

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

Изучены ассоциации уровня микроядер (МЯ) и других цитогенетических нарушений у 129 работников угольных шахт с различными полиморфными вариантами генов репарации двойных разрывов ДНК — *Lig4 Thr91Le* и *XRCC4 G1394T*. Установлено, что носители генотипа *Le/Le* гена *Lig4* характеризуются повышенной частотой клеток с МЯ и клеток с протрузиями по сравнению с генотипами *Thr/Thr* и *Thr/Le*. Данный ген потенциально может служить маркерным для определения индивидуальной чувствительности работников угольных шахт к комплексу вредных факторов, сопутствующих производству.

✿ **Ключевые слова:** цитогенетика; микроядерный тест; уголь; генотипирование; репарация.

ЧАСТОТА МИКРОЯДЕР В ЛИМФОЦИТАХ ШАХТЕРОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДВОЙНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

ВВЕДЕНИЕ

Уголь — один из наиболее распространенных полезных ископаемых, служащих для получения энергии. Россия занимает 6-е место в мире по добыче угля и 1-е место по его запасам. Работники угледобывающих предприятий, помимо риска развития различных профессиональных заболеваний, подвергаются также воздействию целого комплекса генотоксических факторов, способных оказать серьезное влияние на организм. В воздухе выработок отмечается наличие полициклических ароматических углеводородов, тяжелых металлов и радона. Частицы угольной пыли, являющиеся переносчиками радионуклидов, попадают в легкие шахтеров, создавая источники внутреннего облучения. Степень генетических повреждений в результате воздействия генотоксикантов на организм человека зависит от эффективности функционирования репаративных систем. Оценка полиморфных вариантов генов репарации ДНК позволяет определить индивидуальную чувствительность обследуемого к комплексу генотоксических факторов и снизить риски путем составления индивидуальных рекомендаций для каждого работника. Несмотря на актуальность данной проблемы как для России, так и для других угледобывающих стран, исследование уровня цитогенетических повреждений у шахтеров в нашей стране не проводилось, а в мировой литературе встречаются довольно ограниченные и противоречивые результаты (Donbak et al., 2005; Kvitko et al., 2012; León-Mejía et al., 2011; León-Mejía et al., 2014; Rohr et al., 2013).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследований послужила венозная кровь 129 работников угольных шахт Кемеровской области. Средний возраст в выборке составил 53 года, средний стаж работы на угледобывающих предприятиях — 26 лет. Лица, на момент участия в обследовании страдающие онкологическими и инфекционными заболеваниями, принимающие лекарственные препараты, обладающие подтвержденным мутагенным эффектом, а также проходившие рентгенологические процедуры за 3 месяца до сбора материала, исключались из исследования. Каждый обследуемый подписывал протокол информированного согласия на участие в эксперименте. Все исследования были выполнены в соответствии с требованиями этического комитета Кемеровского государственного университета.

Оценку степени повреждения ДНК проводили с помощью микроядерного теста в лимфоцитах периферической крови, культивируемой в условиях цитокинетического блока (Fenech, 1993). В каждый культуральный флакон, содержащий 3,8 мл культуральной среды, добавляли 200 мкл венозной крови и 30 мкг фитогемагглютина («ПанЭко», г. Москва) и культивировали 44 часа при температуре 37 °С. Далее в каждый флакон вносили 24 мкл цитохалазина Б («ПанЭко», г. Москва) и культивировали еще 24 часа. После окончания культивирования препараты обрабатывали гипотоническим раствором КС1 и фиксировали (с использованием фиксатора Карнуа). Затем проводили окрашивание с помощью 2%-го раствора красителя Гимза («ПанЭко», г. Москва)

Поступила в редакцию 19.04.2015
Принята к публикации 07.12.2015

и анализировали препараты с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i при увеличении $\times 1000$ (Ингель, 2006). Критерии отбора лимфоцитов, включаемых в анализ, а также критерии регистрируемых цитогенетических повреждений соответствовали общепринятым рекомендациям (Fenech, 2000). На каждом препарате анализировали ядра 1000 лимфоцитов, в которых отмечались микроядра (МЯ), нуклеоплазменные мосты и ядерные протрузии.

Выделение геномной ДНК из лимфоцитов проводили с использованием стандартного метода фенол-хлороформной экстракции.

Для определения полиморфных вариантов генов репарации ДНК проводили аллель-специфическую End-Point ПЦР с использованием наборов НПФ «Литех» (г. Москва).

Статистическая обработка результатов исследования была проведена в программе STATISTICA 7.0. Распределение частот цитогенетических повреждений сравнивали с нормальным (с помощью теста Колмогорова—Смирнова). На основании этого в дальнейшем использовали методы непараметрической статистики — ранговый U-тест Манна—Уитни для парного сравнения групп и тест Краскела—Уоллиса для сравнения 3 групп (Закс, 1976).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве кандидатных генов в данном исследовании были использованы гены репарации двунитевых разрывов ДНК *Lig4 Thr9Ile* и *XRCC4 G1394T*. Данный выбор обусловлен литературными данными о том, что ведущую роль в образовании МЯ играют именно двунитевые разрывы ДНК (Fenech et al., 2011). Кроме того, частоты встречаемости аллелей изученных генов в популяции достаточно высоки, что позволяет обнаруживать в выборках достаточное (для проведения ассоциативных исследований) количество всех полиморфных вариантов данных генов.

В результате учета цитогенетических повреждений у шахтеров нами было установлено, что главный показатель — количество двуядерных лимфоцитов с МЯ

в нашем опыте составил 11,16 ‰, что несколько выше аналогичных показателей, полученных другими исследователями. Так, в исследовании ученых из Колумбии количество лимфоцитов с МЯ составило 8,6 ‰ (León-Mejía et al., 2011), ученых из Бразилии — 7,46 ‰ (Rohr et al., 2013). В работе турецких исследователей, напротив, был получен результат, более чем вдвое превышающий показатель, отмеченный в нашей работе, — 27,17 ‰ (Donbak et al., 2005). Таким образом, имеющиеся данные о частотах цитогенетических повреждений, регистрируемых у шахтеров с помощью микроядерного теста, очень ограничены и противоречивы, что обуславливает необходимость проведения дополнительных исследований в данной области.

Анализ уровня цитогенетических повреждений у носителей различных аллелей гена *Lig4 Thr9Ile* показал ряд статистически достоверных различий (табл. 1).

Таким образом, носители гомозигот по минорному аллелю гена *Lig4 Thr9Ile* характеризовались повышенной частотой ряда цитогенетических повреждений. МЯ образуются из ацентрических хромосомных и хроматидных фрагментов, появляющихся в клетке в результате дефектов ферментов репарации двойных разрывов (Fenech et al., 2011). Обнаруженное превышение уровня лимфоцитов с МЯ у носителей генотипа Ile/Ile, вероятно, связано с пониженной активностью фермента ДНК-лигазы IV, катализирующей окончательный этап негомологичного соединения двунитевых разрывов. Возникновение протрузий связывают с воздействием на клетку ионизирующей радиации — в ряде исследований отмечалось наличие белкового комплекса RAD51 в данных цитогенетических аномалиях (Fenech et al., 2011). Полученные нами результаты могут свидетельствовать о повышенной чувствительности к экспозиции радоном шахтеров с генотипом Ile/Ile.

Следует отметить, что сопоставить полученные результаты с литературными данными не представляется возможным, так как на настоящий момент отсутствуют работы, посвященные оценке уровня цитогенетических

Таблица 1

Количество двуядерных лимфоцитов ($m \pm SE$, ‰) у носителей различных генотипов по гену *Lig4 Thr9Ile*

Генотип, признак	Thr/Thr	Thr/Ile	Ile/Ile
2-яд. лимфоциты с 1 МЯ	9,93 \pm 0,38	9,03 \pm 0,61	12,07 \pm 0,98 ^a
2-яд. лимфоциты с 2 МЯ	1,01 \pm 0,38	0,41 \pm 0,12	1,07 \pm 0,25 ^b
Всего 2-яд. лимфоцитов с МЯ	11,16 \pm 0,44	9,69 \pm 0,67	13,21 \pm 1,05 ^c
2-яд. лимфоциты с протрузиями	13,28 \pm 0,62	11,41 \pm 0,75	14,43 \pm 1,30 ^d

^a — достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с носителями генотипов Thr/Thr ($p = 0,21$), Thr/Ile ($p = 0,024$); ^b — достоверное различие по сравнению с носителями генотипа Thr/Ile ($p = 0,033$); ^c — достоверное различие по сравнению с носителями генотипа Thr/Ile ($p = 0,039$); ^d — достоверное различие по сравнению с носителями генотипа Thr/Ile ($p = 0,020$)

маркеров у работников угольных шахт с различными полиморфными вариантами генов репарации двунитевых разрывов ДНК.

Значимых различий по уровню цитогенетических повреждений у носителей различных генотипов по гену *XRCC4* G1394T выявлено не было.

Кроме того, не было получено значимых различий по частоте лимфоцитов с нуклеоплазменными мостами у носителей различных полиморфных вариантов генов репарации двунитевых разрывов ДНК.

ВЫВОДЫ

Носители генотипа Ile/Ile по гену *Lig4* Thr9Ile обладают повышенной чувствительностью к воздействию генотоксических факторов в угольных шахтах. Данный ген потенциально может служить маркерным и, наряду с другими генами, быть включенным в биологическую тест-систему для определения индивидуальной чувствительности шахтеров к комплексу неблагоприятных факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Закс Л. (1976) Статистическое оценивание. М.: Статистика.
2. Ингель Ф. И. (2006) Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть I. Пролiferация клеток. Экологическая генетика. Т. 3 (3): С. 7–19.
3. Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*. V. 285: P. 35–44.
4. Fenech M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. V. 455: P. 81–95.
5. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T. et al. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. V. 26: P. 125–132.
6. Donbak L., Rencuzogullari E., Yavuz A., Topaktas M. (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutation Research*. V. 588: P. 82–87.
7. Kvitko K., Bandinelli E., Henriques J. et al. (2012) Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Genetics and Molecular Biology*. V. 35: P. 1060–1068.
8. León-Mejía G., Espitia-Pérez L., Hoyos-Giraldo L. S. et al. (2011) Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Science of the Total Environment*. V. 409: P. 686–691.

9. León-Mejía G., Quintana M., Debastiani R. et al. (2014) Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V. 107: P. 133–139.
10. Rohr P., Kvitko K., da Silva F. R. et al. (2013) Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal. *Mutation Research*. V. 758: P. 23–28.

THE ASSESSMENT OF MICRONUCLEUS FREQUENCY IN LYMPHOCYTES IN THE COHORT OF COAL-MINERS CHARACTERIZED BY DIFFERENT POLYMORPHISMS OF DOUBLE STRAND BREAK REPARATION GENES

Sinitsky M. Yu., Volobaev V. P., Asanov M. A.

✿ **SUMMARY:** *Background:* Coal-miners are exposed to a lot of number of harmful factors (chemical agents, ionizing radiation, heavy metals, coal dust etc.). *Material and methods:* Venous blood samples extracted from 129 coal-miners. Assessment of cytogenetic damage was performed using the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) on peripheral blood lymphocytes. PCR and gel electrophoresis were used to determine polymorphisms in the genes *Lig4* (rs1805388) and *XRCC4* (rs6869366). *Results:* We found a significant increase in the frequency of binucleated lymphocytes with micronuclei (MN) and protrusions in carriers of the Ile/Ile genotype of the *Lig4* gene Thr9Ile polymorphism in comparison to Thr/Thr and Thr/Ile genotypes. *Conclusions:* Thr9Ile polymorphism within *Lig4* gene can be used as potential molecular genetic markers of increased individual susceptibility to the complex of harmful factors in coal-mining conditions.

✿ **KEYWORDS:** cytogenetics; micronucleus assay; coal; genotyping; DNA-reparation.

REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Zaks L. (1976) Statisticheskoe otsenivanie [Statistical evaluation]. M.: Statistika.
2. Ingel' F. I. (2006) Perspektivy ispol'zovaniya mikroyadernogo testa na limfotsitakh krovi cheloveka, kul'tiviruemykh v usloviyakh tsitokineticeskogo bloka. Chast' I. Proliferatsiya kletok. Ekologicheskaya genetika. T. 3 (3): S. 7–19.
3. Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*. V. 285: P. 35–44.
4. Fenech M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. V. 455: P. 81–95.
5. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T. et al. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. V. 26: P. 125–132.
6. Donbak L., Rencuzogullari E., Yavuz A., Topaktas M. (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutation Research*. V. 588: P. 82–87.
7. Kvitko K., Bandinelli E., Henriques J. et al. (2012) Susceptibility to DNA damage in workers occupationally

- exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Genetics and Molecular Biology*. V. 35: P. 1060–1068.
8. León-Mejía G., Espitia-Pérez L., Hoyos-Giraldo L. S. et al. (2011) Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Science of the Total Environment*. V. 409: P. 686–691.
9. León-Mejía G., Quintana M., Debastiani R. et al. (2014) Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V. 107: P. 133–139.
10. Rohr P., Kvitko K., da Silva F.R. et al. (2013) Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal. *Mutation Research*. V. 758: P. 23–28.

✪ Информация об авторах

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.

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

Асанов Максим Айдарович — студент 5-го курса, биологический факультет, кафедра генетики. ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет». 650043, Кемерово, ул. Красная, д. 6. E-mail: asmaks988@gmail.com.

Sinitsky Maxim Yur'yevich — PhD student, Biology Faculty, Department of Genetics, Kemerovo State University. 650043, Kemerovo, Krasnaya St., 6. E-mail: max-sinitsky@rambler.ru.

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

Asanov Maxim Aydarovich — Student, Biology Faculty, Department of Genetics, Kemerovo State University. 650043, Kemerovo, Krasnaya St., 6. E-mail: asmaks988@gmail.com.