41,40 \pm 9,62 / (25-60)	41,40 \pm 9,76 / (25-60)
Radni staž \pm S.D. / (Raspon)	12,13 \pm 7,14 / (1-28)	-
Izloženost \pm S.D. / (Raspon)	4,06 \pm 9,77 / (0-36,50)	-

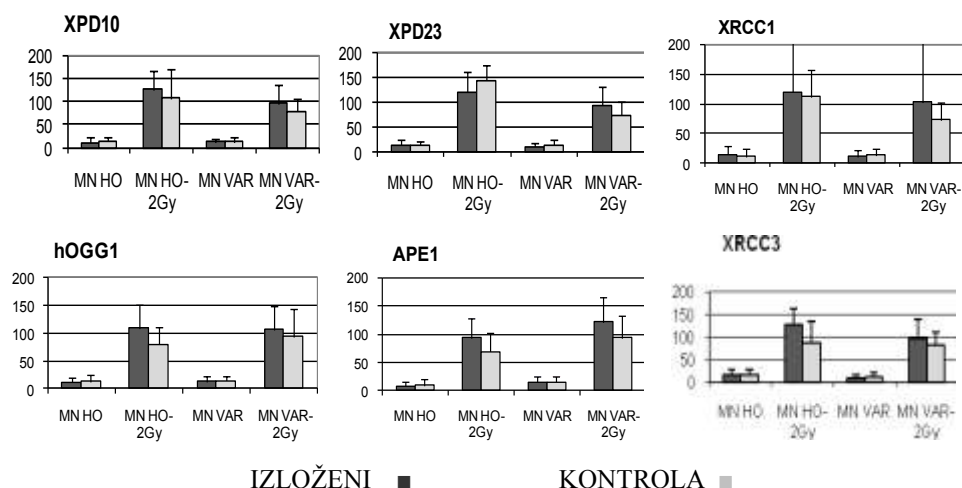
Učestalost MN i NDI u kontrolnoj i izloženoj skupini prikazani su na Slici 1. Učestalost MN kod ispitanika izložene skupine nakon zračenja (MN-2Gy) bila je viša nego kod kontrolne skupine, no zbog velike varijabilnosti razlike nisu bile statistički značajne. S druge strane, ozračivanje krvi značajno je utjecalo na kinetiku staničnih dioba (Mann Whitney U-test, $p = 0,04$). Multipla regresijska analiza pokazala je pozitivnu korelaciju polimorfnih gena APE1 i XRCC3 s MN u cijeloj skupini prije zračenja ($p = 0,055$; $F = 1,48$; β APE1 = 0,4; β XRCC3 = -0,34).



Slika 1. Učestalost MN i NDI u ispitivanoj populaciji prije i nakon zračenja uzoraka krvi

Dob ispitanika u cijeloj ispitivanoj populaciji pozitivno je korelirala sa učestalošću MN u ozračenim uzorcima (MN-2Gy) ($R = 0,42$; $p = 0,007$), te negativno s indeksom dioba jezgra prije zračenja (NDI, $R = -0,35$; $p = 0,03$) i poslije zračenja (NDI-2Gy, $R = -0,35$; $p = 0,03$). Proučavajući utjecaj spola, uočena je negativna korelacija ženskog spola i MN-2Gy ($R = -0,31$; $p = 0,05$). Kod žena je također nađena korelacija polimorfnih varijanti gena hOGG1 ($R = -0,48$; $p = 0,05$), APE1 ($R = 0,47$; $p = 0,06$) i XRCC3 ($R = -0,05$; $p = 0,04$) s MN; XRCC1 ($R = -0,48$; $p = 0,05$) s MN-2Gy; te APE1 ($R = -0,54$; $p = 0,02$) i PARP1 ($R = -0,45$; $p = 0,07$) s NDI-2Gy. Kod muškaraca je nađena korelacija dobi ispitanika s NDI ($R = -0,45$; $p = 0,03$), s MN-2Gy ($R = 0,45$; $p = 0,03$) te s NDI-2Gy ($R = -0,49$; $p = 0,02$). Izložena i kontrolna skupina razlikovale su se samo u NDI-2Gy (MW, $p = 0,04$). Razliku je pokazao i t-test ($p = 0,03$), a razlika u MN-2Gy nije bila statistički značajna ($p = 0,07$). U izloženoj skupini nađena je korelacija duljine izloženosti ($R = 0,52$; $p = 0,02$), dobi ($R = 0,45$; $p = 0,05$), radnog staža ($R = 0,47$; $p = 0,04$) s MN-2Gy i profesionalno primljene doze zračenja ($R = -0,52$; $p = 0,02$). Uočena je negativna korelacija između ženskog spola i MN-2Gy ($R = -0,55$; $p = 0,01$). Nakon podjele po zanimanjima u dvije određene skupine, uočena je pozitivna korelacija između MN-2Gy i zanimanja druge skupine u koju su spadali radiolozi, inženjeri medicinske radiologije, kirurzi i invazivni

kardiolozi ($R = 0,44$; $p = 0,05$; $(129,13 \pm 39,96)$ MN druge skupine vs. $(93,33 \pm 36,74)$ MN prve skupine: gastroenterolozi, anesteziolozi, medicinske sestre). Nakon usporedbe po spolu, pokazana je značajna razlika u MN-2Gy, gdje su muškarci imali veće vrijednosti (MW, $p = 0,05$; $(125,82 \pm 37,58)$ MN vs. $(85,44 \pm 35,32)$ MN).



Slika 2. Učestalost MN po genotipovima u ispitivanoj populaciji prije i nakon ozračivanja uzoraka krvi dozom zračenja od 2 Gy.

HO – homozigoti; VAR – varijante

MN HO prije zračenja, MN HO-2Gy poslije zračenja,
MN VAR prije zračenja, MN VAR-2Gy poslije zračenja

ZAKLJUČAK

Ovo je istraživanje potvrdilo vrijednost MN-testa kao osjetljive metode za analizu i procjenu trajnih oštećenja genoma nakon izloženosti ionizirajućem zračenju. Dobiveni rezultati također upućuju na vrijednost analize polimorfizama gena te sugeriraju mogućnost njene primjene zdravstvenom nadzoru populacija profesionalno izloženih zračenju.

Zahvala

Rad je izrađen uz financijsku potporu MZOŠ (projekt broj 22-0222148-2137).

LITERATURA

- [1] Andreassi MG, Cioppa A, Botto N, Joksic G, Manfredi S, Federici C, Ostojic M, Rubino P, Picano E. Somatic DNA damage in interventional cardiologists: a case-control study. *FASEB J* 2005;19:998-999.
- [2] Andreassi MG, Foffa I, Manfredi S, Botto N, Cioppa A, Picano E. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists. *Mutat Res* 2009;666:57-63.
- [3] Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 2005;14:1810-1818.
- [4] Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162:925-942.
- [5] Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005;221:123-129.
- [6] Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinogen* 2005;42:127-141.
- [7] Kotsopoulos J, Chen Z, Vallis KA, Poll A, Ainsworth P, Narod SA. DNA repair capacity as a possible biomarker of breast cancer risk in female BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer* 2007;96:118-125.
- [8] Milić M. Važnost individualne osjetljivosti za procjenu rizika od oštećenja genoma pri kroničnoj profesionalnoj izloženosti niskim dozama ionizirajućeg zračenja [disertacija]. Zagreb: Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; 2010.
- [9] Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleous method in human lymphocytes: effect of *in vivo* aging and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986;161:193-198.
- [10] Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003;534:65-75.
- [11] Eastmond DA, Tucker JD. Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutat Res* 1989;224:517-525.
- [12] Daly AK, Steen VM, Fairbrother KS, Idle JR. CYP2D6 multiallelism. *Meth Enzymol* 1996;272:199-210.

INFLUENCE OF SNP POLYMORPHISMS IN DNA REPAIR GENES ON THE LEVEL OF PERSISTENT DAMAGE IN HUMAN LYMPHOCYTES AFTER EXPOSURE TO 2 Gy OF IONISING RADIATION

*Mirta Milić¹, Ružica Rozgaj¹, Vilena Kašuba¹, Dragan Kubelka²,
Sabrina Angelini³ and Patrizia Hrelia³*

¹Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

²State Office for Radiological and Nuclear Safety, Zagreb, Croatia

³Department of Pharmacology, University of Bologna, Bologna, Italy
mmilic@imi.hr

Variation in cell response to ionising radiation could be result of changes in gene expression and/or polymorphisms of DNA repair genes. The aim of the study was to estimate the DNA damage level in human lymphocytes after exposure to 2 Gy of ionising radiation. Medical workers occupationally exposed to low doses of ionising radiation (N = 20) and matched controls (N = 20) were genotyped for polymorphic hOGG1, XRCC1, APE1, XPD10, XPD23, XRCC3, PARP1 and MGMT genes. Micronucleus (MN) test was used for the estimation of DNA damage before and after radiation. Incidence of MN in irradiated samples positively correlated with age and negatively with polymorphic variants of XPD23. Significant difference was observed between irradiated homozygotes (HO) and heterozygotes (HE). HO and HE APE1 differed in MN before exposure. HO and polymorphic variants of XPD10 differed in MN after exposure. Gender showed different MN in the exposed group after exposure. Age correlated positively with MN after exposure, working probation and received dose. Multiple regression analysis revealed connection between polymorphic variants of APE1 and XRCC3 with MN before exposure. These results confirm the value of micronucleus assay in DNA damage estimation and suggest possible use of polymorphic genes in monitoring of individuals professionally exposed to ionising radiation.