

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ФАКТОРОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ

© 2020 г. А. В. Мейер¹, *, Т. А. Толочко¹, В. И. Минина², А. А. Тимофеева², А. В. Ларионов¹

¹Кемеровский государственный университет, Кемерово, 650000 Россия

²Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения
Российской академии наук, Кемерово, 650099 Россия

*e-mail: shapo-alina@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2019 г.

После доработки 03.07.2019 г.

Принята к публикации 23.07.2019 г.

Исучен уровень цитогенетических повреждений с применением методов учета хромосомных аберраций (ХА) и ДНК-комет в лимфоцитах, а также микроядерного теста на буккальных эпителиоцитах (МЯ в БЭ) в группе шахтеров ($N = 116$) и контрольной выборке ($N = 169$). Установлены значимые превышения уровня основных показателей тест-систем для группы шахтеров относительно группы сравнения: уровень хромосомных аберраций составил 4.69 ± 0.28 и $2.13 \pm 0.10\%$, доля ДНК в хвосте комет – 4.33 ± 0.38 и $2.16 \pm 0.24\%$, уровень микроядер – 1.44 ± 0.21 и $0.23 \pm 0.12\%$ ($p < 0.05$). Также для производственной выборки отмечено значимое увеличение уровня дополнительных показателей: для ХА – частоты одиночных фрагментов, аберраций хроматидного типа, парных фрагментов, дицентриков без фрагментов, межхромосомных обменов и аберраций хромосомного типа; для ДНК-комет – момента хвоста кометы и момента хвоста по Оливе; для МЯ в БЭ – частоты двуядерных клеток, клеток с ядерной насечкой, сдвоенным ядром, кариорексисом и апоптозными телами. Ранжирование полученных результатов по основным цитогенетическим нарушениям позволило установить, что в группе шахтеров доля лиц, имеющих значение показателя выше фонового, для ХА составила 68.97%, для ДНК-комет – 52.13%, для МЯ в БЭ – 36.08%. Доля лиц, имеющих значение цитогенетических повреждений выше фоновых одновременно по трем тест-системам, составила 20% от общей выборки шахтеров. Для оценки мутагенных эффектов воздействия производственных факторов угледобывающих предприятий представляется целесообразным использование комплекса тест-систем (метод ХА, ДНК-комет и МЯ в БЭ).

Ключевые слова: шахтеры, угольная промышленность, хромосомные аберрации, ДНК-кометы, микроядерный тест, буккальные эпителиоциты.

DOI: 10.31857/S0016675820050100

Пыль угольных шахт состоит из угольно-породных частиц, способных вызывать альтерацию дыхательных путей и клеток буккального эпителия. В результате стимуляции фагоцитоза образуются активные формы кислорода, которые как непосредственно, так и путем активации перекисного окисления липидов способны индуцировать повреждение ДНК, пролиферативные и деструктивные изменения клеток [1]. Цито- и генотоксические эффекты воздействия угольной пыли продемонстрированы с использованием метода ДНК-комет, а также микроядерного теста при экспозиции клеточной линии фибробластов легких китайского хомячка (V79) *in vitro* [2]. Наряду с угольной пылью кластогенные эффекты в различных типах клеток горнорабочих могут быть связаны с воздействием радиации, полициклических ароматических уг-

леводородов (ПАУ), оксида азота, метана, оксида углерода, сероводорода, вибрации и др.

В настоящее время для исследования повреждений ДНК при различных типах воздействия (комбинированного химического, ПАУ, взвешенных в воздухе твердых частиц и других типах загрязнений) в качестве информативных тест-систем используются метод ДНК-комет [3, 4], учет хромосомных аберраций в лимфоцитах (ХА) [5], а также микроядерный тест (МЯ) на буккальных эпителиоцитах и лимфоцитах периферической крови [6].

Метод ДНК-комет позволяет выявлять преимущественно потенциально репарируемые повреждения ДНК, вызванные оксидантами, алкилирующими и интеркалирующими агентами, в то же время цитогенетические тесты (ХА и МЯ) характеризуют кластогенные и/или анеугенные эф-

Таблица 1. Возрастная характеристика и статус курения обследованных групп

Группа	Метод исследования	N	Возраст, лет		Курение	
			мин–макс	среднее значение \pm \pm ошибка среднего	да	нет
Шахтеры	ХА	116	29–67	49.39 \pm 0.79	49	67
	ДНК-кометы	94	28–67	49.62 \pm 0.83	48	46
	МЯ в БЭ	97	28–66	51.67 \pm 0.75	35	62
Контроль	ХА, ДНК-кометы, МЯ в БЭ	169	39–79	50.48 \pm 0.54	69	100

Примечание. ХА – метод учета хромосомных aberrаций, МЯ в БЭ – микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах, мин–макс – минимальное и максимальное значения.

факты в условиях воздействия генотоксикантов в период интерфазы и митоза [7, 8]. Учитывая сложный характер экспонирования, которому подвержены работники угольных шахт, включающий угольно-породную пыль, тяжелые металлы и ПАУ, представляется перспективным наряду с оценкой потенциально репарируемых повреждений ДНК учитывать и кластогенные и анеугенные эффекты воздействия производственных факторов угледобывающих предприятий. В литературе имеется ряд комплексных работ, проведенных с применением нескольких методов: учета МЯ и ДНК-комет в лимфоцитах периферической крови [9]; учета ХА, сестринских хроматидных обменов и МЯ в лимфоцитах [10], МЯ в буккальных эпителиоцитах и лимфоцитах периферической крови параллельно с методом ДНК-комет в лимфоцитах [8, 11]. Тем не менее большая часть исследований проводится с использованием одной из вышперечисленных тест-систем [12–18]. При этом как при исследовании отдельных типов повреждений ДНК, так и при комплексном подходе полученные результаты в отношении эффектов генотоксичности, выявляемых различными методами, а также согласованности данных при одновременном использовании спектра методов зачастую являются достаточно противоречивыми.

Учитывая все вышесказанное, целью данного исследования стала оценка влияния профессиональных факторов на цитогенетический статус шахтеров с использованием трех тест-систем: микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах, метод учета хромосомных aberrаций и ДНК-комет в лимфоцитах периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы периферической крови и буккальных эпителиоцитов от 116 стажированных шахтеров (стаж работы под землей от 10 до 42 лет при среднем значении 22.60 ± 0.65 года) и от 169 лиц мужского пола, профессиональная деятельность которых не связана с воздействием генотоксических факторов. Воз-

растная характеристика, а также статус курения обследованных групп приведены в табл. 1.

В контингент обследованных шахтеров вошли рабочие основных профессий: проходчики, машинисты комбайнов и врубовых машин, горнорабочие очистных забоев, горные мастера, горномонтажники подземные. Обследованные группы выравнены по возрасту. Все доноры подписали информированное согласие на участие в обследовании. Сбор анамнестических данных проводили путем анализа медицинских карт, а также устного анкетирования. В исследование не включены лица с хроническими заболеваниями в стадии обострения, проходившие рентгенодиагностические процедуры в последние три месяца, перенесшие за прошедший месяц острые респираторные и инфекционные заболевания.

Метод учета хромосомных aberrаций в лимфоцитах. Культивирование клеток крови проводили по единому стандартному протоколу в 48-часовых культурах лимфоцитов периферической крови [19, 20]. Питательную смесь готовили из расчета: среда RPMI-1640 (4.5 мл), эмбриональная телячья сыворотка (1 мл) и 0.1 мл фитогемагглютинина (ПанЭко). Смесь помещали в стерильные культуральные флаконы и добавляли 0.5 мл гепаринизированной крови. Культуральные флаконы выдерживали при 37°C в течение 48 ч. За два часа до фиксации в культуры вводили колхицин (0.5 мкг/мл). После гипотонической обработки и фиксации клеток суспензию раскапывали на охлажденные чистые предметные стекла и высушивали. Препараты окрашивали 1%-ным красителем Гимза (Merk) и анализировали при помощи микроскопа Axio Scope 2 plus (Carl Zeiss). На каждого человека анализировали по 200 метафаз. Долю aberrантных метафаз определяли как отношение числа клеток с aberrациями хромосом к общему числу изученных клеток. Учитывали aberrации хроматидного (одиночные фрагменты и межхроматидные обмены) и хромосомного (парные фрагменты, дисцентрические хромосомы с фрагментами и без, кольцевые хромосомы, атипичные моноцентрики)

типов. Ахроматические пробелы в число аберраций не включали.

Метод “ДНК-комет” выполняли в щелочной модификации, разработанной Singh с коллегами [21]. После лизиса в течение ночи (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl (Вектон, Россия), 0.1 моль/л Na₂ ЭДТА (Вектон), 1% Triton X-100 (Amresco, США), 10% ДМСО (Вектон)), препараты обрабатывали 20 мин электродным буфером pH 13 с последующим электрофорезом в течение 30 мин при напряжении 25 В. Лизис и электрофорез проводили при 4°C при отсутствии прямых солнечных лучей.

Оценку параметров фрагментации проводили путем микрофотографирования препаратов, окрашенных красителем SYBR GREEN, с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager 2. Всего сфотографировалось 100 случайно отобранных комет от каждого исследованного образца при увеличении $\times 200$. Последующую обработку фотографий проводили с помощью комплекта ПО CASP [22]. Рассчитывали следующие параметры: доля ДНК в хвосте кометы, момент хвоста и момент хвоста по Оливе. Момент хвоста рассчитывался как произведение длины хвоста на долю ДНК в хвосте кометы, момент по Оливе – как произведение доли ДНК в хвосте на разность средней длины хвоста и средней длины головы кометы.

Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах. Цитологические препараты готовили с использованием буферного раствора по методическим рекомендациям, изложенным в работе Thomas et al. [23], с некоторыми модификациями. Перед взятием образцов буккального эпителия обследуемые тщательно ополаскивали рот очищенной питьевой водой. Сбор материала проводили смоченным в буферном растворе (10 мл: Tris HCl, EDTA, NaCl, pH 7) шпателем. В лаборатории осуществляли центрифугирование (1000 об./мин, 10 мин), аспирирование надосадка, ресуспендирование осадка (1 мл), доведение объема буферным раствором до 10 мл. После трехкратной промывки образцы клеток раскапывали на предварительно отмытые и подогретые предметные стекла. Препараты фиксировали фиксатором Кларка (метанол : ледяная уксусная кислота 3 : 1). На первом этапе окрашивание проводили ДНК-специфическим 2.5%-ным раствором ацетоорсеина (1 ч, 37°C), докрасивание цитоплазмы осуществляли 1%-ным спиртовым раствором светлого зеленого (15–20 с). Анализ препаратов проводили на микроскопе Nikon E200 при увеличении $100 \times 1.5 \times 10$.

В ходе микроядерного анализа на препаратах с учетом рекомендаций Л.П. Сычевой [24] анализировали 15 типов кариологических повреждений, включающих цитогенетические (микроядро, протрузия “пузырек”, “разбитое яйцо”, “язык”, атипичная форма ядра), пролиферативные нарушения

(двуядерность, ядерная насечка, сдвоенное ядро), а также показатели ранней и поздней деструкции ядра (перинуклеарная вакуоль, ядерная вакуолизация, конденсация хроматина, кариопикноз, кариорексис, кариолизис, апоптозные тела). На препаратах анализировали 1000 клеток, частоту встречаемости ядерных аномалий выражали в промилле (‰). Частоту клеток с деструктивными изменениями выражали как количество клеток, найденных сверх 1000.

Статистическую обработку данных проводили с использованием специализированных пакетов программы “Statistica 8.0”. Соответствие частот анализируемых показателей нормальному распределению оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение всех изучаемых параметров отличалось от нормального, для межгрупповых сравнений использовался непараметрический тест Манна–Уитни (Mann–Whitney *U*-test). Корреляционный анализ показателей включенных в исследование методов проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для всех количественных показателей проводился расчет минимальных и максимальных значений; для показателей, характеризующих возраст обследованных и стаж работы на вредном производстве, рассчитывали средние величины и стандартные ошибки; для показателей тест-систем – средние значения, ошибки средних, медианы, значения нижнего и верхнего квартилей, которые в дальнейшем были использованы в качестве границ референтного интервала. При сравнении частот качественных признаков использовали критерий χ^2 Пирсона. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ показателей по включенным в исследование тест-системам выявил статистически значимые повышения уровня отдельных типов повреждений в группе шахтеров относительно контрольной выборки (табл. 2).

В качестве факторов, способных модулировать уровень нарушений в анализируемых группах, рассматривали наличие вредной привычки и стаж курения, для группы шахтеров дополнительно исследовалось возможное влияние стажа работы на вредном производстве. Сравнительный анализ частот регистрации нарушений в группах, дифференцированных по стажу работы на вредном производстве (до 15 лет включительно и свыше 15 лет), а также расчет коэффициентов корреляции не выявили зависимости анализируемых параметров от стажа работы ни по одной из тест-систем ($p > 0.05$).

Дифференцированный анализ полученных результатов в зависимости от статуса курения позво-

Таблица 2. Значимые отличия частот показателей метода учета хромосомных aberrаций, метода ДНК-комет в лимфоцитах и микроядерного теста в буккальных эпителиоцитах в группе шахтеров относительно контрольной выборки

Показатель	Контроль		Шахтеры		<i>p</i>
	медиана (мин–макс)	среднее значение ± ± ошибка среднего	медиана (мин–макс)	среднее значение ± ± ошибка среднего	
Метод учета хромосомных aberrаций, %					
Aberrаций на 100 клеток	1.50 (0–5.50)	2.13 ± 0.10	4.00 (0–13.00)	4.69 ± 0.28	0.0000
Одиночные фрагменты	1.00 (0–4.00)	1.46 ± 0.08	2.00 (0–10.00)	2.67 ± 0.22	0.0019
Aberrации хроматидного типа	1.00 (0–4.00)	1.47 ± 0.08	2.00 (0–10.00)	2.69 ± 0.22	0.0019
Парные фрагменты	0 (0–3.50)	0.38 ± 0.05	1.00 (0–5.00)	1.26 ± 0.10	0.0000
Дицентрики без фрагмента	0 (0–0.50)	0.04 ± 0.01	0 (0–3.00)	0.22 ± 0.04	0.0001
Межхромосомные обмены	0 (0–2.00)	0.28 ± 0.03	0.5 (0–3.00)	0.52 ± 0.06	0.0021
Aberrации хромосомного типа	0.50 (0–5.50)	0.63 ± 0.06	2.00 (0–8.00)	1.99 ± 0.14	0.0000
Метод ДНК-комет, %					
Доля ДНК в хвосте кометы	1.74 (0.22–8.64)	2.16 ± 0.24	3.28 (0.53–15.69)	4.33 ± 0.38	0.0000
Момент хвоста кометы	0.33 (0.01–3.49)	0.51 ± 0.09	0.63 (0.03–10.21)	1.37 ± 0.19	0.0011
Момент хвоста Оливе	0.65 (0.08–3.47)	0.77 ± 0.09	1.27 (0.18–9.52)	1.91 ± 0.19	0.0000
Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах, ‰					
Микроядро	0 (0–5.00)	0.23 ± 0.12	1.0 (0–17.00)	1.44 ± 0.21	0.0000
Двухядерность	2.00 (0–26.00)	3.82 ± 0.66	6.00 (0–21.00)	6.26 ± 0.49	0.0000
Ядерная насечка	1.00 (0–9.00)	1.81 ± 0.28	3.00 (0–11.00)	3.79 ± 0.27	0.0000
Сдвоенное ядро	3.00 (0–17.00)	4.59 ± 0.45	6.00 (0–22.00)	5.97 ± 0.40	0.0339
Кариорексис	0 (0–68.00)	2.96 ± 1.39	3.00 (0–28.00)	4.98 ± 0.58	0.0000
Апоптозные тела	0 (0–1.00)	0.04 ± 0.03	0 (0–8.00)	0.75 ± 0.14	0.0000

Примечание. Мин–макс — минимальное и максимальное значения, *p* — уровень значимости, *U* — критерий Манна–Уитни.

лил установить, что у курящих шахтеров средний показатель частоты выявления межхромосомных мостов в буккальных эпителиоцитах статистически значимо выше по сравнению с некурящими, соответствующие значения составили 0.34 ± 0.14 и $0.02 \pm 0.01\%$ ($p = 0.0016$). В контрольной группе значимые отличия выявлены по частоте выявления клеток с атипичной формой ядра при большем значении у курящих мужчин — $9.23 \pm 1.05\%$ против $6.18 \pm 1.25\%$ у некурящих ($p = 0.0189$). В то же время наличие положительной умеренной корреляции частоты выявления атипичных ядер со стажем курения установлено для группы шахтеров ($R = 0.42$, $p = 0.0200$).

Ранжирование результатов исследования, полученным методом ДНК-комет, в контрольной группе позволило установить, что значения от 0.96 до 3.15% содержания ДНК в хвосте кометы укладываются в границы 25–75 перцентилей (P_{25} – P_{75}), данные параметры были приняты как фоновые; доля лиц, имеющих значения показателя выше фонового, в группе шахтеров составила 52.13% ($\chi^2 = 8.52$, $p = 0.004$). Относительно результатов, получен-

ных с использованием микроядерного теста, пределы значений частот выявления микроядер для P_{25} – P_{75} составили 0–1‰. Доля лиц с частотой выявления микроядер выше 1‰ в группе шахтеров составила 36.08% ($\chi^2 = 17.95$, $p < 0.001$). Доля шахтеров с уровнем частоты хромосомных aberrаций выше 2.5% ($P_{25} = 1\%$, $P_{75} = 2.5\%$) составила 68.97% ($\chi^2 = 60.32$; $p < 0.001$) (рис. 1).

Корреляционный анализ показателей, включенных в исследование трех тест-систем, выявил наличие слабой положительной корреляции доли ДНК в хвосте комет лимфоцитов с протрузиями типа “пузырек” ($R = 0.33$, $p = 0.0147$) и с атипичной формой ядра ($R = 0.28$, $p = 0.0234$) в буккальных эпителиоцитах, а также с частотой выявления мультиабберантных клеток в лимфоцитах ($R = 0.27$, $p = 0.0284$). Наряду с этим в клетках буккального эпителия для выборки в целом установлена умеренная положительная корреляция частоты выявления атипичных ядер с конденсацией хроматина ($R = 0.45$, $p < 0.0001$) и кариолизисом ($R = 0.39$, $p < 0.0001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ спектра мутаций, выявленных при исследовании метафаз, позволил установить преобладание в обеих группах aberrаций хроматидного типа, средние значения статистически достоверно выше в группе шахтеров (2.69%) относительно контрольной выборки (1.47%) (табл. 2). Хромосомные aberrации формируются до начала или в период репликации ДНК, а хроматидные – после завершения синтетического периода. Соотношение средних значений частот aberrаций хроматидного и хромосомного типов составило в группе контроля 2.33, а в группе шахтеров – 1.35, что может свидетельствовать о тенденции роста частоты повреждений ДНК до ее репликации, которая может быть обусловлена воздействием ионизирующей радиации от радона. Известно, что цитогенетическим маркером воздействия ионизирующей радиации является формирование дицентрических хромосом, средний показатель дицентрических хромосом без фрагмента в 5.5 раз выше в группе шахтеров (табл. 2).

Метод ДНК-комет является быстрым в исполнении и достаточно информативным, позволяющим оценить количество повреждений ДНК. Высокий уровень повреждений может свидетельствовать как о высокой мутагенной нагрузке, так и о снижении репарационной активности. Ранее в ряде работ установлена способность генов репарации модулировать частоту нарушений наследственного материала [25, 26]. Данный метод чувствителен к большому спектру нарушений ДНК, включая одно- и двухцепочечные разрывы, апуриновые/апириимидиновые сайты и другие. Исследование ДНК-комет позволило установить, что в группе шахтеров показатель среднего содержания ДНК в хвосте комет статистически достоверно превышает соответствующее значение для контрольной группы (табл. 2). Показатели момента хвоста также характеризуются значимым двукратным превышением относительно контрольной группы.

Буккальные эпителиоциты характеризуются высокой скоростью обновления, поэтому проявляют максимальную чувствительность к воздействию токсических и мутагенных факторов эндо- и экзогенной природы. Микроядерный тест на эксфолиативных клетках позволяет оценить цитогенетические, пролиферативные и деструктивные нарушения на стадии интерфазы *in situ*, что исключает влияние условий культивирования на регистрируемые повреждения. Относительно цитогенетических нарушений в буккальных эпителиоцитах установлено семикратное превышение частоты выявления микроядер для группы шахтеров по сравнению с контролем ($p < 0.0001$). Микроядра, образующиеся в результате повреждения нитей веретена деления и/или непосредственных разрывов ДНК, являются маркерами генотоксиче-

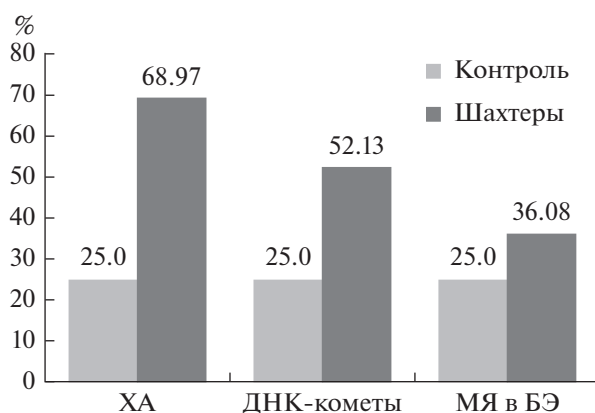


Рис. 1. Доля лиц (%) в обследованных группах, имеющих значения основных показателей цитогенетических тестов выше фоновых. ХА – частота хромосомных aberrаций, ДНК-кометы – доля ДНК в хвосте кометы, МЯ в БЭ – частота микроядер в буккальных эпителиоцитах.

ского воздействия различной природы. Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют об индукции кластогенных эффектов в клетках буккального эпителия в условиях экспозиции комплексом производственных факторов угледобывающих предприятий. Для показателей, характеризующих нарушение процессов цитотомии (двуядерность) и кариотомии (ядерная насечка, сдвоенное ядро), в группе шахтеров отмечается двукратное увеличение частоты регистрации клеток с двумя ядрами и ядерной насечкой; частота выявления клеток со сдвоенным ядром составляет $5.97 \pm 0.40\%$, в контрольной группе $4.59 \pm 0.45\%$ ($p = 0.0339$) (табл. 2). Анеугенные эффекты могут быть обусловлены развитием оксидативного стресса, дезорганизацией сигнальной системы клеток, нарушением структуры центромер, кинетохоров, цитоскелета при хроническом воздействии угольной пыли с высоким содержанием тяжелых и переходных металлов. Угли Кузнецкого бассейна характеризуются повышенной концентрацией хрома (280 мг/кг), который может провоцировать вышеперечисленные явления. В работе А.В. Махалина и др. [27] установлено, что увеличение содержания хрома в крови шахтеров г. Междуреченска и г. Новокузнецка Кемеровской области сопровождается повышением частоты полиплоидизации и гипоплоидизации Т-лимфоцитов. В целом можно отметить, что представленные в настоящей работе результаты частот и спектра цитогенетических и пролиферативных нарушений согласуются с полученными нами ранее данными на меньших выборках [28].

Клетки с нерепарируемыми повреждениями ДНК и патологическими митозами элиминируются путем апоптоза. В отношении деструктивных изменений ядер в настоящем исследовании

значимые отличия между анализируемыми выборками получены только по частоте выявления кариорексиса и апоптозных тел, что позволяет сделать заключение о преимущественной гибели клеток эксфолиативного эпителия в провоцирующих условиях производственной среды по апоптическому пути. Выявленные значимые отличия между анализируемыми выборками по показателям микроядерного теста на буккальных эпителиоцитах, за исключением апоптозных тел, согласуются с литературными данными [17, 18, 29].

В исследовании работников предприятий открытой добычи угля было обнаружено значительное повышение частоты нарушений в микроядерном тесте, но не фрагментации ДНК методом комет [8]. Повышение числа цитогенетических аномалий показано и в ряде других работ, например [10], где было установлено увеличение частоты хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов с увеличением стажа работы на угледобывающем предприятии. В то же время в некоторых работах обнаружено одновременное возрастание показателей частоты цитогенетических нарушений, определяемых микроядерным тестом на буккальных эпителиоцитах, и уровня фрагментации ДНК в методе комет [29] в условиях воздействия угольно-породной и угольно-зольной пыли от сжигания угля. Исследования на модельных объектах методом ДНК-комет показали увеличение фрагментации ДНК у млекопитающих и рептилий (*Mus musculus*, *Iguana iguana*), обитающих в непосредственной близости от мест добычи угля, в то же время результаты микроядерного теста были неоднозначны [30]. Значительная генотоксичность образцов угольно-породной и угольно-зольной пыли была показана на моделях — клетках V79 *in vitro*. Экспонирование образцами пыли вызывало повышение уровня фрагментации ДНК и уровня микроядер, причем частота микроядер возрастала с увеличением концентрации пыли [7].

Компоненты табачного дыма способны индуцировать цитогенетические нарушения, а также усугублять кластогенные воздействия факторов производственной среды. В настоящем исследовании для группы шахтеров установлена ассоциация факта курения с повышенной частотой выявления клеток с нуклеоплазменными мостами, для контрольной группы — с атипичными ядрами. Известно, что межхромосомные мосты формируются из дицентрических хромосом в процессе митоза или фрагментации ядра [24]. Изменение формы ядра связано с нарушением ядерной ламины, скаффолда, расположения хромосом и является фактором, предрасполагающим к дальнейшим деструктивным изменениям ядра, что подтверждается наличием умеренной положительной корреляции с конденсацией хроматина ($R = 0.45, p < 0.0001$) и кариолизисом ($R = 0.39, p < 0.0001$).

Для оценки степени мутагенной нагрузки, связанной с воздействием производственных факторов, необходимо определить фоновые значения для контрольной группы соответствующего возраста и пола. В исследованиях за периоды 1986–1998 гг. и 2005–2012 гг. для взрослого населения г. Кемерово в качестве фоновых значений для уровня ХА предлагалось использовать 3.00 и 1.48% соответственно [31]. Учитывая специфику подбора групп (включены только мужчины) и семилетний период разрыва между последним и настоящим исследованиями, было вновь рассчитано фоновое значение частоты ХА, которое составило 2.5%. Для показателей доли ДНК в хвосте комет и частоты выявления микроядер в буккальных эпителиоцитах фоновые значения для мужчин г. Кемерово были рассчитаны впервые и составили 3.15 и 1.00‰ соответственно. На основании полученных значений обследованные группы были подразделены на когорты с уровнем основных цитогенетических нарушений в пределах или превышающих фоновые значения (рис. 1). По всем использованным методам для группы шахтеров отмечено выраженное превышение доли лиц со значением выше фоновых относительно группы сравнения.

Использование отдельных тест-систем для оценки мутагенных эффектов производственных факторов подземной угледобычи позволяет выявить группы рабочих повышенного генетического риска. При этом метафазный анализ ХА выявляет генотоксические эффекты только в Т-лимфоцитах, метод ДНК-комет — во всех лейкоцитах без дифференцировки, микроядерный тест — в буккальных эпителиоцитах. В настоящем исследовании доля лиц, имеющих значение цитогенетических повреждений выше фоновых одновременно по трем тест-системам, составила 20% от общей выборки шахтеров. Таким образом, использование комплекса методов позволяет судить о формировании цитогенетических нарушений в клетках с продолжительным жизненным циклом, а также в быстро обновляющихся клетках эксфолиативного эпителия, обладающих различной реактивностью при воздействии экзо- и эндогенных факторов одинаковой силы.

Методы анализа метафазных хромосом и микроядерного тестирования буккальных эпителиоцитов позволяют выявлять нестабильные цитогенетические нарушения, которые приводят к клеточной гибели, а скорость элиминации клеток крови и эпителия различна. Поскольку метод ДНК-комет позволяет оценить накопление модификаций и аддуктов ДНК, повышающих риск разрывов в этих молекулах, положительные корреляции в настоящем исследовании установлены между показателями доли ДНК в хвосте и цитогенетической нестабильности как в лимфоцитах (мультиабберрантные

клетки), так и в буккальных эпителиоцитах (ядерная протрузия “пузырек”, атипичная форма ядра).

Таким образом, производственные факторы угольных шахт провоцируют цитогенетические нарушения в клетках крови и буккальных эпителиоцитах, а также нарушение процессов пролиферации и усиление деструктивных изменений, характерных для гибели клеток по апоптотическому пути в эксфолиативных клетках. Для оценки мутагенных эффектов воздействия производственных факторов угледобывающих предприятий представляется целесообразным использование комплекса тест-систем (метод ХА, ДНК-комет и МЯ в БЭ).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00022).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Armutcu F., Gun B.D., Altin R., Gurel A.* Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambience // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2007. V. 24. № 2. P. 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.03.002>
2. *Leon-Mejia G., Silva L.F., Civeira M.S. et al.* Cytotoxicity and genotoxicity induced by coal and coal fly ash particles samples in V79 cells // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016. V. 23. № 23. P. 24019–24031. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7623-z>
3. *Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G. et al.* The comet assay: topical issues // *Mutagenesis.* 2008. V. 23. P. 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
4. *Vinzens P.S., Moller P., Sorensen M. et al.* Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage // *Environ. Health Perspect.* 2005. V. 113. P. 1485–1490. <https://doi.org/10.1289/ehp.7562>
5. *Bonassi S., Znaor A., Norppa H., Hagmar L.* Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 104. № 1–4. P. 376–382. <https://doi.org/10.1159/000077519>
6. *Сычева Л.П.* Оценка мутагенных эффектов факторов окружающей среды полиорганным микроядерным тестом // *Вестник РАМН.* 2006. № 7. С. 27–32.
7. *Matzenbacher C.A., Garcia A.L.H., dos Santos M.S. et al.* DNA damage induced by coal dust, fly and bottom ash from coal combustion evaluated using the micronucleus test and comet assay *in vitro* // *J. Hazardous Materials.* 2017. V. 324. P. 781–788. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.062>
8. *da Silva Júnior F., Tavella R., Fernandes C. et al.* Genotoxicity in Brazilian coal miners and its associated factors // *Hum. & Experim. Toxicol.* 2018. V. 37. № 9. P. 891–900. <https://doi.org/10.1177/0960327117745692>
9. *Leon-Mejia G., Espitia-Perez L., Hoyos-Giraldo L.S. et al.* Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay // *Sci. Total Environ.* 2011. V. 409. № 4. P. 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.049>
10. *Donbak L., Rencuzogullar E., Yavuz A., Topaktas M.* The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey // *Mutat. Res.* 2005. V. 588. № 2. P. 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.014>
11. *Rohr P., Kvitko K., da Silva F.R. et al.* Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal // *Mutat. Res.* 2013. V. 758. № 1–2. P. 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.006>
12. *Smerhovský Z., Landa K., Rossner P. et al.* Increased risk of cancer in radon-exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations // *Mutat. Res.* 2002. V. 514. № 1–2. P. 165–176.
13. *Santa Maria S.R., Arana M., Ramirez O.* Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes // *Genet. Mol. Biol.* 2007. V. 30. № 4. P. 1135–1138. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000600017>
14. *Минина В.И., Кулемин Ю.Е., Толочко Т.А. и др.* Генотоксические эффекты воздействия производственной среды у шахтеров Кузбасса // *Медицина труда и промышл. экология.* 2015. № 5. С. 4–8.
15. *Volobaev V.P., Larionov A.V., Kalyuzhnaya E.E. et al.* Associations of polymorphisms in the cytokine genes *IL1β* (*rs16944*), *IL6* (*rs1800795*), *IL12b* (*rs3212227*) and growth factor *VEGFA* (*rs2010963*) with anthracosilicosis in coal miners in Russia and related genotoxic effects // *Mutagenesis.* 2018. V. 33. № 2. P. 129–135. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex047>
16. *Sinitsky M.Y., Minina V.I., Gafarov N.I. et al.* Assessment of DNA damage in underground coal miners using the cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes // *Mutagenesis.* 2016. V. 31. № 6. P. 669–675. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew038>
17. *Rohr P., da Silva J., da Silva F.R. et al.* Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay // *Environ. Mol. Mutagen.* 2013. V. 54. № 1. P. 65–71. <https://doi.org/10.1002/em.21744>
18. *Leon-Mejia G., Quintana M., Debastiani R. et al.* Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. V. 107. P. 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.023>
19. *Hungerford P.A.* Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase

- chromosomes by treatment with hypotonic KCl // *Stain Techn.* 1965. V. 40. P. 333–338.
20. Дружинин В.Г. Количественные характеристики частоты хромосомных aberrаций в группе жителей крупного промышленного региона Западной Сибири // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 10. С. 1373–1378.
 21. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Res.* 1988. V. 175. P. 184–191.
 22. Konca K., Lankoff A., Banasik A. et al. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay // *Mutat. Res.* 2003. V. 534. № 1–2. P. 15–20.
 23. Thomas P., Hollad N., Bolognesi C. et al. Buccal micronucleus cytome assay // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. P. 825–837.
 24. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // *Мед. генетика*. 2007. № 11. С. 3–11.
 25. Batar B., Guven M., Baris S. et al. DNA repair gene *XPB* and *XRCC1* polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leuk. Res.* 2009. V. 33. P. 759–763.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.11.005>
 26. Jiang J., Zhang X., Yang H., Wang W. Polymorphisms of DNA repair genes: *ADPRT*, *XRCC1*, and *XPB* and cancer risk in genetic epidemiology // *Meth. Mol. Biol.* 2009. V. 471. P. 305–333.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-416-2_16
 27. Махалин А.В., Редкокаша Л.Ю., Мороз В.В. и др. Цитогенетические изменения Т-лимфоцитов шахтеров // *Общая реаниматология*. 2007. Т. 3. № 5–6. С. 139–143.
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2007-6-139-143>
 28. Мейер А.В., Толочко Т.А., Литвин А.В. и др. Кариологический статус буккальных эпителиоцитов шахтеров с профессиональными легочными патологиями // *Гигиена и санитария*. 2018. Т. 97. № 3. С. 220–225.
 29. Kvitko K., Bandinelli E., Henriques J.A.P. et al. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining // *Genet. Mol. Biol.* 2012. V. 35. № 4. P. 1060–1068.
 30. Cabarcas-Montalvo M., Olivero-Verbel J., Corrales-Aldana H. Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia // *Sci. Total Environment*. 2012. V. 416. P. 208–214.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.080>
 31. Минина В.И., Дружинин В.Г., Головина Т.А. и др. Динамика уровня хромосомных aberrаций у жителей промышленного города в условиях изменения загрязнения атмосферы // *Экол. генетика*. 2014. Т. 12. № 3. С. 60–68.
<https://doi.org/10.17816/ecogen12360-70>

Complex Approach to Evaluation of Genotoxicity of Occupational Factors in Coal Mining Industry

A. V. Meyer^{a,*}, T. A. Tolochko^a, V. I. Minina^b, A. A. Timofeeva^b, and A. V. Larionov^a

^aKemerovo State University, Kemerovo, 650000 Russia

^bFederal State Budget Scientific Institution The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, 650099 Russia

*e-mail: shapo-alina@yandex.ru

The level of cytogenetic damage was studied using the methods of counting chromosomal aberrations (CAs) and DNA-comet assay in lymphocytes, as well as micronucleus test in buccal epithelial cells (MN in BEC) in coal miners ($N = 116$) and control sample ($N = 169$). Significant increase of the main indicators in performed tests were found in coal miners group against the comparison group, the level of chromosomal aberrations was 4.69 ± 0.28 and $2.13 \pm 0.10\%$, DNA comets tail proportion (%) was 4.33 ± 0.38 and $2.16 \pm 0.24\%$, the level of micronucleus (MN) was 1.44 ± 0.21 and $0.23 \pm 0.12 \text{ ‰}$ respectively ($p < 0.05$). Also, for the occupational group, a significant increase in the level of additional indicators was noted: for CAs, the frequencies of single fragments, chromatid-type aberrations, acentric fragments, dicentric without fragments, chromosome interchanges and chromosome-type aberrations; for DNA comets assay – tail moment and the Olive tail moment; for MN in BEC, frequencies of binucleated cells, cells with nuclear incision, doubled nucleus, karyorhexis, and apoptotic bodies. The ranking of the results concerning with the most cytogenetic damage types showed that in miners group, the proportion of persons with a value of the indicator above the background for CAs was 68.97%, for DNA comets – 52.13%, for MN in BEC – 36.08%. The proportion of persons with a value of cytogenetic damage above background in three test systems at the same time was 20% of the total sample of miners. To assess the mutagenic effects of industrial factors of coal mining enterprises, it seems appropriate to use a complex of test systems (CA method, DNA comets and MN test in the buccal epithelium).

Keywords: miners, coal industry, chromosomal aberrations, DNA comet assay, micronucleus assay, buccal epithelial cells.