

Бияшева З.М.,
Хамдиева О.Х.,
Дьячков В.В., Зарипова Ю.А.,
Юшков А.В.

**Влияние альфа-излучения
при распадах радона
на развитие рака легких**

Biyasheva Z.M.,
Khamdiyeva O.Kh.,
Dyachkov V.V., Zaripova Yu.A.,
Yushkov A.V.

**Effect of alpha radiation from the
decay of radon on lung cancer**

Бияшева З.М.,
Хамдиева О.Х.,
Дьячков В.В., Зарипова Ю.А.,
Юшков А.В.

**Радонның ыдырауы кезіндегі
альфа-сәулеленудің өкпе
ісігінің дамуына әсер етуі**

Во многих странах радон является второй по значимости, после курения, причиной развития рака легких на долю которого приходится от 3% до 14% случаев. Развитые страны законодательно решают эту проблему, а также создают специальные службы. В работе представлены данные молекулярно-генетического анализа гена KRAS у больных раком легких, проживающих в городе Алматы, где уровень радона превышает нормы. Нарушения в исследуемом гене приводят к развитию многих видов рака. Проведенный анализ показал, что обследованные больные не имеют мутаций в 12-13 кодонах гена KRAS, что соответствует контрольной группе, включающей 90 человек. Возможно, это связано с малой выборкой исследуемой группы.

Ключевые слова: рак легких, радон, мутация, KRAS.

In many countries, radon is the second leading cause of lung cancer, which accounts for 3% to 14% of cases. The paper presents the molecular genetic analysis of the KRAS gene in patients with lung cancer who live in Almaty, where the radon level exceeds the norm. Disorders in the studied gene lead to the development of many cancers. The analysis showed that examined patients don't have a mutations in 12-13 codons of the KRAS gene, which corresponds to the control group, consisting of 90 people. Perhaps this is due to the small sample of the study group.

Key words: lung cancer, radon, mutation, KRAS.

Көптеген елдерде радон өкпе ісігін тудыратындардың ішінде темекі шегуден кейінгі маңызы жағынан екінші орында. Радоннан туындайтын өкпе ісігінің үлесі 3% дан 14%-ға дейін құрайды. Жасалған жұмыста радон деңгейі қалыпты мөлшерден жоғары Алматы қаласының өкпе ісігімен ауыратын тұрғындарының KRAS геніне молекулалы-генетикалық сараптама жүргізілген. Зерттеліп отырған гендегі бұзылыстар ісіктің көптеген түрлерінің дамуына алып келеді. Жүргізілген молекулалы-генетикалық сараптама тексерген науқастардың KRAS генінің 12-13 кодонында мутация жоқтығын көрсетті. Бұл көрсеткіш 90 адаммен қосқанда бақылау тобымен сәйкес келеді. Мүмкін, бұл зерттеліп отырған топтағы адам санының аздығымен байланысты.

Түйін сөздер: өкпе ісігі, радон, мутация, KRAS.

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ РАСПАДАХ РАДОНА НА РАЗВИТИЕ РАКА ЛЕГКИХ

Введение

Территория Казахстана характеризуется напряженной радиационной обстановкой, обусловленной наличием полигонов и площадок ядерных испытаний, распространением в недрах пород с большим количеством урана и тория, особенностями геологического строения. Среди естественных источников ионизирующих излучений радон и его производные наиболее значимое воздействие оказывает на биоту. Известно 19 изотопов радона (все – радиоактивны), из которых 3 являются природными: ^{219}Rn (An, актинон, период полураспада, $T_{1/2} = 3,92$ сек), ^{220}Rn (Tn, торон, $T_{1/2} = 51,5$ сек) и ^{222}Rn (Rn, радон, $T_{1/2} = 3,82$ дн). В 1 м³ воздуха при нормальных условиях содержится $7 \cdot 10^{-6}$ г радона. Изотопы радона короткоживущие, но они никогда не исчезают из атмосферного воздуха, так как радон постоянно поступает в атмосферу из земных пород. Диапазон энергий альфа-частиц в области 5,5 МэВ представляет особый интерес тем, что именно в этой области находятся энергии всех α -частиц, испускаемых при радиоактивном распаде трех природных изотопов радона – ^{219}Rn , ^{220}Rn , ^{222}Rn и их дочерних продуктов распада (ДПР) [1].

Проблемой негативного воздействия радона на организм человека в нашей стране начали заниматься в начале 90-х гг. Появились регламентирующие документы, специальная измерительная аппаратура, и силами сотрудников Госсаннадзора начал проводиться контроль содержания радона в помещениях. В законе Республики Казахстан от 23 апреля 1998 года № 219-І «О радиационной безопасности населения» говорится, что содержание радона в воздухе эксплуатируемого помещения не должно превышать 200 Бк/м³, а в воздухе проектируемых объектов социального назначения — 100 Бк/м³[2]. Превышение указанных нормативов может привести к необратимым генетическим изменениям в организме человека. Очевидно, что население всех развитых и промышленных стран мира большую часть времени, почти 80%, проводят внутри помещений и поэтому необходимо уметь контролировать и, конечно же, исследовать получаемую дозу облучения, обусловленную на-

личием радона в помещении за счет эманации радона из почвы и эксхалации радона из различных стройматериалов [3,4].

Радон является второй по значимости после курения причиной развития рака легких. Доля случаев рака легких, вызванных радоном, оценивается от 3% до 14%. Исследования, проведенные в Европе, Северной Америке и Китае, подтвердили, что низкие уровни концентрации радона, такие как, уровни в домах, также представляют риски для здоровья и в значительной мере способствуют заболеваемости раком легких во всем мире [5,6].

Для исследования влияния радонового излучения на организм был выбран ген *KRAS*. Это протоонкоген, представитель семейства белков Ras, которые участвуют в трансдукции клеточного цикла. Белок *KRAS* представляет собой ГТФазу и является компонентом многих путей передачи сигнала. Большинство мутаций, приводящих к активации гена *KRAS*, находятся во втором экзоне в кодонах 12 и 13, мутации в этих кодонах ответственны за развитие различных типов рака [7].

Материалы и методы

Объектом исследования служили образцы крови, полученные от пациентов с диагнозом рак легких, находящихся на лечении в Алматинском онкологическом центре и проживающих в городе Алматы, где уровень активности радона превышает норму, утвержденную международной комиссией по радиационной безопасности.

Геномную ДНК из лимфоцитов периферической крови выделяли с помощью набора GeneJet Genomic DNA Purification Kit фирмы Thermo scientific в соответствии с протоколом. Для определения генотипа в 12 и 13 кодоне гена *KRAS* проводили полимеразную цепную реакцию с последующим рестрикционным анализом (RFLP – анализ). Для проведения ПЦР-анализа на наличие мутаций гена *KRAS* были синтезированы праймеры (Таблица 1).

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 0,3-0,4 мкг геномной ДНК, 25 пикамоль каждого праймера, 12 мкл Mmix и 10 мкл H₂O. Режим ПЦР: денатурация ДНК при 94°C в течение минуты, затем: 94°C – 40 сек., 55°C – сек., 72°C – 40 сек., всего – 35 циклов, с заключительным синтезом при 72°C в течение 9 мин. Качество полученных ПЦР-продуктов проверяли электрофоретическим методом в 2% агарозном геле. Полученные ПЦР-продукты подвергались гидролизу эндонуклеазами рестрикции BstNI и HaeIII. Рестрикционный анализ продуктов ПЦР проводили в условиях, рекомендованных изготовителем (Thermo scientific). Для этого эндонуклеазу добавляли из расчета 1-2 ед. активности на пробу объемом 10 мкл в зависимости от концентрации ДНК в пробе. Гидролиз ДНК проводили в термостате при 37°C в течение 3 часов. Продукты рестрикции выявляли методом электрофореза в 15% ПААГ и 1хTBE буфере. После окончания электрофореза, полиакриламидный гель окрашивали бромистым этидием и полученные результаты анализировали с помощью трансиллюминатора.

Таблица 1 – Праймеры для амплификации фрагмента 2 экзона гена KRAS

№	Исследуемый кодон	Последовательность праймера
1	<i>KRAS</i> 12	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'
		5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3'
2	<i>KRAS</i> 13	5'-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'
		5'-TAAATGTGCGACTAAAACAAGATTTACCTC-3'

Результаты и их обсуждения

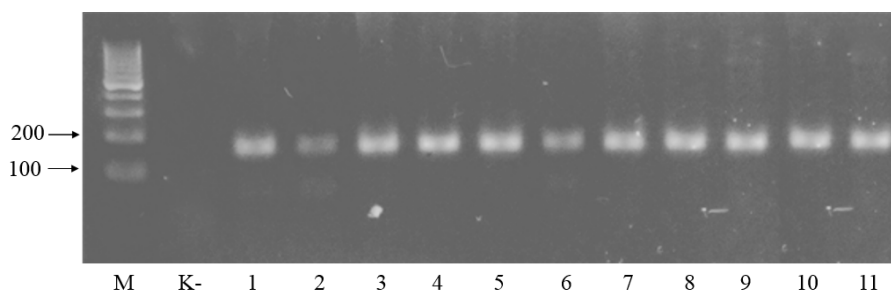
По согласию больных было проведено анкетирование, данные анкет обработаны и внесены в специально разработанную электронную базу в формате Microsoft Excel для удобства пользования информацией и проведения расче-

тов. Созданная электронная база содержит персональные данные о пациенте, информацию о биоматериале, количестве и качестве образцов ДНК, а также результаты проведенных молекулярно-генетических исследований.

По анкетным данным средний возраст больных составил 58 лет, из них 13 мужчин и 10 жен-

щин. Количество некурящих больных составило 9 человек, 14 курили. Из опрошенных пациентов шестеро имели сопутствующие болезни: двое

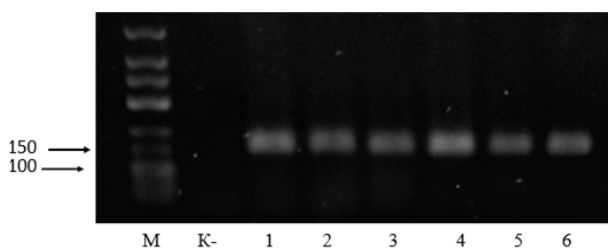
болели хроническим бронхитом; у одного больного был плеврит; у одной – миома; 1 – хронический панкреатит; 1- хроническая ангина.



Обозначения: М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н.;
К- контрольный образец, показывает отсутствие загрязнения в реакционной смеси;
1-11– ПЦР – продукты

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР – продуктов фрагмента 2 экзона гена KRAS на наличие мутаций в 12 кодоне

По данным литературных источников наиболее часто встречаемой мутацией у пациентов с раком легких является замена GT→CT в 12 кодоне гена *KRAS* (21,6%) [8]. Для определения генотипа, включавшего ПДРФ-анализ ПЦР-продуктов на наличие специфических мутаций в гене *KRAS*, были получены ПЦР-продукты размером 163 п.о. (Рисунок 1) и 159 п.о. (рисунок 2).

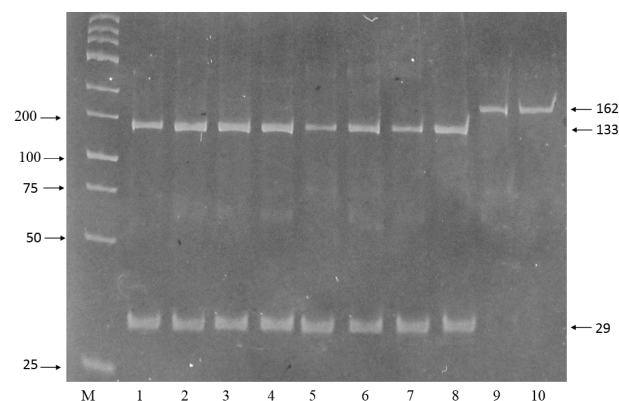


Обозначения: М – маркер молекулярного веса с шагом 25 п.н.; К- контрольный образец, показывает отсутствие загрязнения в реакционной смеси; 1-6 – ПЦР – продукты

Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР – продуктов гена KRAS на наличие мутаций в 13 кодоне

Возникновение мутации в этом кодоне приводит к исчезновению сайта рестрикции для эндонуклеазы *BstNI*, а при отсутствии мутации эндонуклеаза *BstNI* гидролизует ПЦР-продукты на два фрагмента. На рисунке 3 показаны продукты рестрикции, которые после гидролиза образова-

ли два фрагмента длиной 133 п.о. и 29 п.о., что говорит об отсутствии мутации в 12 кодоне.



Обозначения: М – маркер молекулярного веса с шагом 25 п.н.; 1-8 – образцы ДНК пациентов без мутации в 12 кодоне; 9, 10 – ПЦР-продукты не подвергнутые гидролизу эндонуклеазой *BstNI*

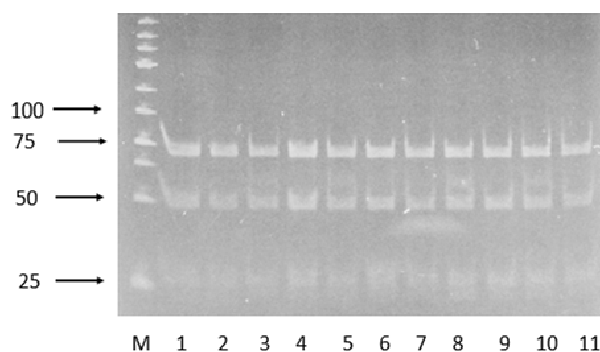
Рисунок 3 – Электрофореграмма ПДРФ-анализа продуктов амплификации гена KRAS на наличие мутаций в 12 кодоне

Второй наиболее часто встречаемой мутацией является замена G→T в 13 кодоне. Эта мутация приводит к исчезновению сайта рестрикции для эндонуклеазы *HaeIII*. При рестрикции ПЦР-продукта размером 159 п.о. в случае отсутствия мутации имеется два сайта для эндонук-

леазы, что приводит к образованию трех фрагментов (85 п.о., 48 п.о. и 26 п.о.) (Рисунок 4).

В целом, молекулярно-генетические исследования показали, что 23 обследованных больных не имеют мутаций в 12-13 кодонах гена *KRAS*, что соответствует обследованной контрольной группе, включающей 90 человек. Возможно это связано со спецификой казахстанской популяции, которая ранее в этом направлении не изучалась.

Работа выполнена по гранту МОН РК по теме 2554/ГФ4 «Исследование радоновой онкоопасности населения путем измерений вертикальной, горизонтальной и временной топологии эманации и ее аккумуляирования в биологических объектах»



Обозначения: М – маркер молекулярного веса с шагом 25 п.н.; 1-11 – образцы ДНК пациентов без мутации в 13 кодоне

Рисунок 4 – Электрофореграмма ПДРФ-анализа продуктов амплификации фрагмента 2 экзона гена *KRAS* на наличие мутаций в 13 кодоне

Литература

- 1 Н.Г. Ригер, Ю.А. Зарипова, В.В. Дьячков, С.М. Тореханова, А.В. Юшков, Кастер, С.А. Ибрагимова. Сферосомы в качестве моделей биологических мембран при изучении воздействия альфа-излучения радона // Вестник КазНУ. Серия биологическая – 2014. – №1/1 (60). – С. 52-55.
- 2 Юшков А.В., Дьячков В.В. Ядерно-физические механизмы воздействия альфа-излучения радона на клетку и проблема онкозаболеваемости // Сборник научных трудов по материалам круглого стола «научные достижения в области экологии и охраны окружающей среды». – Алматы. – 2012. – С. 21-27.
- 3 James Milner, Clive Shrubsole, Payel Das, Benjamin Jones, Ian Ridley, Zaid Chalabi, Ian Hamilton, Ben Armstrong, Michael Davies and Paul Wilkinson Home energy efficiency and radon related risk of lung cancer: modelling study // BMJ. – 2014. – Vol. 348. – Published online Jan
- 4 Chen J., Moir D., and Whyte J. Canadian population risk of radon induced lung cancer: a re-assessment based on the recent cross-Canada radon survey // RadiatProt Dosimetry. – 2012. – Vol. 152. – P. 9–13.
- 5 X, Fan Y, Jiang Y, Xiang J, Wang J, Sun Z, Ren G, Yao S, Chang R, Zhao Y, Qiao Y, Zhou Q. A cohort study on risk factors of lung cancer in Yunnan tin miners // ZhongguoFei Ai ZaZhi. – 2013. – Vol.16 (4). – P. 184-90.
- 6 Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol.39 – P.945-950.
- 7 Kreuzer M. Dufey F. Laurier D. Nowak D. Marsh J. W. Schnelzer M. Sogl M. Walsh L. Mortality from internal and external radiation exposure in a cohort of male German uranium millers, 1946–2008 // Int Arch Occup Environ Health. – 2014.- Vol. 88. – P. 431–441.
- 8 Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, et al. Different types of *KRAS* as mutations could affect drug sensitivity and tumour-behaviour in non-small-cell lung cancer // Ann Oncol. – 2011. – Vol.22. – P.235-237.

References

- 1 Riger N.G., Zaripova Y.A., Dyachkov V.V., Torehanova S.M., Yushkov A.V., Kaster, Ibragimova S.A. Spherosomes as models of the biological membranes in the study of the effects of alpha radiation of radon isotopes // KazNU BULLETIN. Biology series – 2014. – №1/1 (60). – P. 52-55.
- 2 Yushkov A.V., Dyachkov V.V. Nuclear-physical mechanisms of action of alpha radiation on cells and radon problem oncological diseases // Collection of scientific papers on the materials of the round table «scientific achievements in the field of ecology and environmental protection.» – Almaty. – 2012. – P. 21-27.
- 3 James Milner, Clive Shrubsole, Payel Das, Benjamin Jones, Ian Ridley, Zaid Chalabi, Ian Hamilton, Ben Armstrong, Michael Davies and Paul Wilkinson Home energy efficiency and radon related risk of lung cancer: modelling study // BMJ. – 2014. – Vol. 348. – Published online Jan
- 4 Chen J., Moir D., and Whyte J. Canadian population risk of radon induced lung cancer: a re-assessment based on the recent cross-Canada radon survey // RadiatProt Dosimetry. – 2012. – Vol. 152. – P. 9–13.
- 5 X, Fan Y, Jiang Y, Xiang J, Wang J, Sun Z, Ren G, Yao S, Chang R, Zhao Y, Qiao Y, Zhou Q. A cohort study on risk factors of lung cancer in Yunnan tin miners // ZhongguoFei Ai ZaZhi. – 2013. – Vol.16 (4). – P. 184-90.

6 Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol.39 – P.945-950.

7 Kreuzer M, Dufey F, Laurier D, Nowak D, Marsh J. W, Schnelzer M, Sogl M, Walsh L. Mortality from internal and external radiation exposure in a cohort of male German uranium millers, 1946–2008 // *Int Arch Occup Environ Health.* – 2014.- Vol. 88. – P. 431–441.

8 Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, et al. Different types of *KRAS* mutations could affect drug sensitivity and tumour-behaviour in non-small-cell lung cancer // *Ann Oncol.* – 2011. – Vol.22. – P.235-237.