

УДК 575.224.22:575.174.015.3

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ТИПА G:C>T:A, G:C>A:T И G:C>C:G В ГЕНЕ TP53 У ОБЛУЧЕННЫХ ЖЕНЩИН С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И БЕЗ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. В. С. Никифоров*, **, @, А. В. Кореченкова*, А. В. Аклеев*, **

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

“Уральский научно-практический центр радиационной медицины” ФМБА России,
лаборатория молекулярно-клеточной радиобиологии, ул. Воровского, д. 68, корп. А, г. Челябинск, 454141 Россия

**Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования

“Челябинский государственный университет”, кафедра радиационной биологии,
ул. Братьев Кашириных, д. 129, г. Челябинск, 454001 Россия

@E-mail: nikiforovx@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 28.04.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

Работа представляет результаты анализа мутаций типа G:C>T:A, G:C>A:T и G:C>C:G в гене TP53 в клетках периферической крови у 24 женщин с раком молочной железы и у 17 женщин без такового, подвергшихся хроническому облучению. Было обнаружено 17 различных вариантов, представляющих собой однонуклеотидные замены. Различия частот носителей обнаруженных вариантов между группой сравнения и основной не достигали статистически значимого уровня. Все обнаруженные варианты присутствовали в базе данных IARC TP53 и не имели клинического значения как «патогенные». Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, вопрос о влиянии хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия на частоту мутаций в гене TP53 остается открытым и требует дальнейших исследований с привлечением большего объема данных.

Ключевые слова: TP53, секвенирование по Сэнгеру, река Теча, хроническое облучение, малые и средние дозы, трансверсия

DOI: 10.31857/S1026347024060043, **EDN:** uksksu

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым раком и ведущей причиной смерти от рака у женщин по всему миру и составляет 23% от всех случаев рака и 14% от смертности, связанной со всеми видами рака (Кулигина, 2010). Молочная железа у женщин является одним из наиболее радиочувствительных органов, и воздействие ионизирующего излучения (ИИ) играет большую роль в радиационно-индуцированном канцерогенезе и развитии РМЖ (UNSCEAR, 2006). Увеличение риска РМЖ у женщин наблюдалось после многократных рентгеновских обследований, радиотерапии, после атомных бомбардировок в Японии (Preston *et al.*, 2007, 2016).

В этиологию РМЖ вовлечены как генетические факторы, так и факторы образа жизни и окружающей среды. Близнецовое исследование вклада наследственных факторов в риск развития злокачественных новообразований выявило статистически значимый эффект наследственных факторов для

РМЖ (27%; 95% доверительный интервал (ДИ), 4–41%) (Lichtenstein *et al.*, 2000). Негенетические факторы включают менструальную и репродуктивную историю, индекс массы тела, употребление алкоголя, физическую активность, воздействие ионизирующего излучения (ИИ) (Кулигина, 2010; Kleibl, Kristensen, 2016).

Известные на сегодняшний день генетические варианты, связанные с риском РМЖ, классифицируются как высоко пенетрантные (в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*), которые редко встречаются в популяции и ассоциированы с высоким относительным риском (RR) носителей по сравнению с неносителями (5 – 20>); умеренно пенетрантные варианты с умеренно повышенным риском (в генах *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2*) и слабо пенетрантные варианты, которые встречаются часто и связаны с небольшим увеличением риска (RR <1,5) (Кулигина, 2010; Ripperger *et al.*, 2009).

TP53 является ключевым супрессором опухоли, участвующим в нескольких путях клеточного ответа на стресс, которые регулируют клеточный цикл, апоптоз, старение и восстановление ДНК. *TP53* (OMIM #191170) расположен на 17 хромосоме (17p13.1) и кодирует транскрипционный фактор p53. Канонический белок p53 (p53α) представляет собой наиболее распространенную изоформу, кодируемую *TP53*, который состоит из 11 экзонов и 10 интронов. Другие изоформы p53 являются результатом альтернативного сплайсинга, действия альтернативных промоторов и альтернативной инициации трансляции.

Большинство соматических и наследуемых вариантов гена *TP53*, обнаруженных в раковых клетках, являются миссенс-мутациями, находящимися наиболее часто в ДНК-связывающем домене белка. Эти мутации нарушают способность белка связываться с таргетными последовательностями ДНК и, таким образом, предотвращают транскрипционную активацию этих генов. Кроме того, *TP53* высоко полиморфен как в кодирующих, так и в некодирующих областях. По данным международного агентства по исследованию рака, большинство подтвержденных полиморфизмов *TP53* расположено в интронных областях гена (IARC *TP53* Database). И на сегодняшний день существует множество исследований, показывающих, что некоторые полиморфизмы, как интронные, так и экзонные, повышают восприимчивость к раку и модифицируют фенотипы рака у носителей мутаций *TP53* (Anoushirvani *et al.*, 2018; Assad *et al.*, 2019).

Около 30% миссенс-мутаций *TP53* обнаруживаются при развитии рака в высокомутабельных областях человеческого гена — CpG-островках, где частоты цистеиновых и гуаниновых оснований сравнительно выше (Jafrin *et al.*, 2020). И в результате оксидативного стресса, возникшего под действием эндогенных и/или экзогенных агентов, в том числе и ИИ, гуанин может легко подвергаться окислению из-за низкого окислительно-восстановительного потенциала (Steenken, Jovanovic,

1997). Могут возникать повреждения ДНК, приводящие к трансверсиям G:C>T:A, G:C>C:G и транзициям G:C>A:T (Ming, 2014; Kino, 2017). Так, отмечается увеличение числа переходов G>T в гене *TP53* у курящих пациентов с раком легких (Rodin, Rodin, 2004), а также у людей с раком кожи, вызванным УФ-излучением (Dumaz, 1999). При воздействии нейтронного облучения на мышинных моделях наблюдалась положительная корреляция между числом транзиций C:G>T:A и продолжительностью роста опухоли молочной железы (Moriyama, 2021).

Целью настоящей работы был анализ мутаций типа G:C>T:A, G:C>A:T и G:C>C:G гена *TP53* в клетках периферической крови у женщин с раком молочной железы и без такового, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Секвенирование по Сэнгеру гена *TP53* было проведено для 41 женщины из когорты реки Течи. В ходе работы было сформировано 2 выборки: в первую вошли 24 женщины, имеющие в своем анамнезе РМЖ, во вторую вошли 17 женщин, не имеющие злокачественных новообразований (ЗНО). Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1. При формировании обследованных групп были использованы следующие критерии включения в исследование:

1) облученные лица из когорты реки Течи — постоянно проживавшие в одном из 41 сел, расположенных на побережье реки Течи, в период с 01.01.1950 по 31.12.1960;

2) наличие рассчитанной индивидуальной поглощенной накопленной дозы облучения красного костного мозга (ККМ), тимуса и периферических лимфоидных органов (Дегтева и др., 2019).

Средний возраст женщин с РМЖ составил 69.9 ± 1.1 год, (диапазон: 62.0–79.0 лет), у женщин без РМЖ 71.5 ± 1.4 (диапазон: 58.0–82.0 лет).

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Показатель		С РМЖ	Без РМЖ	Уровень значимости различий, p
Объем выборки		N=24	N=17	
Этническая группа	Славяне	15 (62.6)	8 (53.3)	$\chi^2 = 0.321$ $p = 0.572$
	Тюрки	9 (33.4)	7 (46.7)	
		M±SE (min-max)		
Возраст, лет		69.9 ± 1.1 (62.0–79.0)	71.5 ± 1.4 (58.0–82.0)	0.40
Доза облучения ККМ, мГр		693.3 ± 168.4 (25.0 – 3507.1)	604.0 ± 191.3 (2.0–2740.0)	0.39
Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр		96.0 ± 25.8 (8.0–596.5)	92.2 ± 45.4 (0.8–780.0)	0.16

По этнической принадлежности в двух выборках численно преобладали славянские женщины.

Индивидуальные накопленные дозы облучения на ККМ у женщин с РМЖ составляли от 25.0 до 3507.1 мГр (среднее значение и ошибка среднего — 693.3 ± 168.4 мГр ($M \pm SE$)). Индивидуальные накопленные дозы облучения на тимус и периферические лимфоидные органы находились в диапазоне от 8.0 до 596.5 мГр (среднее значение и ошибка среднего — 96.0 ± 25.8 мГр).

В группе женщин без РМЖ индивидуальные накопленные дозы, в перерасчете на ККМ, составили от 2.0 до 2740.0 мГр (среднее значение и ошибка среднего — 604.0 ± 191.3 мГр), индивидуальные накопленные дозы облучения, в перерасчете на тимус и периферические лимфоидные органы, находились в диапазоне от 0.8 до 780.0 мГр (среднее значение и ошибка среднего — 92.2 ± 45.4 мГр).

Источником ДНК служили образцы цельной крови, которые хранились в биобанке лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России при температуре -80°C .

ДНК выделяли методом органической экстракции с помощью набора реагентов Extra Phen (ООО НПФ «АТГ-Биотех», Россия). Количество ДНК и чистоту образцов ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Значения отношения A260/A280 находились в интервале 1.7–1.9. С помощью программы Primer Designer™ Tool (Thermo Scientific, США) были выбраны праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, перекрывающих 2–11 экзоны гена TP53, и их секвенирования по Сэнгеру (табл. 2).

ПЦР проводили в амплификаторе C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad, США). Наличие целевого продукта в ПЦР смеси после проведения амплификации оценивали с помощью агарозного гель-электрофореза. С помощью набора ExoSAP-IT (Thermo Fisher, USA) осуществлялась ферментативная очистка продуктов ПЦР. По завершении очистки проводили секвенирующую реакцию. На 5' конце праймеров для ПЦР находился универсальный сайт прикрепления секвенирующих праймеров (M13). Олигонуклеотиды были синтезированы

Таблица 2. Праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, перекрывающих 2–11 экзоны гена TP53

№ п/п	Последовательности праймеров (5'→3')	№ ампликона	Длина, п.н.
1	F: GGGACTGTAGATGGGTGAAAAGAG R: CTGTCTCAGACACTGGCATGGT	1	463
2	F: GAATCCCAAAGTTCCAAACAAAAGAA R: AGACTTCCTGAAAACAACGTTCTG	2	500
3	F: GAGAGATGCTGAGGGTGTGATG R: CTGGGCTTCTTGCACTTCTGG	3	274
4	F: GTGAACAGATAAAGCAACTGGAAGAC R: ATCCCATCACACCCTCAGCATCT	4	511
5	F: CTCATAGGGCACCACCACACTA R: CTGAGGTGTAGACGCCAAGTCT	5	517
6	F: GGGAGGCCCTTAGCCTCTGTAA R: TTTGCCAACTGGCCAAGACC	6	546
7	F: AAAGAGAAGCAAGAGGCAGTAAGG R: CTTGCCACAGGTCTCCCAAG	7	497
8	F: TGTGTGTTGGGCAGTGCTAGGA R: CATACTACTACCCATCCACCTCTC	8	494
9	F: CATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGAAC R: CAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAA	9	506
10	F: TAAAAGTAGGCTAGGCAGGCC R: AAGGACCAGACCAGCTTTCAA	10	531
11	F: GGCTGGGAGTTGCGGAGAAT R: GCAGTTTCTACTAAATGCATGTTGCTT	11	488
12	F: GGACAGCTTCCCTGGTTAGTACGG R: GGGTGTGGCCACCATCTTGA	12	566
13	F: CAAGTCTTGGTGGATCCAGATCAT R: CCACTGAACAAGTTGGCCTGC	13	578
14	F: TTCACCCCTCAGACACACAGGT R: TCCCACACCCTGGAGGATTTTCAT	14	543
15	F: GGCTCAGCCTTGCTAAATCAGA R: CAGCTGGAAGGGTCAACATCTT	15	493

фирмой Invitrogen (США), последовательности: Forward – GTTGTAACGACGGCCAGTG, Reverse – AGCGGATAACAATTCACACAGGA. Для секвенирования использовали BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, США). Условия проведения циклического секвенирования представлены в табл. 3. Секвенирующие смеси очищали с помощью BigDyeX Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США). Сборку контиг, выравнивание последовательностей, сравнение с референтной последовательностью гена TP53 (NG_017013.2) выполняли с помощью программы SeqScape v2.7 (Thermo Fisher, США). Биологическое значение детектированных вариантов анализировали с помощью базы данных IARC TP53 Database (Bouaoun *et al.*, 2016).

Значимость различий частоты встречаемости носителей вариантов секвенированной в нашем исследовании последовательности TP53 гена между основной группой и группой сравнения оценивали с помощью точного теста Фишера. Уровень значимости установили $p < 0.05$. Расчеты производили с помощью ПО Statistica V. 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование экзонных (2–11 экзоны) и фланкирующих интронных регионов гена TP53 в образцах геномной ДНК всех обследованных лиц

выявило 17 различных вариантов, представляющих собой однонуклеотидные замены, представленные на рис. 1. Два варианта находились в кодирующих регионах: rs1042522 (4 экзон) и rs762846821 (5 экзон). 15 вариантов находились в некодирующей области гена: из которых 10 вариантов: rs1642785, rs138066738, rs1039127691, rs540683791, rs17883323, rs35850753, rs543198710, rs12947788, rs77697176, rs1385420854 – были представлены заменами в интронах, один вариант rs2909430 располагался в 5'НТО (5'-нетранслируемой области), а четыре варианта – rs4968187, rs199729221, rs17884306 и rs1614984 – в 3'НТО (3'-нетранслируемой области) гена TP53. Вариант rs1614984 являлся вариантом последовательности, расположенной в пределах половины килобазы от конца гена.

Ни один из обнаруженных вариантов не имел клинического значения как «патогенный» или «вероятно патогенный» согласно базе данных NCBI ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Все из обнаруженных нами вариантов присутствовали в базе данных IARC TP53 Database. Обнаруженные варианты последовательности представлены в табл. 4

В табл. 5 представлены частоты встречаемости носителей вариантов гена TP53 в группах обследованных женщин с РМЖ и без такового. Как видно из данных, различия частот носителей обнаруженных вариантов гена TP53 между двумя исследуемыми группами не достигали статистически значимого

Таблица 3. Условия проведения циклического секвенирования

	Стадия				
	Инкубация	25 циклов			Хранение до стадии очистки
		Денатурация	Отжиг	Элонгация	
Скорость нарастания	—	1°С/сек			
Температура	96°С	96°С	50°С	60°С	4°С
Время	01:00	00:10	00:05	04:00	∞



Рис. 1. Обнаруженные замены в гене TP53.

Таблица 4. Описание обнаруженных вариантов гена TP53 у обследованных женщин из когорты реки Течи

№	Расположение (GRCh38.p14 chr 17)	кДНК	ОНП	Расположение	№ кодона	Тип замены/ область замены
1	g.7676483G>C	c.74+38C>G	rs1642785	2-интрон	0	Интронный вариант
2	g.7676340G>C	c.96+42C>G	rs138066738	3-интрон	0	Интронный вариант
3	g.7676328C>T	c.96+54G>A	rs1039127691	3-интрон	0	Интронный вариант
4	g.7676324C>G	97-52G>A	rs540683791	3-интрон	0	Интронный вариант
5	g.7676301G>T	c.97-29C>A	rs17883323	3-интрон	0	Интронный вариант
6	g.7676154G>C	c.215C>G	rs1042522	4-экзон	72	Миссенс- вариант
7	g.7675353C>T	c.376-117G>A	rs35850753	4-интрон	0	Интронный вариант
8	g.7675327C>T	c.376-91G>A	rs2909430	4-интрон	0	5'НТО
9	g.7675151C>T	c.461G>A	rs762846821	5-экзон	154	Миссенс- вариант
10	g.7674754G>A	c.672+105C>T	rs543198710	6-интрон	0	Интронный вариант
11	g.7674109G>A	c.782+72C>T	rs12947788	7-интрон	0	Интронный вариант
12	g.7673183G>A	c.993+352C>T	rs77697176	9-интрон	0	Интронный вариант
13	g.7673051G>A	c.993+484C>T	rs1385420854	9-интрон	0	Интронный вариант
14	g.7669124C>T	c.*485G>A	rs4968187	11-экзон	0	3'НТО
15	g.7668855G>A	c.*754C>T	rs199729221	11-экзон	0	3'НТО
16	g.7668783C>T	c.*826G>A	rs17884306	11-экзон	0	3'НТО
17	g.7668134G>A	c.*1475C>T	rs1614984	3'НТО	0	3'НТО

уровня. Также не было выявлено дозовых зависимостей наличия трансверсий в исследуемых группах.

TP53 содержит более 100 подтвержденных, встречающихся в природе однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), но только некоторые из них были изучены на предмет влияния на функции p53. Наиболее охарактеризованным экзонным ОНП является немолчащая замена кодона 72 в экзоне 4 (rs1042522, g.7676154G>C, p. Pro72Arg), которая присутствует у населения при частоте минорного аллеля от 10% (европейцы, Северная Европа) до 50% (африканцы, йоруба) (Hainaut, Pfeifer, 2016). Этот ОНП определяет варианты белка с различными функциональными свойствами. Вариант p53, имеющий полиморфный аллель, кодирующий аргинин (G), обладает более сильным апоптотическим потенциалом, в то время как вариант, кодирующий пролин (C), более эффективно индуцирует остановку клеточного цикла и восстановление ДНК (Eiholzer *et al.*, 2020). Несмотря на отсутствие

статуса «патогенный» в базе ClinVar, к настоящему дню накопилось немало исследований, демонстрирующих ассоциацию этого полиморфизма с различными типами ЗНО. Так, rs1042522 является одним из 25 ОНП, которые, как сообщается, независимо представляют незначительный, но кумулятивно значимый повышенный риск развития рака молочной железы (Johnson *et al.*, 2007). Отмечена повышенная частота rs1042522 у женщин с РМЖ, облученных в результате деятельности Семипалатинского полигона с расчетной эффективной эквивалентной дозой 500 мЗв, по сравнению с необлученной контрольной группой имеющих РМЖ (Arsalikov *et al.*, 2016). Кроме того, полиморфизм может быть связан с риском радиационно-индуцированной поздней кожной токсичности (отношение шансов (ОШ) на аллель C: 1.79, 95% ДИ: 1.06–3.02, p = 0.028) у пациенток с раком молочной железы, получавших адъювантную лучевую терапию в общей дозе 50 Гр (Cargnin *et al.*, 2021).

Таблица 5. Частота встречаемости гомо- и гетерозиготных носителей вариантов гена TP53 у женщин с РМЖ и без

	ОНП	MAF*, %	Женщины без РМЖ (n = 17)		Женщины с РМЖ (n = 24)		p
			Количество человек	Частота, абс.	Количество человек	Частота, абс.	
1	rs1642785	0.42	14	0.82	14	0.58	0.17
2	rs138066738	0.02	2	0.12	2	0.08	1.00
3	rs1039127691	<0.01	1	0.06	2	0.08	1.00
4	rs540683791	<0.01	1	0.06	1	0.04	1.00
5	rs17883323	0.08	1	0.06	1	0.04	1.00
6	rs1042522	0.46	14	0.82	15	0.63	0.29
7	rs35850753	0.01	0	0	2	0.08	0.50
8	rs2909430	0.33	17	1	22	0.92	0.50
9	rs762846821	<0.01	1	0.06	0	0	0.41
10	rs543198710	<0.01	0	0	1	0.04	0.58
11	rs12947788	0.18	2	0.12	4	0.17	1.00
12	rs77697176	0.02	3	0.18	3	0.13	0.67
13	rs1385420854	<0.01	11	0.65	15	0.63	1.00
14	rs4968187	0.05	4	0.24	2	0.08	0.21
15	rs199729221	<0.01	12	0.71	12	0.50	0.21
16	rs17884306	0.06	3	0.18	0	0	0.06
17	rs1614984	0.38	10	0.59	12	0.50	0.75

Примечания. * Усредненная частота минорного аллеля для европеоидных популяций (<http://www.ensembl.org>)

В нашем исследовании был обнаружена еще одна замена, расположенная в 5 экзоне (rs762846821, g.7675151C>T, p. Gly154Val). Данных относительно рисков развития РМЖ в литературе не было обнаружено, однако есть сообщения вероятной патогенности варианта относительно карциномы тимуса (Szpechcinski *et al.*, 2022).

Открытие различных изоформ TP53 (p53β, p53γ, Δ40p53α/β/γ, Δ133p53α/β/γ, Δ160p53α/β/γ), двух новых экзонов, локализованных в интроне 9, и альтернативного промотора (P2) в интроне 4 позволяет предположить, что традиционная стратегия скрининга должна быть расширена за счет этих областей.

Вариант rs2909430 (g.7675327C>T), находящийся в области CpG островка (Anoushirvani *et al.*, 2018), и вариант rs35850753 (g.7675353C>T) находятся в регионе P2, ответственном за транскрипцию изоформы Δ133p53, лишенной домена трансаактивации и части ДНК-связывающего домена. Предполагается, что эта изоформа может

ингибировать опухолесупрессирующие функции полноразмерного TP53 (Fujita *et al.*, 2009). В настоящее время неизвестно, влияют ли варианты в этом регионе на состояние гена TP53 и на его противоопухолевые функции (Aoubala *et al.*, 2011). Однако, сообщается, что гетерозиготность по rs1042522(GC) и rs2909430(AG) увеличивает риск развития рака в 5 раз. Комбинации ОНП были связаны с высокими уровнями мРНК Δ133TP53 и TP53β, повышенным уровнем инфилтрирующих иммунных клеток и более короткой выживаемостью пациентов при глиобластоме и раке простаты. Авторы показывают, что уровни белка Δ133p53β повышаются за счет ОНП, что приводит к усилению воспаления и способствует более агрессивному раку (Eiholzer *et al.*, 2020).

Значительная часть соматических мутаций располагается в интронах TP53 за пределами донорных или акцепторных сайтов сплайсинга. Такие интронные варианты зачастую не охватываются

традиционными программами секвенирования экзона и, следовательно, не регистрируются в базах данных мутаций. Обнаруженные нами 11 интронных замен были описаны в IARC TP53 Database, однако в литературе встречались исследования, описывающие лишь несколько из них.

Так, rs1642785 (g.7676483G>C) определяется как важный компонент сплайсинга интрона 2, а также системы поддержания стабильности мРНК и следовательно, принимающего участие в дифференциальной экспрессии изоформ-специфичных транскриптов гена TP53. (Pegiaud *et al.*, 2014). Наличие аллеля rs1642785*С связывают с увеличением транскрипта с невырезанным интроном 2, и увеличением нестабильности пре-мРНК p53α.

В когорте больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), подвергшихся воздействию ИИ на Чернобыльской АЭС, по сравнению с необлученным контролем с ХЛЛ обнаружено увеличение частоты гомозигот А/А по полиморфизму rs12947788 (g.7674109G>A), расположенному в интроне 7, однако данных о дозах облучения пациентов авторы не приводят (Bilous *et al.*, 2016).

3'НТО гена TP53 образует еще одну мишень для потенциальных изменений. У пациентов с В-клеточной лимфомой соматические варианты 3'НТО нарушают взаимодействие между мРНК TP53 и микроРНК-125b, что, возможно, приводит к нарушению регуляции сети TP53 (Li *et al.*, 2013).

Варианты rs4968187 (g.7669124C>T) и rs17884306 (g.7668783C>T) могут оказывать влияние на дестабилизацию мРНК и сплайсинг, изменяя структуру 3'НТО TP53 (Mucaki *et al.*, 2016). Стоит отметить, что в нашем исследовании различия в частотах генотипов по полиморфному локусу rs17884306 между группами облученных женщин, имеющих РМЖ и не имеющих, были близки к статистически значимому уровню. Тем не менее результатов, подтверждающих вклад этих ОНП в повышенный риск развития онкологических заболеваний, в литературе на данный момент нет.

Остальные полиморфизмы либо не были ассоциированы с какими бы то ни было канцерогенными эффектами (rs540683791, rs1614984, rs17883323), либо и вовсе не исследовались (rs138066738, rs1039127691, rs543198710, rs199729221).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования соматических мутаций на основе анализа трансверсий G:C>T:A, G:C>C:G и транзиций G:C>A:T гена TP53 в клетках периферической крови у женщин с РМЖ и без ЗНО в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия было выявлено семнадцать различных вариантов, представляющих собой однонуклеотидные замены.

В кодирующей части гена TP53 было обнаружено 2 варианта: rs1042522, расположенный в 4 экзоне, приводящий к замене пролина на аргинин (p.Pro72Arg), был обнаружен у 29 женщин (15 с РМЖ и 14 без РМЖ); rs762846821, находящийся в 5 экзоне, приводящий к замене глицина на аспарагиновую кислоту (p.Gly154Asp), был обнаружен у женщины без РМЖ. В группе у женщин с РМЖ были найдены 2 варианта, которые отсутствовали у женщин без РМЖ: rs35850753 в 4 интроне у 2 человек и rs543198710 в 6 интроне у 1 человека. Различия частот носителей обнаруженных вариантов гена TP53 между группой женщин с РМЖ и без РМЖ не достигали статистически значимого уровня. Важно отметить, что на четыре обнаруженных варианта (встречаемость без РМЖ/с РМЖ): rs138066738 (2/2), rs1039127691 (1/2), rs543198710 (0/1) и rs1385420854 (11/15) — на сегодняшний день не представлена информация о клинической значимости в базе данных NCBI ClinVar. Остальные обнаруженные варианты не имели клинического значения как «патогенный» или «вероятно патогенный». Тем не менее в литературе встречаются исследования, сообщающие о наличии повышенного риска развития ЗНО у лиц, подвергшихся действию ИИ как в результате медицинского облучения, так и в результате аварийных ситуаций, несущих полиморфные аллели rs1042522, rs2909430 и rs12947788. Кроме того, к сегодняшнему дню накопилось достаточно данных, на основании которых можно говорить о потенциально модифицирующих активность гена TP53 эффектах интронных полиморфизмов и ОНП нетранслируемых областей, влияющих на эффективность сплайсинга и транскрипцию изоформ TP53.

В данной работе была исследована оценка мутаций в гене TP53 у женщин с раком молочной железы в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия, однако результаты не показали статистически значимых различий или зависимостей. Это может быть связано с различными факторами, включая недостаточную мощность исследований или неучтенные вмешивающиеся переменные. Таким образом, вопрос о влиянии хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия на частоту мутаций в гене TP53 остается открытым и требует дальнейших исследований с привлечением большего объема данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона» (шифр «Медицинские последствия-21»).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утвержденную в составе протокола исследования Этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 2 от 13 апреля 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дегтева М.О., Нанье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е.А., Бугров Н.Г., Крестинина Л.Д., Аклеев А.В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 3. С. 46–53.
DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475.
- Кулигина Е.И. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т. 11. № 4. С. 203–216.
- Anoushirvani A.A., Aghabozorgi R., Ahmadi A. Arjomandzadegan M., Sahraei M., Khalili S., Fereydouni T., Khademi Z. Association of rs1042522 SNP with Clinicopathologic Factors of Breast Cancer Patients in the Markazi Province of Iran // Open Access Maced J Med Sci. 2018. Vol. 6. № 12. P. 2277–2282.
DOI: 10.3889/oamjms.2018.486.
- Aoubala M., Murray-Zmijewski F., Khoury M.P., Fernandes K., Perrier S., Bernard H., Prats A.C., Lane D.P., Bourdon J.C. p53 directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage // Cell Death Differ. 2011. Vol. 18, №2. P. 248–258.
DOI: 10.1038/cdd.2010.91.
- Apsalikov B., Manambaeva Z., Ospanov E., Massabayeva M., Zhabagin K., Zhagiparova Z., Maximov V., Voropaeva E., Apsalikov K., Belikhina T., Abdrahmanov R., Cherepkova E., Tanatarov S., Massadykov A., Urazalina N. BRCA1 and TP53 Gene-Mutations: Family Predisposition and Radioecological Risk of Developing Breast Cancer // Asian Pac J Cancer Prev. 2016. Vol. 17. № 8. P. 4059–4062. PMID: 27644661.
- Assad S.L., Javadirad S.M., Parsafar S., Tabatabaeian H., Ghaedi K., Azadeh M. TP53 rs1625895 is Related to Breast Cancer Incidence and Early Death in Iranian Population // Indian J Clin Biochem. 2019. Vol. 34. № 4. P. 485–489.
DOI: 10.1007/s12291-018-0774-6.
- Bilous N.I., Abramenko I.V., Chumak A.A., Dyagil I.S., Martina Z.V. The distribution of TP53 gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia patients, sufferers of Chornobyl nuclear power plant accident // Experimental Oncology. 2016. Vol. 38. № 4. P.252–256. PMID: 28230820.
- Bouaoun L., Sonkin D., Ardin M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data // Hum. Mutat. 2016. Vol. 37. №9. P.865–876.
DOI: 10.1002/humu.23035.
- Cargnin S., Barizzzone N., Basagni C., Pisani C., Ferrara E., Masini L., D'Alfonso S., Krengli M., Terrazzino S. Targeted Next-Generation Sequencing for the Identification of Genetic Predictors of Radiation-Induced Late Skin Toxicity in Breast Cancer Patients: A Preliminary Study // J Pers Med. 2021. Vol. 11. № 10. P. 967.
DOI: 10.3390/jpm11100967.
- Dumaz N., Drougard C., Sarasin A., Daya-Grosjean L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients // Proc Natl Acad Sci USA. 1999. Vol. 90. 3 22. P. 10529–10533.
DOI: 10.1073/pnas.90.22.10529.
- Eiholzer R.A., Mehta S., Kazantseva M., Drummond C.J., McKinney C., Young K., Slater D., Morten B.C., Avery-Kiejda K.A., Lasham A., Fleming N., Morrison H.R., Reader K., Royds J.A., Landmann M., Petrich S., Reddel R., Huschtscha L., Taha A., Hung N.A., Slatter T.L. Intronic TP53 Polymorphisms Are Associated with Increased $\Delta 133TP53$ Transcript, Immune Infiltration and Cancer Risk // Cancers. 2020. Vol. 12. № 9. P. 2472.
DOI: 10.3390/cancers12092472.
- Fujita K., Mondal A.M., Horikawa I., Nguyen G.H., Kumamoto K., Sohn J.J., Bowman E.D., Mathe E.A., Schetter A.J., Pine S.R., Ji H., Vojtesek B., Bourdon J.C., Lane D.P., Harris C.C. p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence // Nature Cell Biology. 2009. Vol. 11. № 9. P. 1135–1142.
DOI: 10.1038/ncb1928.
- Jafrin S., Aziz M.A., Anonna S.N., Akter T., Naznin N.E., Reza S., Islam M.S. Association of TP53 Codon 72 Arg>Pro Polymorphism with Breast and Lung Cancer Risk in the South Asian Population: A Meta-Analysis // Asian Pac J Cancer Prev. 2020. Vol. 21. № 6. P. 1511–1519.
DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.6.1511.
- Johnson N., Fletcher O., Palles C., Rudd M., Webb E., Sellick G., dos Santos Silva I., McCormack V., Gibson L., Fraser A., Leonard A., Gilham C., Tavtigian S.V., Ashworth A., Houlston R., Peto J. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility // Human Molecular Genetics. 2007. Vol. 16. № 9. P. 1051–1057.
DOI: 10.1093/hmg/ddm050.

- Hainaut P., Pfeifer G.P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016. Vol. 6. № 11. P. a026179. DOI: 10.1101/cshperspect.a026179.
- Kino K., Hirao-Suzuki M., Morikawa M., Sakaga A., Miyazawa H. Generation, repair and replication of guanine oxidation products // *Genes Environ.* 2017. Vol. 1. № 39. P. 21. DOI: 10.1186/s41021-017-0081-0.
- Kleibl Z., Kristensen V.N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management // *Breast.* 2016. Vol. 28. P. 136–144. DOI: 10.1016/j.breast.2016.05.006.
- Li Y., Gordon M.W., Xu-Monette Z.Y., Visco C., Tzankov A., Zou D., Qiu L., Montes-Moreno S., Dybkaer K., Orazi A., Zu Y., Bhagat G., Richards K.L., Hsi E.D., Choi W.W., van Krieken J.H., Huang Q., Ai W., Ponzoni M., Ferreri A.J., Winter J.N., Go R.S., Piris M.A., Møller M.B., Wu L., Wang M., Ramos K.S., Medeiros L.J., Young K.H. Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program // *Blood.* 2013. Vol. 121. № 22. P. 4529–4540. DOI: 10.1182/blood-2012-12-471722.
- Lichtenstein P., Holm N.V., Verkasalo P.K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A., Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland // *N Engl J Med.* 2000. Vol. 343. № 2. P. 78–85. DOI: 10.1056/NEJM200007133430201.
- Ming X., Matter B., Song M., Veliath E., Shanley R., Jones R., Tretyakova N. Mapping structurally defined guanine oxidation products along DNA duplexes: influence of local sequence context and endogenous cytosine methylation // *J Am Chem Soc.* 2014. Vol. 136. № 11. P. 4223–4235. DOI: 10.1021/ja411636j.
- Moriyama H., Daino K., Ishikawa A., Imaoka T., Nishimura M., Nishimura Y., Takabatake M., Morioka T., Inoue K., Fukushi M., Shimada Y., Kakinuma S. Exome of Radiation-induced Rat Mammary Carcinoma Shows Copy-number Losses and Mutations in Human-relevant Cancer Genes // *Anticancer Res.* 2021. Vol. 41. № 1. P. 55–70. DOI: 10.21873/anticancer.14751.
- Mucaki E.J., Caminsky N.G., Perri A.M., Lu R., Laederach A., Halvorsen M., Knoll J.H., Rogan P.K. A unified analytic framework for prioritization of non-coding variants of uncertain significance in heritable breast and ovarian cancer // *BMC Medical Genomics.* 2016. Vol. 9. P. 19. DOI: 10.1186/s12920-016-0178-5.
- Perriaud L., Marcel V., Sagne C., Favaudon V., Guédin A., De Rache A., Guetta C., Hamon F., Teulade-Fichou M.P., Hainaut P., Mergny J.L., Hall J. Impact of G-quadruplex structures and intronic polymorphisms rs17878362 and rs1642785 on basal and ionizing radiation-induced expression of alternative p53 transcripts // *Carcinogenesis.* 2014. Vol. 35. № 12. P. 2706–2715. DOI: 10.1093/carcin/bgu206.
- Preston D.L., Ron E., Tokuoka S., Funamoto S., Nishi N., Soda M., Mabuchi K., Kodama K. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958–1998 // *Radiat Res.* 2007. Vol. 168. № 1. P. 1–64. DOI: 10.1667/RR0763.1.
- Preston D.L., Kitahara C.M., Freedman D.M., Sigurdson A.J., Simon S.L., Little M.P., Cahoon E.K., Rajaraman P., Miller J.S., Alexander B.H., Doo- dy M.M., Linet M.S. Breast cancer risk and protracted low-to-moderate dose occupational radiation exposure in the US Radiologic Technologists Cohort, 1983–2008 // *Br J Cancer.* 2016. Vol. 115. № 9. P. 1105–1112. DOI: 10.1038/bjc.2016.292.
- Ripperger T., Gadzicki D., Meindl A., Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling // *Eur J Hum Genet.* 2009. Vol. 17. № 6. P. 722–731. DOI: 10.1038/ejhg.2008.212.
- Rodin S.N., Rodin A.S. On the excess of G → T transversions in the p53 gene in lung cancer cell lines. Reply to Pfeifer and Hainaut // *Mutat Res.* 2004. Vol. 545. № 1–2. P. 141–144. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.09.008.
- Steenken S., Jovanovic S.V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution // *J Am Chem Soc.* 1997. Vol. 119. P. 617–618. DOI: 10.1021/ja962255b.
- Szpechcinski A., Szolkowska M., Winiarski S., Lechowicz U., Wisniewski P., Knetki-Wroblewska M. Targeted Next-Generation Sequencing of Thymic Epithelial Tumours Revealed Pathogenic Variants in KIT, ERBB2, KRAS, and TP53 in 30% of Thymic Carcinomas // *Cancers.* 2022. Vol. 14. № 14. P. 3388. DOI: 10.3390/cancers14143388.
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR2006 Report to the General Assembly, with scientific annexes United Nations: New York.

**Analysis of G:C>T:A, G:C>A:T and G:C>C:G mutations
in the TP53 gene in women with and without breast cancer
in the long term period after chronic radiation exposure**

V. S. Nikiforov^{1, 2, #}, A. V. Korechenkova¹, A. V. Akleyev^{1, 2}

¹*Urals Research Center for Radiation Medicine, URCRM, 68-A Vorovsky Street, Chelyabinsk, 454141 Russia*

²*Chelyabinsk State University, 129, Bratev Kashirinykh Street, Chelyabinsk, 454001 Russia*

[#]*E-mail: nikiforovx@mail.ru*

This paper presents the results of the analysis of mutations such as G:C>T:A, G:C>A:T and G:C>C:G in the TP53 gene in peripheral blood cells in women affected by chronic radiation exposure with breast cancer (24 persons) and without breast cancer (17 persons). 17 different variants representing single nucleotide substitutions were registered. The differences in the frequencies of carriers of the detected variants between the comparison and the main group were not statistically significant. All detected variants were present in the IARC TP53 database and had no clinical significance as “pathogenic.” Despite the absence of statistically significant differences, the question of the effect of chronic low dose rate exposure on the frequency of mutations in the TP53 gene remains open and requires further research involving a greater amount of data.

Keywords: TP53, Sanger sequencing, the Techa River, chronic radiation exposure low and medium doses, transversion