

## ИЗУЧЕНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС. К 35-ЛЕТИЮ КАТАСТРОФЫ

УДК [57+61]::577.2:575.224.23:612.112:539.1.047

### АССОЦИАТИВНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕМ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ЛИЦ, ОБЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ АВАРИИ НА ЧАЭС

© 2021 г. Н. С. Кузьмина<sup>1,\*</sup>, Н. Ш. Лаптева<sup>1</sup>, А. В. Рубанович<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

\*E-mail: nin-kuzmin@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.12.2020 г.

После доработки 08.02.2021 г.

Принята к публикации 24.02.2021 г.

Проведена оценка гиперметиляции промоторов генов клеточного цикла (*RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*) и детоксикации (*GSTP1*) в лейкоцитах крови индивидов, облученных в результате аварии на ЧАЭС (98 чел.: ликвидаторы аварии – 76 чел., взрослые жители территорий с радионуклидными загрязнениями, 135–688 кБк/м<sup>2</sup> – 22 чел.) в зависимости от их цитогенетического статуса. Результаты множественного регрессионного анализа (“Частота aberrаций ~ возраст + + количество гиперметилованных генов”) свидетельствуют о сопряженности суммарного уровня aberrаций хромосомного типа с рассмотренными эпигенетическими показателями ( $\beta = 0.256$ ;  $p = 0.011$ ), но не с возрастом ( $\beta = -0.138$ ;  $p = 0.165$ ). Частота этих цитогенетических нарушений возрастает с увеличением количества метилированных локусов. Таким образом, выявлена положительная ассоциативная связь между поврежденностью генома, индуцированной перенесенным десятилетия назад радиационным воздействием в диапазоне малых и средних доз, и гиперметилованием промоторов генов основных защитных систем клеток.

**Ключевые слова:** гиперметилование, промотор гена, CpG-островок, лейкоциты крови, организм человека, aberrации хромосом, радиационное воздействие

DOI: 10.31857/S0869803121030097

Одной из первостепенных задач изучения отдаленных эффектов радиации является поиск маркеров перенесенного облучения, которые могут дать интегральную оценку состояния здоровья индивида и быть предикторами развития тех или иных патологий, в том числе возраст-ассоциированных. Анализ хромосомных aberrаций – надежный подход к биоиндикации перенесенного мутагенного воздействия факторов радиационной и химической природы, который применяется уже на протяжении нескольких десятилетий. Такие сложные обменные хромосомные перестройки, как дицентрики и кольца, являются объективными маркерами облучения и могут сохраняться в организме на протяжении десятков лет. В то же время отсутствуют явные доказательства связи выявляемых в лимфоцитах цитогенетических нарушений у экспонированных лиц с индукцией тех или иных патологий [1, 2].

Как уже обсуждалось в наших предыдущих публикациях, оценка эпигенетических изменений, в частности модификаций в метилировании ДНК, может стать перспективным подходом в разработке высокоточной системы отдаленных

маркеров перенесенного человеком облучения, имеющих очевидную прогностическую ценность в отношении здоровья индивида [3]. В связи со сказанным выше, авторами настоящей работы было предпринято пилотное исследование, в результате проведения которого на двух независимых выборках облученных лиц (смешанная выборка № 1: ликвидаторы аварии на ЧАЭС, профессионалы-атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями и выборка № 2: работники ПО “Маяк”) выявлены однонаправленные эффекты и показана реальность гиперметилования CpG-островков промоторов некоторых генов (в частности, *p16/INK4* и *GSTP1*), наблюдаемого в нормальных лейкоцитах крови в отдаленный период после радиационного воздействия [3]. Очевидно, что следующим этапом работы является оценка сопряженности между поврежденностью генома, индуцированной перенесенным десятилетия назад радиационным воздействием, и изученными эпигенетическими показателями, т.е. гиперметилованием промоторов генов основных защитных систем клеток.

В связи с вышесказанным, цель настоящей работы заключалась в оценке ассоциативной связи между гиперметилированием промоторов ряда генов (гены клеточного цикла *RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF* и детоксикации ксенобиотиков *GSTP1*) и цитогенетическими показателями у облученных лиц в отдаленный период после перенесенного воздействия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Выборка обследованных лиц, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС (ликвидаторы аварии на ЧАЭС – 76 чел. и взрослые жители территорий с радионуклидными загрязнениями, 135–688 кБк/м<sup>2</sup> – 22 чел.), была гетерогенной, так как включала индивидов, отличающихся друг от друга по виду воздействующей радиации, дозам облучения, длительности радиационного воздействия и времени, прошедшем после него до момента обследования. Все эти лица были объединены в одну группу и рассмотрены нами в аспекте наличия у них в анамнезе перенесенного облучения. Характеристика обследованных групп облученных лиц ранее детально была изложена [4, 5].

Вкратце, большая часть ликвидаторов (60 чел.) проходили обследование и лечение в 2003–2007 гг. в отделении радиационной медицины ФГБУ “Российский научный центр рентгенорадиологии” Минздрава России. Остальные 16 человек поступили в Федеральный детский центр противорадиационной защиты ОСП “Научно-исследовательский клинический институт педиатрии” ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова с целью обследования своих детей. Зарегистрированные дозы облучения (если такие сведения имелись) находились в диапазоне от 35 до 480 мЗв (данные физической дозиметрии). Злокачественные новообразования у всех обследованных пациентов отсутствовали. Продолжительность работы в 1986–1987 гг. в 30-километровой зоне радиационной катастрофы варьировала от 2 до 6 мес. Промежуток времени между окончанием работы с радиацией и взятием образцов крови составлял от 17 лет до 21 года. Обследованные жители территорий с радионуклидными загрязнениями в момент аварии на ЧАЭС (максимальная дозовая нагрузка) были облучены в возрасте 8–17 лет и на протяжении многих лет проживали на территориях с радионуклидными загрязнениями. Возраст облученных индивидов на время взятия образцов крови составлял 24–78 лет.

Культивирование лимфоцитов периферической крови, приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ хромосомных aberrаций проводили по общепринятой методике согласно рекомендациям ВОЗ и МАГАТЭ с некоторыми модификациями, подробно описанными ранее [6–9]. Учет наблюдавшихся структурных пере-

строек хромосом в метафазах первого митоза проводили согласно общепринятой классификации хромосомных aberrаций. Учитывали все видимые в микроскоп типы aberrаций хромосом. К простым aberrациям хромосомного типа относили ацентрические парные фрагменты, центромерные разрывы, делеции, не сопровождающиеся ацентрическими фрагментами, а к сложным обменным перестройкам – дицентрики, центрические и ацентрические кольца, атипичные моноцентрики (симметричные транслокации, инверсии). Учет всех делеций, реципроктных транслокаций, инверсий проводили с применением частичного кариотипического анализа с идентификацией гомологичных хромосом и/или групп хромосом, к которым они относятся. К aberrациям хроматидного типа относили одиночные фрагменты, изохроматидные фрагменты, а также межхромосомные хроматидные обмены. Для каждого индивида анализировали по 300–500 метафаз в 48-часовых культурах лимфоцитов.

Анализ метилирования отдельных CpG-динуклеотидов CpG-островков промоторов генов клеточного цикла (*RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*) был выполнен с использованием метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР), детально описанной в наших предыдущих работах [3–5]. Вкратце, геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью наборов Magnet™ DNA MegaPrep1 (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия). Реакцию метилчувствительной ферментативной рестрикции проводили с использованием эндонуклеазы AclI (“Fermentas”, Литва), которая гидролизует только неметилированные участки узнавания (5'...C↓C GC...3'). Последовательности использованных праймеров и условия МЧ-ПЦР для изученных генов *RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*, *GSTP1* представлены в публикациях [3, 4]. Присутствие на электрофореграмме хорошо визуализированной четкой полосы, но характеризующейся “слабым” сигналом в результате амплификации гидролизованной ДНК указывало на малое количество метилированных аллелей (промоторов) в образце ДНК (чувствительность МЧ-ПЦР составляет 0.1–1% метилированных копий в образце ДНК). Результаты каждого анализа были воспроизведены в трех независимых экспериментах по постановке рестрикции с последующей амплификацией образцов ДНК. Детальное описание условий ПЦР и электрофореза было представлено в ранее опубликованных работах [3, 4].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы SPSS 20.0.0. общепринятыми статистическими методами. Корреляционный и регрессионный (множественная регрессия) анализы были использованы с целью выяснения зависимости между исследо-

**Таблица 1.** Корреляции\* по Пирсону между метилированием промоторов исследованных локусов и цитогенетическими показателями у облученных лиц  
**Table 1.** Pearson correlations\* between methylation of the studied loci promoters and cytogenetic indicators in irradiated individuals

Ген	Цитогенетические показатели			
	суммарная частота аберраций хромосом	суммарная частота аберраций хромосомного типа	суммарная частота аберраций хроматидного типа	частота дицентриков + колец
<i>RASSF1A</i>	−0.066 (0.512)	0.034 (0.736)	−0.102 (0.311)	0.041 (0.686)
<i>p16/INK4A</i>	0.185 (0.063)	0.125 (0.213)	0.136 (0.177)	0.016 (0.875)
<i>p14/ARF</i>	0.091 (0.367)	0.144 (0.152)	0.014 (0.887)	0.113 (0.261)
<i>GSTP1</i>	0.225 (0.024)	0.119 (0.237)	0.208 (0.037)	0.051 (0.610)
Суммарное количество метилированных генов	0.232 (0.019)	0.208 (0.037)	0.148 (0.139)	0.102 (0.312)

\*Под коэффициентом корреляции (в скобках) указаны двусторонние уровни значимости.

ванными эпигенетическими и цитогенетическими показателями. Для оценки значимости различий по частоте цитогенетических нарушений групп облученных лиц, имеющих разный эпигенетический статус, был использован непараметрический ANOVA тест (критерий Краскела–Уоллиса).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В наших предыдущих публикациях были детально изложены результаты изучения спектра и частоты аберраций хромосом, а также метилирования CpG-островков промоторов вышеперечисленных генов у облученных лиц обследованных групп. Показано, что спустя многие годы после аварии на ЧАЭС средний уровень аберраций хромосомного типа, как простых, так и сложных обменных (в том числе нестабильных – дицентриков и колец), у этих индивидов существенно превышает таковой в контроле [8–10]. Кроме того, частота лиц, характеризующихся гиперметилированием изученных генов, в экспонированной группе значимо выше, чем в группе необлученных индивидов [3–5]. В настоящей работе мы приводим результаты анализа сопряженности между изученными показателями.

В табл. 1 и 2 приведены параметрические и непараметрические корреляции между суммарным числом метилированных локусов и цитогенетическими показателями у облученных лиц.

Как видно, метилирование генов *p16/INK4A*, *GSTP1* сопряжено с теми или иными цитогенетическими показателями. Так, наблюдались невы-

сокие, но значимые корреляции (по Пирсону) метилирования промотора гена *GSTP1* с суммарной частотой всех аберраций хромосом (и частотой аберраций хромосомного типа), а также ассоциативная связь (тенденция:  $p = 0.063$ ) рассматриваемой эпигенетической модификации локуса *p16/INK4A* с общим уровнем аберраций хромосом. Выявлены также значимые коррелятивные связи суммарного количества метилированных генов с суммарной частотой всех аберраций хромосом (и частотой аберраций хромосомного типа).

Невысокие, но значимые непараметрические корреляции (по Спирмену) наблюдались между метилированием *p16/INK4A* локуса и общей частотой аберраций хромосомного типа, а также выявлена тенденция к сопряженности ( $p = 0.091$ ) метилирования гена *GSTP1* с суммарной частотой всех аберраций хромосом. Наличие значимых коррелятивных связей суммарного количества метилированных генов с общим уровнем всех аберраций хромосом (и частотой аберраций хромосомного типа) подтверждается и результатами непараметрического корреляционного анализа. Следует отметить, что единственная корреляция (невысокая, но значимая), проходящая через коррекцию на множественность сравнений, наблюдалась между общей частотой аберраций хромосомного типа и суммарным числом метилированных локусов (по Спирмену  $r = 0.26$ ;  $p = 0.009$ ). Эта сопряженность в основном обусловлена генами *p16/INK4A* и *GSTP1*.

Результаты множественного регрессионного анализа (“Частота аберраций ~ возраст + количество гиперметилированных генов”) свидетель-

**Таблица 2.** Непараметрические корреляции\* по Спирмену между метилированием промоторов исследованных локусов и цитогенетическими показателями у облученных лиц  
**Table 2.** Spearman nonparametric correlations\* between the methylation of the the studied loci promoters and cytogenetic parameters in irradiated individuals

Ген	Цитогенетические показатели			
	суммарная частота аберраций хромосом	суммарная частота аберраций хромосомного типа	суммарная частота аберраций хроматидного типа	частота дицентриков + колец
<i>RASSF1A</i>	-0.067 (0.506)	0.098 (0.329)	-0.089 (0.376)	0.127 (0.207)
<i>p16/INK4A</i>	0.121 (0.230)	0.217 (0.029)	0.017 (0.867)	0.033 (0.743)
<i>p14/ARF</i>	0.150 (0.135)	0.110 (0.275)	0.037 (0.715)	0.132 (0.190)
<i>GSTP1</i>	0.169 (0.091)	0.113 (0.261)	0.140 (0.163)	0.073 (0.467)
Суммарное количество метилированных генов	0.206 (0.039)	0.259 (0.009)	0.090 (0.371)	0.144 (0.151)

\*Под коэффициентом корреляции (в скобках) указаны двусторонние уровни значимости.

ствуют о сопряженности суммарного уровня аберраций хромосомного типа с рассмотренными эпигенетическими показателями ( $\beta = 0.256$ ;  $p = 0.011$ ), но не с возрастом ( $\beta = -0.138$ ;  $p = 0.165$ ) (табл. 3). Непараметрический ANOVA тест (критерий Краскела–Уоллиса) также показал существенные различия между группами лиц, имеющих разное число метилированных генов, по суммарной частоте аберраций хромосомного типа ( $p = 0.008$ ). Таким образом, частота аберраций хромосомного типа возрастает с увеличением количества метилированных локусов (рис. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе выявлена положительная ассоциативная связь между частотой аберраций

**Таблица 3.** Множественный регрессионный анализ зависимости частоты аберраций хромосомного типа от возраста и количества метилированных локусов у облученных индивидов

**Table 3.** Multiple regression analysis of dependence of chromosomal aberrations frequency on the age and number of methylated loci in irradiated individuals

Модель	B*	SE (B)	$\beta^{**}$	<i>t</i>	<i>p</i>
Константа	0.022	0.004			
Возраст	-1.1E-4	7.7E-5	-0.138	-1.400	0.165
Суммарное метилирование	0.004	0.002	0.256	2.593	0.011

\*Коэффициент линейной регрессии.

\*\*Стандартизованный коэффициент линейной регрессии.

хромосомного типа и гиперметилированием промоторов генов основных защитных систем клеток в лейкоцитах крови облученных лиц. Причем эта сопряженность в основном обусловлена генами, проявившими зависимость эпигенетического статуса от перенесенного организмом радиационного воздействия (*p16/INK4A*, *GSTP1*) [3–5].

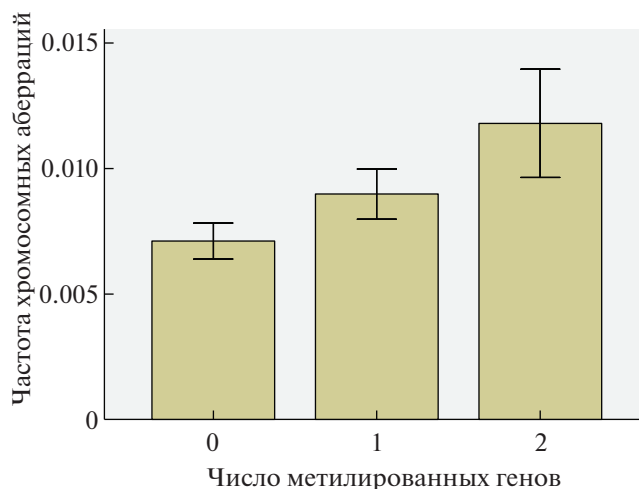
Представленные в этой работе результаты подтверждаются данными ROC-анализа, свидетельствующими о том, что информативность рассмотрения выявленных эпигенетических нарушений в качестве биомаркеров радиационного воздействия сопоставима с таковой, рассчитанной при анализе частот дицентриков+колец – аберраций хромосом, всегда считавшихся в радиационной генетике объективными биоиндикаторами перенесенного облучения ( $AUC = 0.699 \pm 0.038$ ,  $p = 1.4 \times 10^{-6}$ , 95%-ный ДИ 0.625–0.773; данные, полученные в лаборатории ранее на выборке ликвидаторов аварии на ЧАЭС) [3]. К тому же нами ранее выявлена зависимость доза–эффект для гиперметилирования совокупности генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения или сочетанному действию внешнего  $\gamma$ -внутреннего  $\alpha$ -излучений в результате профессиональной деятельности, что соответствует классическим представлениям радиационной генетики (наличие зависимости доза–эффект для выхода генных мутаций/хромосомных аберраций) [11, 12].

Результаты единичных работ других авторов также указывают на наличие коррелятивных связей между изученными эпигенетическими и цитогенетическими показателями у лиц, подверг-

шихся радиационному воздействию в результате профессиональной деятельности. Так, выявлена обратная корреляционная связь между общим уровнем метилированных цитозинов и частотой aberrаций хромосомного типа у работников атомной индустрии, подвергшихся комбинированному воздействию излучений с высокой и низкой ЛПЭ [13]. Отмечена также обратная сопряженность между уровнем метилирования *LINE-1* и частотой анеуплоидий по одной и четырем хромосомам у специалистов по радиологии, подвергшихся воздействию редкоизирующей радиации на производстве (X-лучи,  $\gamma$ -лучи), что, по мнению авторов, свидетельствует о сопряженности снижения метилирования диспергированных повторов с отсроченной индукцией нестабильности генома [14].

В целом зарегистрированные нами изменения генома/эпигенома наблюдались в лейкоцитах периферической крови, продолжительность жизни которых составляет от нескольких дней (гранулоциты) до десятилетий (лимфоциты памяти). Возмозные причины выявленных нами как цитогенетических нарушений, включая нестабильные aberrации хромосомного типа, так и эпигенетических модификаций в лейкоцитах крови через годы и десятилетия после облучения уже неоднократно подробно приводились в наших предыдущих публикациях [1, 3–5]. Изложенные объяснения этим двум явлениям имеют много общего, а именно могут быть связаны либо с непосредственным действием радиации на клетки крови и их предшественники – гемопоэтические стволовые клетки или возникать вследствие немишенного и отсроченного эффектов облучения, которое имело место многие годы тому назад.

Следует подчеркнуть, что нами выявлена сопряженность гиперметилирования генов именно с суммарной частотой aberrаций хромосомного типа (простые + обменные), а не с уровнем таких сложных обменных хромосомных перестроек, как дицентрики и кольца. Это указывает на многообразие механизмов индукции и причин сохранения выявляемых нарушений генома/эпигенома. Во-первых, скорее всего имеет место передача паттерна метилирования (измененного в результате непосредственного облучения)/радиационно-индуцированных aberrаций хромосом от стволовых гемопоэтических клеток их митотическим потомкам. Следует также учитывать, что обследованные индивиды подвергались не только внешнему, но и внутреннему воздействию радиации за счет инкорпорированных в организме радионуклидов, излучение которых спустя много лет после радиационной катастрофы может приводить к индукции повреждений генома/эпигенома не только стволовых клеток, но и лейкоцитов (лимфоцитов), циркулирующих в периферической крови в стадии  $G_0$  [1, 3–5]. К тому же



**Рис. 1.** Частоты хромосомных aberrаций (на 1 клетку) у облученных лиц с различным количеством метилированных промоторов. Приведенные разбросы соответствуют стандартным ошибкам (SE).

**Fig. 1.** The frequency of chromosomal aberrations (per 1 cell) in irradiated individuals with different number of methylated promoters. These variations correspond to standard errors (SE).

возможное наличие в облученном организме “байстэндер” факторов в сыворотке крови, в первую очередь ассоциированных с механизмами хронического оксидативного стресса, и индуцированная отсроченная нестабильность генома, вероятно, объясняют существенный вклад простых aberrаций хромосомного типа в рассматриваемую ассоциативную связь. Нельзя исключать и саму нестабильность генома как причину нарушения скоординированности процессов метилирования, в том числе индукции гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов [3–5].

Хотя остается неясным механизм индукции рассматриваемых эпигенетических нарушений под действием радиации, имеются предположения о его сопряженности со сверхрегуляцией ДНК метилтрансфераз активными формами кислорода, а также рекрутированием этих ферментов к специфическим сайтам репарации ДНК в результате индукции облучением разрывов ДНК [13–16]. На наш взгляд, это в достаточной мере согласуется с вышеприведенными объяснениями наблюдаемой ассоциативной связи поврежденности генома и гиперметилирования CpG-островков промоторов генов у облученных лиц.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлена положительная ассоциативная связь между поврежденностью генома, индуцированной перенесенным десятилетия назад радиационным воздействием в диапазоне малых и средних доз, и гиперметилированием

промоторов генов основных защитных систем клеток. Полученные результаты дают надежду на то, что спектр методических подходов для оценки отдаленных последствий облучения будет существенно пополнен за счет расширения количества тестируемых локусов, необходимого для создания высокоточной прогностической системы биоиндикации радиационного воздействия, имеющей достаточную информативность в оценке риска преждевременного старения и развития сопряженных с ним патологий.

Оценка метилирования у половины обследованных ликвидаторов аварии на ЧАЭС (все русской национальности), обобщение полученных результатов и анализ эпигенетических показателей в зависимости от цитогенетического статуса выполнены в рамках мероприятия научно-технической Программы Союзного государства “Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства” (“ДНК-идентификация”), государственный контракт № 011-17 от 26.09.2017 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Балева Л.С., Сипягина А.Е.* Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 2. С. 167–177. [*Suskov I.I., Kuz'mina N.S., Baleva L.S., Sipyagina A.E.* Problema inducirovannoj genomnoj nestabil'nosti kak osnovu povyshennoj zaboлеваemosti u detej, podvergayushchihsyu nizkointensivnomu vozdeystviyu radiacii v malyh dozah // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2006. T. 46. № 2. S. 167–177. (in Russia)]
2. *Нугис В.Ю., Козлова М.Г.* Проблема связи частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови с риском развития заболеваний, в том числе после действия радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 1. С. 18–29. [*Nugis V.Yu., Kozlova M.G.* Problema svyazi chastoty aberracij hromosom v limfocitah perifericheskoj krovi s riskom razvitiya zabolevanij, v tom chisle после действия радиации // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2017. T. 57. № 1. S. 18–29 (in Russia)] <https://doi.org/10.7868/S0869803116060072>
3. *Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др.* Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 4. С. 341–356. [*Kuz'mina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. i dr.* Gipermetilirovanie promotorov genov v lejkocitah krovi cheloveka v otdalennyj period после перенесенного радиационного воздействия // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2017. T. 57. № 4. S. 341–356 (in Russia)] <https://doi.org/10.7868/S0869803117040014>
4. *Кузьмина Н.С., Мязин А.Е., Лантева Н.Ш., Рубанович А.В.* Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 2. С. 1–13. [*Kuz'mina N.S., Myazin A.E., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.V.* Izuchenie aberrantnogo metilirovaniya v lejkocitah krovi likvidatorov avarii na ChAES // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2014. T. 54. № 2. S. 1–13 (in Russia)] <https://doi.org/10.7868/S0869803114020064>
5. *Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.V.* Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure // Environ. Res. 2016. V. 146. P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
6. WHO. Methods for the analysis of human chromosome aberrations / Eds K.E. Buckton, H.J. Evan. Geneva: WHO, 1973.
7. Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical reports series № 260. Vienna: Int. Atomic Energy, 1986. 69 p.
8. *Сальникова Л.Е., Фомин Д.К., Елисова Т.В. и др.* Изучение связи цитогенетических и эпидемиологических показателей с генотипами у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 3. С. 303–312. [*Sal'nikova L.E., Fomin D.K., Elisova T.V. i dr.* Izuchenie svyazi citogeneticheskikh i epidemiologicheskikh pokazatelej s genotipami u likvidatorov posledstvij avarii na ChAES // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2008. T. 48. № 3. S. 303–312. (in Russia)]
9. *Сусков И.И., Агаджанян А.В., Кузьмина Н.С. и др.* Проблема трансгенерационного феномена геномной нестабильности у больших детей разных возрастных групп после аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 4. С. 466–474. [*Suskov I.I., Agadzhanyan A.V., Kuz'mina N.S. i dr.* Problema transgeneracionnogo fenomena genomnoj nestabil'nosti u bol'nyh detej raznyh vozrastnyh grupp после аварии на ЧАЭС // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2006. T. 46. № 4. S. 466–474. (in Russia)]
10. *Aghajanyan A., Kuzmina N., Sipyagina A. et al.* Analysis of the genomic instability in offspring of fathers exposed to low doses of ionizing radiation // Environ. Mol. Mutagen. 2011. V. 52. Issue 7. P. 538–546. <https://doi.org/10.1002/em.20655>
11. *Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др.* Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся сочетанному воздействию гамма- и альфа-излучений // Генетика. 2018. Т. 54. Приложение. С. S22–S26. [*Kuz'mina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. i dr.* Dozovaya zavisimost' gipermetilirovaniya promotorov genov v lejkocitah krovi lic, podverghihshy sochetannomu vozdeystviyu gamma- i al'fa-izlucheniij // Genetika. 2018. T. 54. Prilozhenie. S. S22–S26. (in Russia)] <https://doi.org/10.1134/S0016675818130118>
12. *Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al.* Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans occupationally exposed to external gamma radiation // Biol. Bull. 2019. V. 46.

- № 11. P. 1563–1569.  
<https://doi.org/10.1134/S1062359019110062>
13. Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. V. 91. № 2. P. 142–149. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
14. Cho Y.H., Jang Y., Woo H.D. et al. LINE-1 Hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers // *Environ. Mol. Mutagen.* 2018. V. 60. № 2. P. 174–184. <https://doi.org/10.1002/em.22237>
15. Ding N., Bonham E.M., Hannon B.E. et al. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage // *J. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 8. № 3. P. 244–254. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv050>
16. O'Hagan H.M., Mohammad H.P., Baylin S.B. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 8. e1000155. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000155>
17. Cuozzo C., Porcellini A., Angrisano T. et al. DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 7. e110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030110>
18. Morano A., Angrisano T., Russo G. et al. Targeted DNA methylation by homology-directed repair in mammalian cells. Transcription reshapes methylation on the repaired gene // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 2. P. 804–821. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt920>

## Association Between Hypermethylation of Gene Promoters and Cytogenetic Disturbances in Humans Exposed to Radiation as a Result of the Chernobyl Accident

N. S. Kuzmina<sup>a, #</sup>, N. Sh. Lapteva<sup>a</sup>, and A. V. Rubanovich<sup>a</sup>

<sup>a</sup> N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>#</sup> E-mail: nin-kuzmin@yandex.ru

The estimation of association between hypermethylation of gene promoters (*RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF* cell cycle genes and *GSTP1* involved in xenobiotic detoxification) in blood leukocytes and cytogenetic disturbances in humans exposed to radiation as a result of the Chernobyl accident (98 subjects: the accident liquidators liquidators – 76 subjects, adult residents of the territories with radionuclide contamination, 135–688 kBq/m<sup>2</sup> – 22 subjects) was carried out. The results of multiple regression analysis (“frequency of aberrations ~ age + number of hypermethylated genes”) demonstrate the correlation of the total level of chromosomal type aberrations with the considered epigenetic disturbances ( $\beta = 0.256$ ;  $p = 0.011$ ), but not with age ( $\beta = -0.138$ ;  $p = 0.165$ ). The frequency of these cytogenetic disorders increases with the number of methylated loci. Thus, a positive association between the damages of genome induced by radiation exposure (the range of small and medium doses) long time ago, and hypermethylation of CpG-islands in promoters of genes involved in the basic protective functions of cells was revealed.

**Keywords:** hypermethylation, gene promoter, CpG island, blood leukocytes, human body, chromosome aberrations, radiation exposure