

Polimorfizmy w genach naprawy DNA – ocena częstości występowania i wpływ na poziom uszkodzeń oksydacyjnych w DNA indukowanych przez ołów

Polymorphisms in DNA repair genes – assessment of frequencies and effect on the level of DNA oxidative damage caused by lead

Elżbieta Olewińska^{1 (a, b, c, d)}, Agnieszka Kozłowska^{1 (c)}, Natalia Pawlas^{1 (c, e)},
Aleksander L. Sieroń^{2 (f)}

¹ Pracownia Toksykologii Genetycznej, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Dyrektor: dr n. med. P. Z. Brewczyński

² Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Lekarski w Katowicach, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki. Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. A. L. Sieroń

^(a) koncepcja

^(b) opracowanie tekstu

^(c) badania laboratoryjne

^(d) statystyka

^(e) zebranie materiału do badań

^(f) nadzór merytoryczny nad pracą

STRESZCZENIE

Wstęp. Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmów w genach naprawy DNA: *APE1*, *hOGG1*, *XRCC1*, *XPA* na poziom uszkodzeń oksydacyjnych w DNA oraz ocena częstości ich występowania w populacji dorosłych osób rasy kaukaskiej pochodzących z południowej Polski. **Materiał i metody.** Przebadano grupę 115 mężczyzn narażonych zawodowo na ołów oraz 58 mężczyzn bez narażenia na ołów w wywiadzie, którzy stanowili grupę kontrolną. U wszystkich osób oznaczono poziom ołowiu we krwi, cynkoprotoporfiryny, oraz stężenie 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny w moczu. Identyfikację polimorfizmów typu SNP w genach kodujących enzymy biorące udział w naprawie DNA (*APEX1*, *hOGG1*, *XPA*, *XRCC1*) przeprowadzono z wykorzystaniem metody real-time PCR z sondami TaqMan. Analizie poddano polimorfizmy w genach *APEX1* (rs1130409, Asp148Glu), *hOGG1* (rs1052133, Ser326Cys), *XPA* (rs1800975, -4A/G) oraz *XRCC1* (rs25487, Gln399Arg). **Wyniki.** Średni poziom ołowiu we krwi w grupie badanej wynosił 33,48 µg/dl i był istotnie statystycznie wyższy niż w grupie kontrolnej, gdzie wynosił 5,35 µg/dl (p=0,000). Częstość występowania poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów była porównywalna w obu grupach, z wyjątkiem polimorfizmu -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* (p<0,0001). **Wnioski.** Zaobserwowano różnice pomiędzy poszczególnymi genotypami w polimorfizmie -4A/G

(rs1800975) w odniesieniu do poziomu ołowiu we krwi (p=0,006) oraz w polimorfizmie Ser326Cys (rs1052133) w odniesieniu do poziomu 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny w moczu (p=0,01).

Słowa kluczowe: ołów, uszkodzenia DNA, naprawa DNA, polimorfizmy genetyczne, 8-OH-dG

ABSTRACT

Introduction. The aim of this study was to evaluate the effect of polymorphisms in DNA repair genes: *APE1*, *hOGG1*, *XRCC1*, *XPA* on the level of oxidative damage to DNA as well as an assessment of the frequencies of genetic polymorphisms in the adult population of Caucasians from southern Poland. **Material and methods.** We examined a group of 115 men occupationally exposed to lead and 58 men with no history of occupational exposure to lead. The concentrations of lead in blood, zinc protoporphyrin in blood and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in urine were measured. The identification of SNP polymorphisms in genes encoding enzymes involved in DNA repair (*APEX1*, *hOGG1*, *XPA*, *XRCC1*) was performed using real-time PCR with TaqMan probes. We analyzed polymorphisms: *APEX1* (rs1130409, Asp148Glu), *hOGG1* (rs1052133, Ser326Cys), *XPA* (rs1800975, -4A/G) and

XRCC1 (rs25487, Gln399Arg). **Results.** The mean blood lead level in the exposed group was 33,48 µg/dl and was significantly higher compared to 5.35 µg/dl ($p=0.000$). in the control group. The frequencies of studied polymorphisms were comparable in both groups, with the exception of -4A/G (rs1800975) in the gene *XPA* ($p<0.0001$). **Conclusions.** Differences were observed between geno-

types in -4A/G (rs1800975) polymorphism in relations to the level of lead in blood ($p=0.006$) and Ser326Cys (rs1052133) polymorphism in relations to 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in urine ($p=0.01$).

Key words: lead, DNA damage, DNA repair, genetic polymorphisms, 8-OH-dG

WSTĘP

Informacja genetyczna zawarta w komórce w postaci DNA narażona jest na ciągle uszkodzenia, ze względu na wszechobecność czynników mutagennych w środowisku życia i pracy człowieka. Zachowanie integralności materiału genetycznego jest istotne, gdyż powstałe modyfikacje mogą być źródłem mutacji, które w konsekwencji mogą prowadzić do licznych chorób.

Jednym z czynników zaburzających integralność genomu i prawdopodobnie kancerogennych dla człowieka (grupa 2A wg IARC) jest ołów i jego związki nieorganiczne, występujące zarówno w środowisku, jak również na stanowisku pracy [1]. Ołów posiada zdolność do wiązania się z grupami hydroksylowymi białek, co wpływa na funkcjonowanie wielu enzymów, takich jak dehydrataza kwasu delta-aminolewulinowego (ALAD) czy ferrochelataza, które biorą udział w szlaku biosyntezy hemu. Ołów hamuje aktywność ALAD, czego efektem jest akumulacja kwasu delta-aminolewulinowego (ALA) w krwi oraz w moczu. W związku z tym poziom ALA w moczu, może być wykorzystywany, jako biomarker ekspozycji bądź marker wczesnych skutków biologicznych. Funkcja ferrochelatazy polega na wbudowaniu żelaza do cząsteczki protoporfiryny podczas syntezy hemu. Brak aktywności tego enzymu prowadzi do włączania do protoporfiryny cynku i tworzenia się cynkoprotoporfiryny (ZPP), która wykorzystywana jest jako marker ekspozycji na ołów [2–4].

Pod wpływem ołowiu w komórkach generowane są również m.in. reaktywne formy tlenu, które prowadzą do uszkodzeń materiału genetycznego, w postaci: pęknięć jednej lub obu nici DNA, powstawania wiązań krzyżowych DNA-DNA lub DNA-białko czy transwersji zasad azotowych (głównie GC do TA) [5]. Za te ostatnie odpowiada przede wszystkim najczęstszy i zarazem wysoce mutageny produkt oksydacji zasad azotowych w DNA, czyli 8-oksoguanina (8-oxoGua) [5, 6]. Obecnie w badaniach najczęściej oznacza się 8-oksoguaninę w formie deoksynukleozydu, czyli 8-hydrokso-2-deoksy-

guanozynę (8-OH-dG). Produkty naprawy 8-OxoGua w DNA są wydalane z moczem w postaci niezmienionej, bez dalszego metabolizmu, dlatego też analizując zawartość oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu można ocenić skalę naprawy na poziomie całego organizmu. Wysoki poziom 8-OH-dG w moczu świadczy z jednej strony o nasilonym poziomie stresu oksydacyjnego, z drugiej zaś odzwierciedla wysoką sprawność mechanizmów naprawczych w organizmie. [7, 8]

Indukowane pod wpływem ołowiu i stresu oksydacyjnego uszkodzenia w DNA są przyczyną zaburzeń w strukturze chromatyny, co z kolei wiąże się z zaburzeniami w przebiegu procesu naprawy, replikacji oraz transkrypcji. Genotoksyczne działanie ołowiu przejawia się m.in. powstawaniem mikrojąder, aberracji chromosomowych czy też zwiększeniem częstości wymiany chromatyd siostrzanych [3, 9, 10].

W organizmie człowieka istnieje szereg różnych mechanizmów, których zadaniem jest naprawa uszkodzeń. Uszkodzenia oksydacyjne w DNA usuwane są głównie poprzez wycinanie zasad (BER, ang. *base excision repair*) lub nukleotydów (NER, ang. *nucleotide excision repair*) [6]. Podstawowym mechanizmem, który usuwa z DNA utlenione oraz N-alkilowane zasady azotowe, uracyl, jak również powstałe miejsca apurynowe/apirymidynowe jest ścieżka BER. Mechanizm ten jest wieloetapowy i wymaga współdziałania licznych enzymów. W pierwszym etapie, nieprawidłowa zasada znajdująca się w DNA jest rozpoznawana przez glikozylazę DNA. W kolejnym etapie, zasada ta jest usuwana, a powstała w nici DNA luka jest uzupełniana. System naprawy NER jest wykorzystywany głównie do usuwania takich uszkodzeń, jak: dimery pirymidynowe, wiązania wewnętrznicowe oraz duże addukty. Mechanizm NER polega na rozpoznaniu uszkodzonego nukleotydu, jego wycięciu oraz syntezie nowej nici DNA [11].

Jednym z czynników wpływających na wydajność oraz szybkość naprawy DNA są polimorfizmy genetyczne w genach kodujących enzymy biorące udział w procesie naprawy [12]. Terminem polimor-

fizm genetyczny określa się występowanie w populacji dwóch lub więcej alleli w danym *locus* z częstotliwością większą niż wynikająca z ogólnej częstotliwości mutacji (>1%) [13]. Do najczęściej występujących typów polimorfizmów zalicza się:

- polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*),
- delecje/insercje,
- zmienną liczbę tandemowych powtórzeń (VNTR, ang. *variable number of tandem repeats*) [14].

Za zmienność ludzkiego genomu odpowiadają głównie polimorfizmy typu SNP, które występują co 500–1000 nukleotydów, co daje kilka milionów polimorfizmów w całym genomie człowieka. Polimorfizmy te mogą występować zarówno w sekwencjach kodujących (cSNP, ang. *coding SNP*), niekodujących (ncSNP, ang. *non-coding SNP*) oraz regulatorowych, np. w sekwencjach promotorowych genu. W przypadku gdy SNP występuje w sekwencji kodującej może prowadzić do zmiany w budowie białek (tzw. polimorfizmy niesynonimiczne), a w przypadku sekwencji regulatorowych do modyfikacji ekspresji danego genu. Charakterystyczną cechą polimorfizmów typu SNP jest zróżnicowanie częstości ich występowania w obrębie różnych grup etnicznych [14].

Polimorfizmy w genach kodujących enzymy zaangażowane w mechanizm naprawy uszkodzeń na drodze BER oraz NER mogą wpływać na szybkość i efektywność naprawy uszkodzeń w DNA. Obecnie znanych jest wiele polimorfizmów typu SNP w genach kodujących kluczowe enzymy naprawcze, takie jak APE1, hOGG1, XPA, XRCC1, jednakże ich wpływ na poziom uszkodzeń oksydacyjnych będących konsekwencją zawodowej ekspozycji na ołów nie został dotąd dobrze poznany. Polimorfizm Ser326Cys w genie *hOGG1* prowadzi do obniżonej wydajności naprawy uszkodzeń DNA takich jak 8-hydroksy-2-deoksyguanozyna. Wykazano, iż efekt jaki polimorfizm ten wywiera na zdolności naprawcze organizmu zależy od rodzaju i siły narażenia na czynniki uszkadzające DNA [15–17]. W przypadku polimorfizmu Asp148Glu w genie *APEX1* wyniki badań oceniających wpływ tego polimorfizmu na uszkodzenia indukowane przez ołów są niejednoznaczne. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, że ołów inaktywuje enzym APEX1 co uniemożliwia prawidłową naprawę uszkodzeń DNA [18]. Inne badania nie wykazały wpływu tego polimorfizmu na aktywność endonukleazy [19]. Polimorfizm Gln399Arg zlokalizowany jest w domenie genu *XRCC1* odpowiadającego za wiązanie polimerazy poli(ADP-rybozy), biorącej

udział w mechanizmie BER [20]. Wykazano, że substytucja Arg przez Gln wiąże się z obniżoną wydajnością naprawy uszkodzeń w DNA [15]. W przypadku polimorfizmu -4A/G w genie *XPA* wykazano, iż osoby z genotypem G/G odznaczają się lepszą i wydajniejszą zdolnością naprawy DNA [21].

Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmów w genach naprawy DNA: *APE1*, *hOGG1*, *XRCC1*, *XPA* na poziom uszkodzeń oksydacyjnych w DNA indukowanych przez ołów oraz ocena częstości występowania tychże polimorfizmów w populacji dorosłych osób rasy kaukaskiej pochodzących z południowej Polski.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 115 dorosłych mężczyzn z południowej Polski ekspozowanych zawodowo na ołów (średni czas narażenia na ołów 12,75±10,32 lat) oraz 58 mężczyzn bez narażenia, stanowiących grupę kontrolną. Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli I. Średni wiek osób w grupie pracowników narażonych zawodowo na ołów wynosił 39,65±10,32 lat i był istotnie statystycznie niższy niż w grupie kontrolnej (48,0±9,69). Odsetek osób palących papierosy był porównywalny w obu grupach (34,8% i 32,8%, odpowiednio w grupie narażonej na Pb i kontrolnej), aczkolwiek średni czas palenia papierosów był istotnie statystycznie dłuższy w grupie kontrolnej ($p=0,007$).

Materiał do badań stanowiły próbki krwi i moczu. Próbki krwi do czasu analizy przechowywano w temperaturze -20°C , z kolei próbki moczu w temperaturze -80°C .

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu.

Poziom ołowiu i ZPP we krwi

Poziom ołowiu we krwi (PbB) oraz cynkoporphiryny (ZPP) oznaczano we krwi pełnej. PbB oznaczano w kuwecie grafitowej przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej Unicam 929 oraz 939OZ. Poziom ZPP mierzono za pomocą hematofluorometru Aviv Biomedical, Model 206.

Poziom 8-OH-dG

Stężenie 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny (8-OH-dG) w moczu zostało określone w oparciu o metodę ELISA, z użyciem gotowego zestawu firmy BioVendor, zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Absorbancję próbek odczytano przy dłu-

Tabela I. Charakterystyka badanej populacji
Table I. Characteristics of studied population

Zmienna	Grupa narażona (N=115)	Grupa kontrolna (N=58)	p (wartość testu)
Wiek ^b [lata]	39,65±10,32	48,0±9,69	<0,001 ^a (-4,72)
Średni czas narażenia ^b [lata]	12,75±10,27	-	-
Odsetek palaczy [n (%)]	40 (34,8)	19 (32,8)	0,79 ^c (0,07)
Średni czas palenia ^b [lata]	15,03±8,69	21,94±9,12	0,007 ^a (-2,69)
PbB b [µg/dl]	33,48±9,18	5,35±18,28	0,000a (9,97)
ZPP b [µg/g Hb]	4,10±2,00	2,22±0,70	0,000 ^a (6,72)
8-OH-dG b [ng/mg Kr]	13,83±12,31	12,73±8,63	0,409 ^a (0,83)

^a test U-Mann-Whitneya (*U-Mann-Whitney test*)

^b średnia ± odchylenie standardowe (*mean ± standard deviation*)

^c test Chi-kwadrat (*Chi-square test*)

gości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru mikroplótkowego Eon (BIO-TEK Instruments). Stężenie 8-OH-dG w badanych próbkach wyliczono w oparciu o krzywą wzorcową wyznaczoną ze standardów traktowanych analogicznie do prób badanych.

Izolacja DNA

Genomowe DNA izolowano z krwi pełnej mrozonej za pomocą gotowych zestawów (Syngen Blood/Cell DNA Mini Kit) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Oczyszczone DNA rozpuszczono w 100 µl wody wolnej od nukleaz. Wyizolowane DNA przetrzymywano w temperaturze -20°C.

Genotypowanie

W celu analizy polimorfizmów typu SNP wykorzystano gotowe zestawy (TaqMan SNP Genotyping Assays, Life Technologies) zawierające specyficzne startery oraz sondy. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem termocyklera LightCycler 480 (Roche) w objętości 12,5 µl. Standardowa objętość reakcji zalecana przez producenta wynosi 25 µl, jednakże

przeprowadzono szereg reakcji kontrolnych, w których wykazano, iż objętość 12,5 µl jest wystarczająca do prawidłowego zajścia reakcji. Mieszanina reakcyjna zawierała 10 ng DNA (4 µl), 6,25 µl 2x TaqMan Master Mix, 0,625 µl 20x SNP Genotyping Assay (Life Technologies) oraz 1,625 µl wody wolnej od nukleaz. Warunki reakcji PCR były następujące: 95°C przez 10 min, 92°C przez 15 sek. oraz 60°C przez 1 min (40 cykli). Na podstawie uzyskanych wyników oznaczono genotyp badanych próbek. Aby zapewnić wysoką wiarygodność uzyskiwanych wyników każdą próbkę oznaczano w dwóch powtórzeniach, a każda reakcja oprócz oznaczanych prób zawierała również kontrolę ujemną (mieszanina reakcyjna bez DNA).

W niniejszej pracy analizowano 4 polimorfizmy typu SNP w wybranych genach naprawy DNA. Szczegółową charakterystykę wybranych polimorfizmów przedstawiono w tabeli II.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica 9.PL. Do weryfikacji normalności rozkła-

Tabela II. Charakterystyka polimorfizmów wybranych do analizy
Table II. Characteristics of studied polymorphisms

Gen	Kodowane białko	ref SNP	Chromosom	Funkcja ^a	Allele
<i>APEX1</i>	Endonukleaza AP1	rs1130409	17	Asp148Glu	T>G
<i>hOOG1</i>	Glikozydaza 8-oksoguaniny	rs1052133	3	Ser326Cys	C>G
<i>XPA</i>	Białko XPA	rs1800975	9	-4 A/G	A>G
<i>XRCC1</i>	X-ray repair cross-complementing 1	rs25487	19	Gln399Arg	A>G

^a Według bazy danych Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP), NCBI

^a According to Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP), NCBI

du zmiennych wykorzystano test Shapiro-Wilka. Ze względu na fakt, iż badane cechy nie miały rozkładu normalnego istotność statystyczną różnic pomiędzy grupą narażoną zawodowo na ołów oraz kontrolną oceniono za pomocą nieparametrycznego testu U-Manna-Whitneya. Do oceny różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami wykorzystano test analizy wariancji Kruskalla-Wallisa. Dla określenia związku korelacyjnego pomiędzy mierzonymi parametrami wykorzystano test korelacji rang Spearmana.

W celu określenia rozkładu genotypów poszczególnych polimorfizmów określono częstość występowania poszczególnych alleli i genotypów. Dla wszystkich badanych polimorfizmów wartości obserwowane porównywano z wartościami oczekiwanymi na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga, z użyciem testu χ^2 lub dokładnego testu Fishera. Prawo to opisuje następującym równaniem:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p, q – częstość występowania poszczególnych alleli danego genu

Do wyznaczenia wartości oczekiwanych poszczególnych genotypów posłużono się kalkulatorem statystycznym opracowanym przez M. Court [22]. Przyjęto, że wynik jest istotny statystycznie na poziomie 0,05.

WYNIKI

W grupie ekspozowanej zawodowo na ołów stwierdzono istotnie statystycznie wyższy poziom PbB ($p = 0,000$) oraz ZPP ($p = 0,000$) w porównaniu z grupą kontrolną (tabela I).

Zaobserwowano istotny statystycznie wpływ polimorfizmu -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* na poziom ołowiu we krwi ($p = 0,006$), przy czym najwyższe stężenie tego biomarkera obserwowano u heterozygot. W przypadku polimorfizmu Ser326Cys (rs1052133) w genie *hOGG1* heterozygoty charakteryzowały się znamienne niższym poziomem 8-OH-dG w porównaniu z homozygotami C/C i G/G ($p = 0,01$). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Poziom biomarkerów ekspozycji na ołów oraz uszkodzeń oksydacyjnych DNA w zależności od genotypu
Table III. The level of biomarkers of lead exposure and DNA oxidative damage depending on the genotype

Gen	N	PbB		ZPP		8-OH-dG	
		Średnia \pm SD	K-W (p) ^a	Średnia \pm SD	K-W (p) ^a	Średnia \pm SD	K-W (p) ^a
APEX1							
G/G	49	25,45 \pm 14,9	2,62	3,64 \pm 2,13	3,47	16,31 \pm 17,28	0,42
G/T	84	25,11 \pm 18,67	(0,269)	3,55 \pm 1,78	(0,176)	11,94 \pm 6,85	(0,809)
T/T	40	21,08 \pm 22,15		3,10 \pm 1,84		13,16 \pm 8,38	
hOGG1							
C/C	107	23,68 \pm 17,76	1,17	3,30 \pm 1,78	5,54	15,02 \pm 13,07	9,25
C/G	59	23,87 \pm 19,98	(0,557)	3,62 \pm 2,00	(0,063)	10,46 \pm 6,59	(0,01)
G/G	7	30,70 \pm 20,50		5,10 \pm 2,31		14,87 \pm 4,43	
XPA							
G/G	106	22,05 \pm 20,87	10,35	3,34 \pm 1,87	2,51	13,62 \pm 8,98	2,03
G/A	41	31,92 \pm 9,58	(0,006)	3,78 \pm 1,92	(0,285)	10,61 \pm 5,14	(0,362)
A/A	26	19,70 \pm 15,84		3,52 \pm 1,99		17,31 \pm 21,27	
XRCC1							
G/G	84	24,03 \pm 18,06	0,91	3,46 \pm 1,80	0,66	15,01 \pm 13,81	2,61
G/A	64	25,12 \pm 20,29	(0,634)	3,50 \pm 1,93	(0,718)	12,65 \pm 8,56	(0,271)
A/A	25	20,97 \pm 15,78		3,42 \pm 2,19		10,32 \pm 5,08	

^a analiza wariancji Kruskalla-Wallisa (wartość p)

^a Kruskal-Wallis analysis of variance (p-value)

Częstość występowania poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów była porównywalna w obu grupach, z wyjątkiem polimorfizmu rs1800975 w genie *XPA* ($p=0,0000$). W grupie kontrolnej nie zidentyfikowano heterozygot, co mogło wynikać ze zbyt małej liczebności grupy. Szczegółowe dane dotyczące częstości występowania poszczególnych genotypów przedstawiono w tabeli IV. Nie

wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami w genach:

- *APEX1*, *hOGG1* oraz *XRCC1* w odniesieniu do PbB,
- *APEX1*, *hOGG1*, *XPA* oraz *XRCC1* w odniesieniu do ZPP.
- *APEX1*, *XPA* oraz *XRCC1* w odniesieniu do poziomu 8-OH-dG.

Tabela VI. Rozkłady genotypów w genach naprawy DNA w grupie narażonej na ołów oraz kontrolnej

Table IV. Genotype distribution of DNA repair genes in lead exposed and control groups

Gen	SNP	Genotyp	Narażeni n (%)	Kontrola n (%)	p ^a
<i>APEX1</i>	rs1130409	G/G	37 (32,2)	12 (20,7)	$\chi^2 = 5,372$ $p = 0,068$
		G/T	57 (49,6)	27 (46,6)	
		T/T	21 (18,3)	19 (32,8)	
<i>hOGG1</i>	rs1052133	C/C	72 (62,6)	35 (60,3)	$\chi^2 = 1,569$ $p = 0,456^b$
		C/G	37 (32,2)	22 (37,9)	
		G/G	6 (5,2)	1 (1,7)	
<i>XPA</i>	rs1800975	G/G	59 (51,3)	47 (81,0)	$\chi^2 = 27,139$ $p = 0,0000^b$
		G/A	41 (35,7)	0 (0)	
		A/A	15 (13,0)	11 (19,0)	
<i>XRCC1</i>	rs25487	G/G	57 (49,6)	27 (46,6)	$\chi^2 = 0,16$ $p = 0,922$
		G/A	42 (36,5)	22 (37,9)	
		A/A	16 (13,9)	9 (15,5)	

^a test Chi-kwadrat Pearsona (*Pearson's Chi-square*)

^b dokładny test Fishera (*Fisher's Exact test*)

Tabela V. Rozkład genotypów oraz częstość alleli dla badanych polimorfizmów (łącznie w całej badanej populacji)

Table V. Distribution of genotypes and alleles frequency in studied polymorphisms (among whole study population)

Gen	SNP	Genotyp	Obserwowane	Częstość genotypu	Oczekiwane	p
<i>APEX1</i>	rs1130409	G/G	49	0,28	47,9	$\chi^2 = 0,119$ $p = 0,73$
		G/T	84	0,49	86,3	
		T/T	40	0,23	38,9	
Częstość allelu: G: 0,53; T: 0,47						
<i>hOGG1</i>	rs1052133	C/C	107	0,62	107,7	$\chi^2 = 0,102$ $p = 0,749$
		C/G	59	0,34	57,6	
		G/G	7	0,04	7,7	
Częstość allelu: C: 0,79; G: 0,21						
<i>XPA</i>	rs1800975	G/G	106	0,61	92,5	$\chi^2 = 27,278$ $p = 0,000$
		G/A	41	0,24	68,0	
		A/A	26	0,15	12,5	
Częstość allelu: G: 0,73; A: 0,27						
<i>XRCC1</i>	rs25487	G/G	84	0,49	77,8	$\chi^2 = 4,582$ $p = 0,032$
		G/A	64	0,37	76,4	
		A/A	25	0,14	18,8	
Częstość allelu: G: 0,67; A: 0,33						

Analizowane polimorfizmy w genach *APEX1* oraz *hOGG1* wykazują rozkład alleli zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga. W przypadku polimorfizmu -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* oraz Gln399Arg (rs25487) w genie *XRCC1* wartości obserwowane i oczekiwane nie są w równowadze genetycznej Hardy'ego-Weinberga (tabela V).

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną w odniesieniu do poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w DNA, oznaczanych jako poziom 8-OH-dG w moczu ($p=0,409$). Analiza korelacji pomiędzy biomarkerami ekspozycji na ołów (PbB i ZPP) a poziomem uszkodzeń w DNA wyrażonych poprzez stężenie 8-OH-dG w moczu nie wykazała istotnych statystycznie zależności (tabela VI).

Tabela VI. Korelacje pomiędzy paramaterami w badanej populacji (współczynnik korelacji rang Spearmana)

Table VI. Correlations between study parameters in study population (Spearman's rank correlation coefficient)

Zmienna	PbB	ZPP	8-OH-dG
PbB	–	-0,17*	0,05
ZPP	0,62	–	0,02

* $p<0,05$

DYSKUSJA

Pomimo znanego toksycznego oddziaływania ołowiu na organizm człowieka, metal ten jest wciąż stosowany w różnych dziedzinach przemysłu. Zawodowe narażenie na ołów obecnie występuje przede wszystkim w hutnictwie (huty cynku, ołowiu, miedzi i metali nieżelaznych) oraz przy produkcji akumulatorów [23]. W Polsce w warunkach narażenia zawodowego na ołów pracuje ok. 26 500 osób [24].

W niniejszej pracy badano wpływ ołowiu na poziom uszkodzeń oksydacyjnych w DNA w populacji pracowników narażonych zawodowo na ołów oraz w grupie kontrolnej. U wszystkich badanych osób oznaczono poziom PbB oraz ZPP, które są powszechnie wykorzystywane jako biomarkery ekspozycji na ołów [25]. U pracowników ekspozowanych na ołów stwierdzono ponad 6-krotnie wyższy poziom PbB i niemal 2-krotnie wyższy poziom ZPP w porównaniu z grupą kontrolną.

W przebadanej populacji odsetek osób palących papierosy wynosił ok. 34% i był porównywalny w grupie badanej i kontrolnej. W dymie tytoniowym pochodzącym z wypalenia jednego papierosa

znajduje się 17–980 ng ołowiu, a biorąc pod uwagę fakt, iż retencja tego pierwiastka w układzie oddechowym palacza jest duża, dym tytoniowy staje się ważnym źródłem tego metalu w organizmie [26]. Zalewska i wsp. wykazali, iż na stężenie ołowiu we krwi wpływa nie tylko narażenie zawodowe na ołów, ale również palenie papierosów. W grupie osób ekspozowanych zawodowo m.in. na ołów oraz palących papierosy stwierdzono ponad 7-krotny wzrost PbB w stosunku do grupy kontrolnej, podczas gdy wzrost PbB u osób niepalących papierosów był 6-krotny w porównaniu do kontroli [27]. W pracy Mateuca i wsp. (2008) wykazano, iż analizując interakcje pomiędzy genami naprawy DNA a środowiskowym lub zawodowym narażeniem na czynniki uszkadzające DNA należy wziąć również pod uwagę palenie papierosów [15, 17]. U osób z genotypem Arg/Gln w polimorfizmie Arg399Gln w genie *XRCC1* palących papierosy obserwowano istotny statystycznie wzrost częstości mikrojąder [15]. Ryk i wsp. (2006) wykazali, iż u kobiet z wariantem Met w polimorfizmie Arg399Gln w genie *XRCC1*, które nie paliły papierosów ryzyko zachorowania na raka płuc było istotnie statystycznie niższe [28].

Jednym z mechanizmów toksycznego działania ołowiu jest jego zdolność do indukowania stresu oksydacyjnego (zaburzenie równowagi oksydoredukcyjnej w komórce) co prowadzi do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu i w konsekwencji do utleniania białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych [29]. Uszkodzenia oksydacyjne DNA odgrywają rolę w patofizjologii wielu chorób, m.in. nowotworów, miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych i procesu starzenia się [27]. Oksydacyjne uszkodzenia DNA odpowiadają m.in. za powstawanie mutacji punktowych. Poziom 8-OH-dG jest obecnie jednym z najczęściej wykorzystywanych w badaniach markerem oksydacyjnych uszkodzeń DNA [8, 30]. Wyniki w naszych badaniach nie wykazały istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą ekspozowaną zawodowo na ołów a kontrolną w odniesieniu do poziomu 8-OH-dG w moczu. Nie wykazano też istotnej statystycznie korelacji pomiędzy 8-OH-dG a biomarkerami ekspozycji na ołów (PbB i ZPP). Odmienne wyniki uzyskano w pracy Jasim i wsp. (2012), gdzie wykazano że pracownicy narażeni na ołów mają znamienne wyższy poziom 8-OH-dG w moczu w porównaniu z grupą kontrolną oraz, że wraz ze wzrostem okresu ekspozycji na ołów wzrastał poziom 8-OH-dG w moczu [31]. We wspomnianej pracy średni poziom ołowiu we krwi w grupie ekspozowanej na ołów wynosił od 34,3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ do nawet 69,0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ w zależności od okresu narażenia, a więc był wyższy niż w po-

populacji będącej przedmiotem naszego badania, co może być przyczyną braku znamiennych statystycznie różnic między grupą badaną i kontrolną. Wysoki poziom 8-OH-dG w moczu świadczy z jednej strony o nasilonym poziomie stresu oksydacyjnego, z drugiej zaś odzwierciedla wysoką sprawność mechanizmów naprawczych w organizmie [7, 8]. W pracy Szymańska-Chabowska i wsp. (2009), w której oceniano poziom 8-OH-dG w osoczu osób zawodowo ekspozowanych na metale ciężkie, takie jak ołów, kadm czy arsen, poziom 8-OH-dG w osoczu u osób ekspozowanych na ołów był wyższy niż w grupie kontrolnej, aczkolwiek nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy PbB a 8-OH-dG w osoczu [32].

W badanej populacji zaobserwowano różnice pomiędzy poszczególnymi genotypami w polimorfizmie -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* (najwyższy poziom u osób z genotypem G/A) w odniesieniu do PbB oraz w polimorfizmie Ser326Cys (rs1052133) w genie *hOGG1* (najniższy poziom u heterozygot C/G) w odniesieniu do poziomu 8-OH-dG w moczu. Wyjaśnienie faktu, iż u heterozygot poziom PbB oraz 8-OH-dG odbiegał od poziomu tych markerów u homozygot jest trudne i wymaga dalszych badań. W przypadku polimorfizmu Ser326Cys liczba zidentyfikowanych homozygot G/G była niewielka co mogło wpłynąć na wyniki, dlatego też przebadanie większej populacji może pomóc w wyjaśnieniu tego zagadnienia.

Garcia-Leston i wsp. (2012) wykazali związek pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys a poziomem uszkodzeń oksydacyjnych u pracowników ekspozowanych zawodowo na ołów. U osób z genotypem G/G obserwowano wyższy poziom uszkodzeń w DNA. Autorzy publikacji wskazują, iż u tych osób efektywność usuwania uszkodzeń, takich jak 8-oksoguaniny, jest mniej efektywna [33].

W prezentowanej pracy oceniano również częstość występowania poszczególnych alleli i genotypów. W przypadku polimorfizmu -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* oraz Gln399Arg (rs25487) w genie *XRCC1* częstość alleli odbiegała od częstości oczekiwanej według równowagi Hardy'ego-Weinberga, co może być spowodowane zbyt małą liczbą przebadanych osób. Uzyskane wyniki wykazały, że częstości poszczególnych alleli są porównywalne z opisywanymi w populacji europejskiej dostępnej w bazie danych NCBI (tabela VII). Jedynie w przypadku polimorfizmu Gln399Arg w genie *XRCC1* częstość rzadszego allelu A jest niższa niż w populacji europejskiej opisanej jako HapMap-CEU (odpowiednio 0,27 vs 0,38). Dla pozostałych analizowanych polimorfizmów zaobserwowano iż częstości

rzadszego allelu są nieco inne w populacji europejskiej (zarówno w populacji badanej w niniejszej pracy, jak i HapMan-CEU) niż w populacji światowej, co wynika ze zróżnicowania częstości występowania w różnych grupach etnicznych (tabela VII) [34].

Tabela VII. Porównanie częstości alleli w różnych populacjach

Table VII. Comparison of alleles frequency in different populations

Gen	SNP	Populacja badana	HapMap-CEU	PDR90 (Global)
<i>APEX1</i>	rs1130409	G: 0,53 T: 0,47	G: 0,522 T: 0,478	G: 0,465 T: 0,535
<i>hOOG1</i>	rs1052133	C: 0,79 G: 0,21	C: 0,776 G: 0,224	C: 0,675 G: 0,325
<i>XPA</i>	rs1800975	A: 0,27 G: 0,73	A: 0,381 G: 0,619	A: 0,377 G: 0,623
<i>XRCC1</i>	rs25487	A: 0,33 G: 0,67	A: 0,366 G: 0,634	A: 0,232 G: 0,768

PODSUMOWANIE

Pomimo dobrze poznanego toksycznego działania ołowiu, zawodowe narażenie na ten metal ciężki jest ciągle istotnym problemem. W przebadanej populacji nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy markerami ekspozycji na ołów a biomarkerem oksydacyjnych uszkodzeń w DNA, aczkolwiek zaobserwowano znamienny wpływ polimorfizmu -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* na poziom ołowiu we krwi oraz polimorfizmu Ser326Cys (rs1052133) w genie *hOGG1* w odniesieniu do poziomu 8-OH-dG. W przypadku polimorfizmu -4A/G (rs1800975) w genie *XPA* oraz Gln399Arg (rs25487) w genie *XRCC1* częstość alleli odbiegała od częstości oczekiwanej według równowagi Hardy'ego-Weinberga, co może być spowodowane zbyt małą liczbą przebadanych osób.

Źródło finansowania: Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr 2011/03/N/NZ7/05066

PIŚMIENICTWO

1. IARC: Inorganic and organic lead compounds. Lyon: IARC IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2006; 87.
2. Flora S.J.S., Mittal M., Mehta A.: Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. Indian J Med Res 2008 Oct; 128: 501–523.

3. Olewińska E.: Polimorfizmy w genach naprawy DNA a uszkodzenia indukowane przez ołów – analiza piśmiennictwa. *Med Śr – Environ Med* 2014; 17: 69–74.
4. Patrick L.: Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev J Clin Ther* 2006 Mar; 11: 2–22.
5. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J. i wsp.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006 Mar 10; 160: 1–40.
6. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M. i wsp.: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003 Jan 7; 17: 1195–1214.
7. Wu L.L., Chiou C.C., Chang P.Y. i wsp.: Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2004 Jan; 339: 1–9.
8. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009 Apr; 27: 120–139.
9. Vaglenov A., Carbonell E., Marcos R.: Biomonitoring of workers exposed to lead. Genotoxic effects, its modulation by polyvitamin treatment and evaluation of the induced radioresistance. *Mutat Res* 1998; 418: 79–92.
10. Bilban M.: Influence of the work environment in a Pb-Zn mine on the incidence of cytogenetic damage in miners. *Am J Ind Med* 1998 Nov; 34: 455–463.
11. Roszkowski K.: Mechanizmy naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. *Współczesna Onkol* 2002; 6: 360–365.
12. De Vizcaya-Ruiz A., Barbier O., Ruiz-Ramos R. i wsp.: Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutat Res* 2009 Mar 31; 674: 85–92.
13. Twyman R.: Mutation or polymorphism? [Internet] Available from: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html
14. Sripichai O., Fucharoen S.: Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *J Med Assoc Thail Chotmaihet Thangphaet* 2007 Feb; 90: 394–398.
15. Mateuca R.A., Roelants M., Iarmarcovai G. i wsp.: hOGG1326, XRCC1399 and XRCC3241 polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Mutagenesis* 2008 Jan 1; 23: 35–41.
16. Janssen K., Schlink K., Götte W. i wsp.: DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res* 2001 Aug 9; 486: 207–216.
17. Mateuca R., Aka P.V., De Boeck M. i wsp.: Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol Lett* 2005 Apr 10; 156: 277–288.
18. Hadi M.Z., Coleman M.A., Fidelis K. i wsp.: Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res* 2000 Oct 15; 28: 3871–3879.
19. McNeill D.R., Wong H-K., Narayana A. i wsp.: Lead promotes abasic site accumulation and co-mutagenesis in mammalian cells by inhibiting the major abasic endonuclease Ape1. *Mol Carcinog* 2007 Feb; 46: 91–99.
20. Butkiewicz D., Drosik A., Suwiński R. i wsp.: Influence of DNA repair gene polymorphisms on prognosis in inoperable non-small cell lung cancer patients treated with radiotherapy and platinum-based chemotherapy. *Int J Cancer J Int Cancer* 2012 Oct 1; 131: E1100–1108.
21. Wang F., He Y., Guo H. i wsp.: Genetic Variants of Nucleotide Excision Repair Genes Are Associated with DNA Damage in Coke Oven Workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010 Jan 1; 19: 211–218.
22. Kalkulator statystyczny. [Internet] Available from: <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>
23. Trzcinka-Ochocka M., Jakubowski M., Raźniewska G.: Ocena narażenia zawodowego na ołów w Polsce. *Med Pr* 2005; 56: 395–404.
24. Trzcinka-Ochocka M., Jakubowski M., Raźniewska G.: [Assessment of occupational exposure to lead in Poland]. *Med Pr* 2005; 56: 395–404.
25. Sakai T.: Biomarkers of lead exposure. *Ind Health* 2000 Apr; 38: 127–142.
26. Chełchowska M., Jabłonka-Salach K., Ambroszkiewicz J.: Wpływ palenia tytoniu na poziom ołowiu we krwi kobiet ciężarnych. *Med Wieku Rozwoj* 2012; 3: 196–204.
27. Zalewska M., Królik M., Milnerowicz H.: Wpływ pracy w hutnictwie i palenia papierosów na stężenie malonyldialdehydu i 8-hydroksydeoksyguanozyny we krwi. *Przegląd Lek* 2011; 68: 770–774.
28. Ryk C., Kumar R., Thirumaran R.K. i wsp.: Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, APEX1, XRCC3 and NBS1, and the risk for lung cancer in never- and ever-smokers. *Lung Cancer Amst Neth* 2006 Dec; 54: 285–292.
29. Druga twarz tlenu – Księgarnia PWN [Internet]. ksiegarnia.pwn.pl [cited 2014 Mar 18]; Available from: <http://ksiegarnia.pwn.pl/produkt/4126/druga-twarz-tlenu.html>
30. Pilger A., Rüdiger H.W.: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health* 2006 Oct; 80: 1–15.
31. Jasim S.M.: Lead exposure effects on batteries manufacturing factory workers in Baghdad. *Iraqi JMS* 2012; 10: 321–327.
32. Szymańska-Chabowska A., Beck A., Poręba R. i wsp.: Evaluation of DNA damage in people occupationally exposed to arsenic and some heavy metals. *Pol J Env Stud* 2009; 18: 1131–1139.
33. García-Lestón J., Roma-Torres J., Vilares M. i wsp.: Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environ Int* 2012 Aug; 43: 29–36.
34. NCBI. SNP database [Internet] [cited 2014 Mar 18]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Adres do korespondencji:

Elżbieta Olewińska
Pracownia Toksykologii Genetycznej
Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
ul. Kościelna 13; 41-200 Sosnowiec
tel. (32) 266 08 85; fax. (32) 266 11 24
e-mail: e.olewinska@gmail.com