

© В. П. Волобаев,
М. Ю. Синицкий, Ю. Е. Кулемин
ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»

Изучено генотоксическое воздействие воспалительных заболеваний — антракосиликоза (АС) и хронического пылевого бронхита (ХПБ) — на шахтеров. В группу эксперимента включены 90 шахтеров с диагнозами ХПБ и АС, и еще 26 человек без профессиональных заболеваний составили контроль 2. В качестве контроля 1 использована кровь 124 мужчин, не работающих в шахтах. Выявлено, что у шахтеров повышена частота aberrаций хромосомного и хроматидного типов, а частота хромосомных обменов была выше у шахтеров с легочными патологиями. Обнаружено влияние генов *XpD* и *XpG* на уровень хромосомных aberrаций у шахтеров, а также влияние гена *XpG* на легочную профессиональную заболеваемость.

✿ **Ключевые слова:** хромосомные aberrации; шахтеры; уголь; антракосиликоз; хронический пылевой бронхит; репарация ДНК.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ШАХТЕРОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ С ЛЕГОЧНЫМИ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *XpD* И *XpG*

ВВЕДЕНИЕ

Работа в угольных шахтах, несмотря на все достижения современной науки и техники, остается одной из самых опасных для здоровья. Она сопряжена с длительным контактом с различными вредными профессиональными факторами, которые способствуют повышению не только риска различных хронических профессиональных заболеваний, но и генотоксическому риску. Повреждения ДНК, возникающие в результате генотоксического воздействия, могут быть зарегистрированы на хромосомном уровне с помощью методики учета хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови. Если исследования проблемы увеличения уровня хромосомных aberrаций у работников угольных шахт в мировой литературе хоть и в незначительном количестве, но встречаются, то их связь с профессиональной заболеваемостью, и в частности с воспалительными заболеваниями дыхательной системы, мало изучена, а имеющиеся данные достаточно противоречивы (Müller, 2004; Ulker, 2008). В связи с этим представляется актуальным провести цитогенетическое исследование выборок работников угольных шахт Кузбасса, страдающих профессиональными легочными патологиями. Кроме того, известно, что полиморфные варианты генов репарации ДНК могут модифицировать уровень цитогенетических повреждений, в связи с чем была поставлена задача исследовать корреляцию некоторых вариантов генов репарации ДНК с уровнем цитогенетических повреждений в целом у шахтеров и у шахтеров, страдающих отдельными заболеваниями. Для проведения исследования выбраны аллели генов *XpGAsp1104His* и *XpDLys751Gln*. *XpG* — эндонуклеаза, которая осуществляет вырезание поврежденного участка ДНК с 3'-конца цепи. *XpG* взаимодействует с комплексом ТФПН, обеспечивающим прикрепление хеликаз и правильное расплетание цепей ДНК, делая их доступными для действия эндонуклеаз. Замена *XpGAsp1104His* располагается вблизи СООН — концевой домена белка на участке, взаимодействующем с другими белками ЭРН, и может существенно изменить его способность взаимодействовать с ними. *XpD* — АТФ-независимая хеликаза. В составе ТФПН комплекса *XpD* раскручивает цепь ДНК, обеспечивая доступ эндонуклеаз к поврежденному участку. Аминокислотная замена Lys751Gln меняет конфигурацию белка и может влиять на взаимодействие с хеликазой р 44. В ряде исследований было показано значение данных нуклеотидных замен при оценке частоты цитогенетических нарушений (Benhamou, 2002; Ito S., 2007).

Проведение исследований в этой области позволит выработать профилактический комплекс мер, направленный на сохранение здоровья шахтеров и снижение уровня профессиональной заболеваемости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужила венозная кровь 116 шахтеров мужского пола, работающих в угольных шахтах Кемеровской области. В экспериментальную группу были включены шахтеры с диагнозами «хронический пылевой бронхит» (ХПБ) — 64 человека и «антракосиликоз» (АС) — 26 человек. Здоровые шахтеры были вынесены во вторую группу контроля — 26 человек.

Поступила в редакцию 19.04.2015
Принята к публикации 07.12.2015

Средний возраст в экспериментальной группе составил $54,98 \pm 4,36$ года, средний стаж работы в условиях угольных шахт — $28,18 \pm 4,55$ года. Средний возраст работников угольных шахт, не страдающих профессиональными заболеваниями составил $52,44 \pm 6,37$ года, при среднем стаже $23,08 \pm 10,97$ года. В качестве первого контроля были исследованы 124 образца крови здоровых доноров мужского пола, незанятых на предприятиях угольного цикла и не контактирующих с другими генотоксическими веществами в своей профессиональной деятельности (доноры Кемеровского областного центра крови), средний возраст доноров составил $50,92 \pm 4,55$ года. В исследования включались лица, не проходившие рентгенологическую диагностику в течение трех месяцев до взятия крови, не болеющие инфекционными и онкологическими заболеваниями на момент забора материала.

Культивировали лимфоциты периферической крови, полученной из локтевой вены шахтеров. В культуральный флакон помещали 0,5 мл крови, 0,1 мл фитогемагглютинина («ПанЭко», Россия), 6 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 1,5 мл эмбриональной телячьей сыворотки. Длительность культивирования составляла 48 часов. Затем в культуры добавлялся колхицин до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, флаконы помещали в термостат еще на 2 часа. По окончании цикла культивирования препараты центрифугировали 10 минут на 1000 оборотах, надосадок убирали, осадок ресуспендировали и помещали в гипотонический рас-

твор 0,55 М KCl на 10–15 минут (37 °С). Фиксацию материала проводили в трех сменах охлажденного свежеприготовленного фиксатора Карнуа (метанол и уксусная кислота в соотношении 3:1). Клеточную суспензию раскатывали на чистые, охлажденные, смоченные водой предметные стекла. Препараты шифровали и окрашивали 2 % раствором красителя Гимза.

Учет ХА проводили под световым микроскопом при увеличении 1000 раз в присутствии масляной иммерсии без кариотипирования. Отбор метафазных пластинок, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям (Hungerford, 1969).

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 7.0 при помощи блока непараметрической статистики. Для проверки соответствия распределения данных нормальному использовали тест Колмогорова–Смирнова. Сравнение групп осуществляли с помощью рангового U-теста Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения ХА у работников угольных шахт, страдающих профессиональными патологиями, а также контрольных групп, представлены в таблице 1.

При оценке уровня цитогенетических нарушений в экспериментальной группе по сравнению с контролем 1 были выявлены некоторые закономерности: количество абер-

Таблица 1

Результаты цитогенетических исследований

	Экспериментальная группа (шахтеры страдающие легочными профзаболеваниями) $\mu \pm SD$	Контроль 1 (Популяционный контроль), $\mu \pm SD$	Контроль 2 (Здоровые шахтеры), $\mu \pm SD$
Количество аберраций на 100 клеток	$5,72 \pm 2,55^*$	$1,13 \pm 1,00$	$5,48 \pm 2,16$
Одинарные фрагменты	$3,72 \pm 2,15^*$	$0,81 \pm 0,79$	$4,15 \pm 1,91$
Хроматидные обмены	$0,12 \pm 0,25^*$	$0,002 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,20$
Аберрации хроматидного типа	$3,80 \pm 2,18^*$	$0,79 \pm 0,79$	$4,21 \pm 1,88$
Парные фрагменты	$1,33 \pm 0,95^*$	$0,27 \pm 0,42$	$1,05 \pm 0,79$
Кольцевые хромосомы	$0,10 \pm 0,20^*$	$0,01 \pm 0,10$	$0,03 \pm 0,13$
Дицентрические хромосомы	$0,22 \pm 0,39^*$	$0,03 \pm 0,15$	$0,09 \pm 0,22^{**}$
Атипичные моноцентрики	$0,13 \pm 0,31^*$	$0,004 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,10$
Хромосомные обмены	$0,39 \pm 0,60^*$	$0,04 \pm 0,16$	$0,21 \pm 0,35^{**}$
Аберрации хромосомного типа	$1,79 \pm 1,02^*$	$0,31 \pm 0,54$	$1,26 \pm 0,88^{**}$

* — значимые различия группой контроля 1 ($p < 0,01$), ** — значимые различия с экспериментальной группой ($p < 0,05$)

раций на 100 клеток было достоверно выше в выборке работников угольных шахт, страдающих легочной патологией, наблюдалось увеличение общего количества aberrаций как хроматидного, так и хромосомного типа у больных шахтеров, а также уровня хромосомных обменов. Аналогичные результаты были получены в работе исследователей из Чехии (Smerhovsky et al., 2001) и Турции (уровень aberrаций на 100 клеток у работников угольных шахт был практически равен значению данного показателя в нашем исследовании — $5,82 \pm 0,87\%$) (Donbak et al., 2005). В работе исследователей из Перу (Santa-Maria et al., 2007) было обнаружено достоверное превышение частоты одиночных и парных фрагментов в группе шахтеров, однако данные показатели были ниже, чем их аналоги, полученные нами для контрольной группы. Это можно объяснить слишком маленькой экспериментальной выборкой (8 человек), изученной в исследовании.

Чтобы выявить вклад воспалительного процесса в общий уровень хромосомных повреждений в нашем исследовании, мы сравнили экспериментальную выборку с контролем 2, представленным здоровыми стажированными шахтерами. В экспериментальной группе было обнаружено повышение уровня хромосомных обменов при значимости $p < 0,01$, а также увеличение количества дицентрических хромосом и aberrаций хромосомного типа в общем при уровне значимости $p < 0,05$. Таким образом, в нашей работе было выявлено влияния воспалительного процесса как на уровень aberrаций хромосомного типа в общем, так и на отдельные типы aberrаций. В работе Ulker et al. (2008) также были получены данные о влиянии профессиональных воспалительных легочных заболеваний на уровень цитогенетических повреждений. При сравнении уровня сестринских хроматидных обменов и микроядер лимфоцитов периферической крови у лиц, страдающих пневмокозиозом (ПК), по сравнению со здоровыми шахтерами найдено достоверное увеличение уровня вышеуказанных цитогенетических маркеров у больных работников шахт.

При исследовании спектра хромосомных aberrаций у шахтеров в зависимости от генотипов *XpGAsp1104His*, *XpDLys751Gln* установлено, что в группе шахтеров частота aberrантных метафаз статистически значимо выше у обладателей генотипов *XpGHis/His* ($6,45 \pm 0,52\%$) по сравнению с *XpGAsp/His* ($4,9 \pm 0,42\%$, $p = 0,039$), а также генотипов *XpDGln/Gln* ($6,32 \pm 0,34\%$) по сравнению с *XpDLys/Lys* ($4,47 \pm 0,45\%$, $p = 0,005$).

В исследовании взаимосвязи генов *XpG* и *XpD* на наличие профессиональных заболеваний обнаружено, что аллель гена *XpGAsp1104His* ассоциирован с ХПБ и АС. Частота ХПБ была превышена у гомозигот *Asp/Asp* (наблюдаемый уровень *Asp/Asp* был больше ожидаемого на $10,2\%$, $p = 0,018$, $df = 2$), а у носителей гомозиготного аллеля *His/His*, напротив, частота ХПБ была понижена (наблюдаемый уровень *His/His* был меньше ожидаемого на $12,78\%$, $p = 0,018$, $df = 2$), при этом у гетерозигот

наблюдаемые частоты соответствовали ожидаемым. Частота АС была также превышена у гомозигот *Asp/Asp* (наблюдаемый уровень *Asp/Asp* был больше ожидаемого на $32,8\%$, $p = 0,006$, $df = 2$), а у гетерозигот и гомозигот *His/His* наблюдаемые частоты соответствовали ожидаемым. Данные закономерности можно объяснить тем, что варианты аллели данных генов кодируют ферменты со сниженной способностью к эксцизионной репарации нуклеотидов, что способно приводить к накоплению хромосомных нарушений.

ВЫВОДЫ

Частота хромосомных нарушений у шахтеров выше, чем в группе сравнения, что свидетельствует о генотоксическом характере воздействия производственной среды. Получены данные о модифицирующем влиянии профессиональных воспалительных легочных заболеваний работников угольных шахт на уровень некоторых хромосомных aberrаций. Выявлена взаимосвязь генов *XpG* и *XpD* с цитогенетическим статусом шахтеров, что можно объяснить тем, что варианты аллели данных генов кодируют ферменты со сниженной способностью к эксцизионной репарации нуклеотидов. Кроме того, была показана ассоциация гена *XpGAsp1104His* с легочными профессиональными заболеваниями.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 2015/2162.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benhamou S., Sarasin A. (2002) ERCC2/XPD polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis*. V. 17: P. 463–9.
2. Donbak L., Rencuzogullar E., Yavuz A., Topaktas M. 2005. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutation Research*. 588: 82–87.
3. Hungerford P.A. (1965) Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain Techn.* 40: 333–338.
4. Kuraoka I., Chymkowitz P. et al. (2007) XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell*. V. 26: P. 231–243.
5. Müller W.U., Kryscio A., Streffer C. (2004) Micronuclei in lymphocytes of uranium miners of the former Wismut SDAG. *Cytogenet Genome Res.* 104 (1–4): 295–298.
6. Santa-Maria S., Arana M., Ramirez O. (2007) Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes. *Genetics and Molecular Biology*. V 30 (4): 1135–1138.
7. Smerhovsky Z., Landa K., Rössner P., Brabec M., Zudova Z., Hola N., Pokorna Z., Mareckova J., Hurycho

va D. (2001) Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environ Health Perspect.* 109: 41–45.

8. Ulker O. C., Ustundag A., Duydu Y., Yucesoy B., Karakaya A. (2008) Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey. *Environ Mol Mutagen.* 49 (3): 232–7.

CYTOGENETIC STATUS IN COAL-MINERS WITH OCCUPATIONAL PULMONARY DISEASES AND INFLUENCE THE POLYMORPHISMS OF *XPD* AND *XPG* GENES

Volobaev V. P., Sinitsky M. Y., Kulemin Y. E.

✿ **SUMMARY:** *Background.* Coal-miners are exposed by various harmful factors (chemical agents, ionizing radiation, heavy metals,

coal dust). Occupational pulmonary diseases may affect to the level of genotoxic damages. *Materials and methods.* Venous blood samples extracted from 90 coal-miners with various occupational pulmonary diseases and 26 healthy coal-miners (control 1). Blood samples obtained from 124 non-exposed men were used as the control 2. Assessment of cytogenetic damages was performed using the analysis of chromosome aberrations. PCR and gel electrophoresis were used to determine polymorphisms in the genes *XpD*(rs13181) and *XpG*(rs17655). *Results.* We found a significant increase in the frequency of the chromatid- and chromosome-type aberrations in coal-miners and the increase of the chromosomal interchange in miners with occupational pulmonary diseases. The modify effects of polymorphisms in the *XpD* and *XpG* genes to the level of chromosome aberrations were discovered. *Conclusions.* It was shown that the *XpD* and *XpG* genes can be used as potential molecular genetic markers of increased individual risk of occupational pulmonary diseases.

✿ **KEYWORDS:** chromosome aberrations; coal-miners; lung diseases; DNA-reparation.

✿ Информация об авторах

Волобаев Валентин Павлович — аспирант, биологический факультет, кафедра генетики. ФГБОУ ВПО Кемеровский государственный университет. 650043, Кемерово, ул. Красная, д. 6. E-mail: kitsuneoni42@gmail.com.

Синицкий Максим Юрьевич — аспирант, биологический факультет, кафедра генетики. ФГБОУ ВПО Кемеровский государственный университет. 650043, Кемерово, ул. Красная, д. 6. E-mail: max-sinitsky@rambler.ru.

Кулемин Юрий Евгеньевич — аспирант, биологический факультет, кафедра генетики. ФГБОУ ВПО Кемеровский государственный университет. 650043, Кемерово, ул. Красная, д. 6. E-mail: jura.kulemin@gmail.com.

Volobaev Valentin Pavlovich — PhD student, biological faculty, department of Genetics. Kemerovo State University. 650043, Krasnaya St., 6. E-mail: kitsuneoni42@gmail.com.

Sinitskiy Maksim Yur'yevich — PhD student, biological faculty, department of Genetics. Kemerovo State University. 650043, Krasnaya St., 6. E-mail: max-sinitsky@rambler.ru.

Kulemin Yuriy Evgen'yevich — PhD student, biological faculty, department of Genetics. Kemerovo State University. 650043, Krasnaya St., 6. E-mail: jura.kulemin@gmail.com.