

Мейер А.В.<sup>1</sup>, Толочко Т.А.<sup>1</sup>, Литвин А.В.<sup>1</sup>, Минина В.И.<sup>2</sup>, Кулемин Ю.Е.<sup>1,2</sup>

## КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ШАХТЁРОВ С ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ ЛЁГОЧНЫМИ ПАТОЛОГИЯМИ

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» Минобрнауки России, 650043, Кемерово;

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, 650000, Кемерово

**Введение.** Угольная пыль является основным флогогенным фактором развития хронического пылевого бронхита у шахтёров. Функциональная активность буккального эпителия в значительной степени определяет реактивность организма и модулирует развитие патологического процесса.

**Материал и методы.** У 49 шахтёров (средний возраст  $51,08 \pm 0,51$  лет), имеющих в анамнезе хронический пылевой бронхит, 55 шахтёров (средний возраст  $50,96 \pm 0,37$  лет), не имеющих профессиональных заболеваний, и 52 мужчин контрольной группы (средний возраст  $50,61 \pm 3,27$  лет) с использованием микроядерного теста определены частоты встречаемости буккальных эпителиоцитов с микроядрами, ядерными протрузиями «пузырёк», «битое яйцо», «язык», а также двуядерных клеток и клеток со сдвоенным ядром.

**Результаты.** Для группы шахтёров без профзаболеваний частота встречаемости клеток с микроядрами и сдвоенными ядрами составила  $0,73 \pm 0,99\%$  и  $4,25 \pm 3,75\%$ , для контрольной группы  $0,31 \pm 0,53\%$  ( $p = 0,0384$ ) и  $2,89 \pm 2,76\%$  ( $p = 0,0195$ ) соответственно. Значимые отличия для группы шахтёров с хроническим пылевым бронхитом относительно шахтёров без профзаболеваний установлены по следующим ядерным аномалиям: микроядро ( $1,69 \pm 1,29\%$ ;  $0,73 \pm 0,99\%$ ;  $p = 0,0384$ ), протрузия «пузырёк» ( $2,43 \pm 2,08\%$ ;  $1,20 \pm 1,51\%$ ;  $p = 0,7175$ ), суммарная частота протрузий ( $3,67 \pm 2,88\%$ ;  $1,81 \pm 2,01\%$ ;  $p = 0,0001$ ), двуядерность ( $5,51 \pm 4,28\%$ ;  $3,85 \pm 4,01\%$ ;  $p = 0,0129$ ) и сдвоенное ядро ( $7,43 \pm 4,45\%$ ;  $4,25 \pm 3,75\%$ ;  $p < 0,0001$ ).

**Обсуждение.** Значимых ассоциаций уровня ядерных аномалий со стажем работы и наличием вредной привычки (курение) ни в одной из обследованных групп не выявлено.

**Заключение.** Таким образом, производственные факторы подземной угледобычи индуцируют кластогенные и анеугенные эффекты; усугубление гипоксии, связанное с нарушением функций внешнего дыхания, воздействием медиаторов воспаления и нарушением редокс-гомеостаза значительно повышают частоту кариологических повреждений в буккальных эпителиоцитах.

Ключевые слова: уголь; профессиональные заболевания; хронический пылевой бронхит; повреждения ДНК; микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах.

**Для цитирования:** Мейер А.В., Толочко Т.А., Литвин А.В., Минина В.И., Кулемин Ю.Е. Кариологический статус буккальных эпителиоцитов шахтёров с профессиональными лёгочными патологиями. Гигиена и санитария. 2018; 97(3): 220-225. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-3-220-225>

**Для корреспонденции:** Мейер Алина Викторовна, канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры генетики ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». E-mail: shapo-alina@yandex.ru

Meyer A.V.<sup>1</sup>, Tolochko T.A.<sup>1</sup>, Litvin A.V.<sup>1</sup>, Minina V.I.<sup>2</sup>, Kulemin Yu.E.<sup>1,2</sup>

## KARYOLOGICAL STATUS OF BUCCAL EPITHELIAL CELLS OF MINERS WITH OCCUPATIONAL LUNG PATHOLOGIES

<sup>1</sup>Kemerovo State University, Kemerovo, 650043, Russian Federation;

<sup>2</sup>Federal Research Center for coal and Coal Chemistry of the SB RAS, Kemerovo, 650000, Russian Federation

**Introduction.** Coal dust is the main phlogogenic factor in the development of chronic dust bronchitis in miners. The functional activity of buccal epithelium largely determines the reactivity of the body and modulates the development of the pathological process.

**Material and methods.** 49 miners (mean age of  $51.08 \pm 0.51$  years) with a history of chronic dust bronchitis, 55 miners (mean age of  $50.96 \pm 0.37$  years), without occupational diseases, and 52 men of the control group (mean age of  $50.61 \pm 3.27$  years) were examined with the use of micro-nuclear test to determine the frequency of prevalence rate of buccal epithelial cells with micronuclei, nuclear protrusion "bubble", "broken egg", "tongue", as well as binuclear cells and double-nuclei cells.

**Results.** In miners without occupational diseases, the frequency of the occurrence of cells with micronuclei and double-nuclei was  $0.73 \pm 0.99\%$  and  $4.25 \pm 3.75\%$ , for the control group -  $0.31 \pm 0.53\%$  ( $p = 0.0384$ ) and  $2.89 \pm 2.76\%$  ( $p = 0.0195$ ), respectively. Significant differences in miners with chronic dust bronchitis regarding the miners without occupational diseases were established on the following nuclear anomalies: the micronuclei ( $1.69 \pm 1.29\%$ ;  $0.73 \pm 0.99\%$ ;  $p = 0.0384$ ), protrusion "bubble" - ( $2.43 \pm 2.08\%$ ;  $1.20 \pm 1.51\%$ ;  $p = 0.7175$ ), the total frequency of protrusion ( $3.67 \pm 2.88\%$ ;  $1.81 \pm 2.01\%$ ;  $p = 0.0001$ ), binucleatedness ( $5.51 \pm 4.28\%$ ;  $3.85 \pm 4.01\%$ ;  $p = 0.0129$ ) and double-nuclei - ( $7.43 \pm 4.45\%$ ;  $4.25 \pm 3.75\%$ ;  $p < 0.0001$ ).

**Discussion.** No significant associations between nuclear anomalies with work experience and presence of harmful habits (smoking) were found in any of the examined groups.

**Conclusion.** Thus, factors of underground mining production induce clastic and aneugenic effects; worsening hypoxia, related with the deterioration of respiration functions, the influence of inflammatory mediators and impaired redox homeostasis significantly increase the frequency of karyological damage in buccal epithelial cells.

**Key words:** coal; occupational diseases; chronic dusty bronchitis; DNA damage; micronucleus test on buccal epithelial cells.

**For citation:** Meyer A.V., Tolochko T.A., Litvin A.V., Minina V.I., Kulemin Yu. E.. Karyological status of buccal epithelial cells of miners with occupational lung pathologies. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(3): 220-225. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-3-220-225>

**For correspondence:** Alina V. Meyer, assistant professor of the department of Genetics Kemerovo State University, E-mail: [shapo-alina@yandex.ru](mailto:shapo-alina@yandex.ru)

**Information about authors:** Meyer A.V., <http://orcid.org/0000-0001-9952-7854>;  
Tolochko T.A., <http://orcid.org/0000-0003-4645-7009>; Litvin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-9910-3477>;  
Minina V.I., <http://orcid.org/0000-0003-3485-9123>; Kulemin Yu.E., <https://orcid.org/0000-0003-1789-586X>.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study was supported by grants of RFFI N 16-44-420087 r\_a, N 16-44-420926 r\_a, N 18-44-420017r\_a.

Received: 15 November 2016

Accepted: 16 January 2017

## Введение

Угольная промышленность занимает ведущее место в экономике Кемеровской области, где действует более 100 предприятий, ежегодно осуществляющих добычу около 60% угля от общего объёма добычи на территории РФ. Производственные условия труда на угледобывающих предприятиях характеризуются комплексом негативных факторов (угольная пыль, радиация, оксид азота, метан, оксид углерода, сероводород, шум, вибрация и др.), оказывающих воздействие на состояние и здоровье работающего персонала. Среди вышеперечисленных факторов в качестве наиболее опасного для здоровья можно выделить угольную пыль, особенно с высоким содержанием оксида кремния [1], так как её регулярное и длительное воздействие приводит к развитию хронических профессиональных заболеваний лёгких. В Кузбассе на их долю приходится около 55% от общей профзаболеваемости. К числу заболеваний органов дыхания, связанных с поступлением угольной пыли, относятся пылевые бронхиты, пневмокониозы, бронхиальная астма, эмфизема и рак [2].

Пылевой бронхит в большинстве случаев относится к обструктивному варианту хронического бронхита, для этого заболевания характерно прогрессирующее течение при продолжительном контакте с угольной пылью, которое приводит к дыхательной недостаточности, нарушению гемодинамики и значительному снижению резистентности организма. Патогенетическое воздействие угольной пыли обусловлено образованием свободных радикалов, образующихся в результате стимуляции фагоцитов. Деструктивные изменения бронхиального дерева усугубляются гипоксическими состояниями, обусловленными сниженным содержанием кислорода в воздухе забоев и нарушением вентиляции лёгких, а также присоединением вторичного бактериального воспаления, вызванного, как правило, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* или их ассоциациями.

Эпителиальные клетки являются одними из первых мишеней воздействия угольной пыли и наряду с макрофагами, фибробластами и компонентами внеклеточного матрикса играют немаловажную роль в реализации клеточного ответа [2]. Наиболее доступными для анализа и достаточно информативными являются буккальные эпителиоциты. Буккальный эпителий, располагающийся на границе внешней и внутренней среды организма, выполняет защитную функцию, обеспечивает оральный, саливарный и системный гомеостаз, регулирует функцию иммунной системы, благодаря синтезу и секреции антимикробных пептидов дифензинов, сигнальных молекул,

таких как IL-6, 8, 18,  $\gamma$ -интерферон, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, простагландин E2, лейкотриены, эндотелины, окись азота и др. [3, 4]. Нарушение функций буккального эпителия, обусловленное формированием цитогенетических, пролиферативных и деструктивных повреждений может оказывать существенное влияние на развитие патологий, в том числе связанных с воздействием угольной пыли.

Целью исследования стало изучение с помощью микроядерного теста уровня кариологических повреждений буккальных эпителиоцитов шахтёров с наличием и отсутствием в анамнезе профессиональных лёгочных патологий.

## Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы буккального эпителия 104 шахтёров и 52 мужчин, профессиональная деятельность которых не связана с воздействием вредных производственных факторов, проживающих в городах Кемеровской области. На базе Института комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний Российской академии наук (г. Новокузнецк, Кемеровская область) были получены образцы биологического материала от 49 человек (средний возраст  $51,08 \pm 0,51$  лет), имеющих в анамнезе лёгочные профессиональные патологии (хронический пылевой бронхит), и от 55 шахтёров (средний возраст  $50,96 \pm 0,37$  лет), не имеющих профессиональных заболеваний. В контингент обследованных вошли рабочие основных профессий: проходчики, машинисты комбайнов и врубных машин, горнорабочие очистных забоев, горные мастера, горномонтажники подземные. Образцы буккального эпителия были собраны у сотрудников и преподавателей мужского пола (средний возраст  $50,61 \pm 3,27$  лет) Кемеровского государственного университета на базе Лаборатории цитогенетики ФИЦ УУХ СО РАН. Обследованные группы выровнены по возрасту и стажу работы (табл. 1), а также по типу профессиональной занятости. Все доноры подписали информированное согласие на участие в обследовании. Сбор анамнестических данных проводили путём анализа медицинских карт и устного анкетирования. В исследование не включены рабочие, проходившие рентгенодиагностические процедуры в последние 3 месяца, перенёсшие за прошедший месяц острые респираторные и инфекционные заболевания, принимающие лекарственные препараты. На момент обследования шахтёров хронический пылевой бронхит находился на стадии полной или не полной ремиссии. Характеристика групп представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика обследованных групп

Группа	n	Возраст, годы		Длительность экспозиции угольной пылью, годы	Стаж работы, годы, min-max	Курение, n	
		средний	Min-max			да	нет
Шахтёры (хронический пылевой бронхит)	49	51,08 ± 3,58	43–58	22,63 ± 3,33	14–30	23	26
Шахтёры	55	50,96 ± 2,71	44–58	22,33 ± 3,00	16–30	18	37
Контроль	52	50,61 ± 3,27	40–59	0	0	36	16

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: n – количество человек.

Цитологические препараты готовились с использованием буферного раствора по методическим рекомендациям, изложенным в работе Thomas et al. [5] 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 7,0) шпателем. В лаборатории осуществляли центрифугирование (1000 об/мин, 10 мин), аспирирование надосадка, ресуспензирование осадка (1мл), доведение объёма буферным раствором до 10 мл. После трехкратной

промывки образцы клеток раскапывали на предварительно отмытые и подогретые предметные стекла. Препараты фиксировали фиксатором Кларка (метанол и ледяная уксусная кислота (3:1)). На первом этапе окрашивание проводили ДНК-специфическим 2,5%-ным раствором ацетоорсеина (1ч., 37°C), докрашивание цитоплазмы осуществляли 1%-ным спиртовым раствором светлого зелёного (15–20 с). Анализ препаратов проводили на микроскопе Nikon E200 при увеличении 100 × 1,5 × 10.

В ходе микроядерного анализа на препаратах учитывалось 6 типов кариологических повреждений: микроядро, протрузия типа «пузырёк», протрузия типа «разбитое яйцо», протрузия типа «язык», двуядерные клетки и клетки со сдвоенным ядром. Идентификацию микроядер (МЯ), протрузий типа «пузырёк», двуядерных клеток проводили с помощью критериев, указанных в работе Thomast et al., 2009. Регистрацию таких ядерных аномалий как протрузии типа «разбитое яйцо», протрузии типа «язык», клетки со сдвоенными ядрами, двуядерность осуществляли с учётом рекомендаций Сычевой Л.П. [6]. На препаратах анализировали 1000 клеток, частоту встречаемости ядерных аномалий выражали в промилле (%).

Таблица 2

Частоты цитогенетических и пролиферативных нарушений в буккальных эпителиоцитах обследованных групп

Показатель	Группа шахтёров (m ± SD (min-max)), %, n = 55	Группа контрольная (m ± SD (min-max)), %, n = 52	p
<i>Цитогенетические показатели (m ± SD (min-max), %):</i>			
Микроядро	0,73 ± 0,99 (0–4)	0,31 ± 0,53 (0–2)	0,0384
Протрузия «пузырёк»	1,20 ± 1,51 (0–7)	0,90 ± 0,92 (0–4)	0,7175
Протрузия «битое яйцо»	0,36 ± 0,75 (0–4)	0,18 ± 0,39 (0–1)	0,4033
Протрузия «язык»	0,25 ± 0,55 (0–2)	0,13 ± 0,38 (0–2)	0,4033
Суммарная частота протрузий	1,81 ± 2,01 (0–9)	1,19 ± 1,08 (0–4)	0,2295
<i>Показатели нарушения пролиферации (m ± SD (min-max), %):</i>			
Двуядерность	3,85 ± 4,01 (0–21)	2,37 ± 1,47 (0–8)	0,0597
Сдвоенное ядро	4,25 ± 3,75 (0–22)	2,89 ± 2,76 (0–16)	0,0195

Примечание. Здесь и в табл. 3: m – средняя частота; SD – стандартное отклонение; p – уровень значимости (U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 3

Частоты цитогенетических и пролиферативных нарушений в буккальных эпителиоцитах групп шахтёров с наличием и отсутствием в анамнезе хронического пылевого бронхита

Показатель	Шахтёры (хронический пылевой бронхит) (m ± SD (min-max), %, n = 49)	Шахтёры (m ± SD (min-max), %, n = 55)	p
<i>Цитогенетические показатели (m ± SE (min-max), %):</i>			
Микроядро	1,69 ± 1,29 (0–6)	0,73 ± 0,99 (0–4)	0,0000
Протрузия «пузырёк»	2,43 ± 2,08 (0–8)	1,20 ± 1,51 (0–7)	0,0012
Протрузия «битое яйцо»	0,78 ± 1,96 (0–13)	0,36 ± 0,75 (0–4)	0,2781
Протрузия «язык»	0,47 ± 0,71 (0–3)	0,25 ± 0,55 (0–2)	0,1488
Суммарная частота протрузий	3,67 ± 2,88 (0–16)	1,81 ± 2,01 (0–9)	0,0001
<i>Показатели нарушения пролиферации (m ± SE (min-max), %):</i>			
Двуядерность	5,51 ± 4,28 (0–19)	3,85 ± 4,01 (0–21)	0,0129
Сдвоенное ядро	7,43 ± 4,45 (2–18)	4,25 ± 3,75 (0–22)	0,0000

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statsoft Statistica 8.0. Достоверность отличий средних значений анализируемых показателей между группами оценивали с использованием непараметрического критерия U-критерия Манна-Уитни. Наличие корреляций между переменными оценивали с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Критический уровень для отклонения нулевой гипотезы устанавливали при p < 0,05.

Результаты

Результаты сравнительного анализа средних значений частот встречаемости анализируемых показателей в обследованных группах представлены в табл. 2, 3.

Для группы шахтёров безлёгочных патологий относительно контрольной группы установлено значимое превышение частоты встречаемости клеток с микроядрами (p = 0,0384) и клеток со сдвоенным ядром (p = 0,0195) (см. табл. 2).

В группе шахтёров с хроническим пылевым бронхитом (см. табл. 3) установлено двукратное превышение средних значений клеток с микроядрами, протрузиями «пузырёк», а также суммарной частоты протрузий относительно группы шахтёров без профпатологий. Следует отметить, что максимальные значения частот всех анализируемых цитогенетических повреждений выше в группе шахтёров с хроническим пылевым бронхитом. Для показателей, характеризующих нарушение пролиферации, установлено значимое превышение по уровню двуядерных клеток и клеток со сдвоенными ядрами.

Дифференцированный анализ частот выявления кариологических нарушений в зависимости от наличия вредных привычек



(курение) не выявил значимых отличий ни в одной из анализируемых групп.

Корреляционный анализ между показателями микроядерного теста в группе шахтёров без лёгочных патологий выявил наличие прямой зависимости частоты встречаемости протрузий «битое яйцо» и «язык» ( $r = 0,5213$ ,  $p = 0,0013$ ), а также двоядерных клеток и клеток со сдвоенным ядром ( $r = 0,6423$ ,  $p = 0,000$ ). Кросс-анализ кариологических показателей в объединённой выборке шахтёров прямую корреляцию между показателями нарушения пролиферации ( $r = 0,4101$ ,  $p = 0,0008$ ).

Зависимости уровня цитогенетических и анеугенных нарушений от стажа работы в подземных условиях в анализируемых группах не выявлено. В то же время установлено наличие положительной связи между возрастом и частотой встречаемости клеток со сдвоенными ядрами в группе рабочих с хроническим пылевым бронхитом ( $r = 0,4984$ ,  $p = 0,0003$ ) и в контрольной выборке ( $r = 0,3624$ ,  $p = 0,0051$ ).

### Обсуждение

Для анализируемых групп наряду с оценкой генотоксических эффектов в буккальных эпителиоцитах параллельно проведено исследование частоты и спектра хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови [7]. Для мужчин контрольной группы суммарная частота хромосомных aberrаций составила 1,10% и показаны статистически значимые отличия данного показателя относительно группы здоровых шахтёров (5,48%) и группы с хроническим профессиональным пылевым бронхитом (5,72%). Из этого следует убедительное доказательство наличия мутагенных эффектов воздействия производственных факторов, связанных с подземной угледобычей. При этом значимых отличий по частоте aberrаций хроматидного типа в анализируемых группах не установлено. Относительно aberrаций хромосомного типа показано значимое превышение показателя в группе шахтёров с лёгочными профессиональными патологиями по сравнению со здоровыми рабочими шахт, главным образом, за счёт частоты выявления дицентрических хромосом. Так, в группе внутрипроизводственного контроля данный показатель составил 0,09%, у рабочих с хроническим пылевым бронхитом – 0,17%, у шахтёров с пневмококоном – 0,42%. Данные результаты свидетельствуют, что в лимфоцитах крови двойные разрывы ДНК происходят чаще в пресинтетический и синтетический периоды интерфазы.

В отличие от лимфоцитов буккальные эпителиоциты наряду с нейроэндокринными, паракринными и аутокринными воздействиями являются первичными мишенями токсических, мутагенных, термических и механических воздействий. Кроме того они характеризуются высокой скоростью обновления, а следовательно более выраженной чувствительностью к мутагенам эндо- и экзогенной природы. Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах позволяет выявить цитогенетические, пролиферативные и деструктивные изменения в клетках на стадии интерфазы. При реализации этого метода используются различные способы (способ отбора клеток (щёточка, шпатель), приготовления препаратов (мазок или раскапывание клеток после отмывания клеток в буферном растворе), окрашивания (окраска по Фельгену, Гимза, акридиновый оранжевый, ацетоорсеин)), поэтому результаты, полученные в различных лабораториях, зачастую оказываются несопоставимыми и могут быть использованы лишь для оценки направленности изменения частот анализируемых показателей. В связи с этим заключение об индукции и уровне анеугенных, цитотоксических эффектов при воз-

действии различных факторов проводится на основании сравнения собственных результатов для экспонированной и контрольной группы, полученных по унифицированной методологии.

К настоящему времени признанными биомаркерами генотоксического воздействия факторов различной природы являются микроядра, представляющие обособленные фрагменты хроматина и образующиеся в результате нарушения процесса деления базальных клеток, а именно повреждения нитей веретена деления и/или непосредственного повреждения ДНК [8]. В настоящем исследовании установлено значимое двукратное превышение частоты встречаемости микроядер в группе шахтёров без лёгочных патологий относительно группы контроля ( $p = 0,0384$ ) (см. табл. 2), что свидетельствует об индукции кластогенных эффектов в клетках эксфолиативного эпителия при экспозиции комплексом производственных факторов угледобывающих предприятий. Полученные результаты согласуются с имеющимися на настоящий момент литературными данными. В работе Leon-Mejia et al. [9] приведены результаты микроядерного анализа в группе шахтёров со стажем более 5 лет, деятельность которых связана с добычей, транспортом и переработкой угля на шахтах северного побережья Колумбии ( $n = 100$ ). Контрольную группу составили 100 человек, проживающих на той же территории, и не подвергающихся воздействию генотоксикантов в процессе профессиональной деятельности. Для группы шахтёров установлено значимое 8-кратное превышение частоты клеток с микроядрами относительно контрольной группы. Анализ уровня микроядер в базальных и дифференцированных эксфолиативных клетках шахтёров Candioti также выявил значимое превышение показателя относительно неэкспонированной группы в обеих клеточных популяциях [10]. В настоящее время в литературе имеется единичная работа по исследованию уровня кариологических аномалий буккальных эпителиоцитов работников горнодобывающих предприятий на территории Российской Федерации [11] с реализацией микроядерного метода аналогично схеме настоящего исследования. При этом в работе не установлено значимых отличий по уровню микроядер в группе горняков относительно контрольной группы.

Установленное в настоящей работе двукратное превышение уровня микроядер в группе шахтёров с хроническим пылевым бронхитом относительно внутрипроизводственного контроля может быть обусловлено повышением генотоксической нагрузки на организм вследствие нарушения функций лёгких, сопровождающегося усугублением гипоксии и развитием оксидативного стресса, а также воздействием медиаторов воспаления.

Другим, не менее важным показателем микроядерного теста является наличие протрузий, среди которых выделяют «ядерные почки» (nuclear buds) и «битые яйца» (broken eggs). Природа появления протрузий до настоящего времени до конца не изучена и является спорным вопросом. Нерсесян А. [12] выдвигает предположение, что образование протрузий вовсе не связано с кластогенным или анеугенным эффектом, а является результатом дегенеративных клеточных изменений. В то же время некоторые авторы объясняют такие ядерные аномалии как результат генотоксического воздействия [13–15], эпигенетических процессов [16] либо как результат почкования ядра во время S-фазы [17]. Почкование ядер наблюдается в клетках красного костного мозга при миелобластном лейкозе, этиология которого связана с дефицитом витамина B<sub>12</sub> и фолиевой кислоты, приводящим к задержке синтеза ДНК, но причиной останова или удлинения S-периода

может быть и репарация повреждений ДНК. Кроме этого, учитывая, что в ряде исследований показано значимое увеличение частоты ядерных протрузий при экспозиции мутагенами [18–20], следует рассматривать их формирование как результат цитогенетических нарушений. В работах Kvitko K. et al. [21] при обследовании 28 шахтёров (средний возраст  $41,93 \pm 13,55$  лет), занятых добычей и переработкой угля в шахтах Candiota и не экспонированной группы из 54 человек (средний возраст  $44,46 \pm 7,12$  лет), Rohr P. et al. [10] для группы шахтёров ( $n = 41$ ; средний возраст  $36,86 \pm 14,0$  лет) в сравнении с контрольной группой ( $n = 29$ ; средний возраст  $46,69 \pm 18,11$  лет) того же региона, а также Leon-Mejia et al. [9] были выявлены значимые превышения уровня протрузий (nuclear buds) в экспонированных группах.

В настоящем исследовании анализ трёх типов протрузий: «ядерные почки» («пузырёк»), «битое яйцо» и «язык» [22] выявил двукратное повышение частоты встречаемости протрузий типа «пузырёк», а также суммарной частоты протрузий у шахтёров с пылевым бронхитом относительно группы внутрипроизводственного контроля. Наличие положительной корреляции между протрузиями «разбитое яйцо» и «язык» свидетельствует о едином механизме их формирования.

Анеугенные эффекты в буккальных эпителиоцитах регистрируются путём учёта двуядерных клеток и клеток со сдвоенными ядрами. Формирование двуядерных клеток связывают с нарушением цитокенеза либо со слиянием двух соматических клеток, механизм образования клеток со сдвоенным ядром менее изучен. Имеется предположение, что их формирование обусловлено нарушением кариотомии [6], но возможно, что их происхождение связано с нерасхождением хромосом на стадии анафазы митоза. В таких случаях хромосомы деспирализуются и вокруг них образуется новая ядерная оболочка с формированием тетраплоидного ядра. Можно предполагать, что при образовании сдвоенных ядер отделившиеся друг от друга сестринские хромосомы окружаются собственными ядерными мембранами. Образование двуядерных клеток и клеток со сдвоенными ядрами приводит к полиплоидизации клеток, которую связывают с риском канцерогенеза, токсическими воздействиями, воспалением, инфекциями и старением [23]. Результаты исследований полиплоидных клеток миокарда, печени свидетельствуют об изменениях процессов экспрессии генов, обеспечивающих клеточный метаболизм. Так, Yen W.L., Klionsky D.J. [24] отмечают снижение активности процессов аэробного окисления углеводов и жирных кислот, активацию гликолиза и пентозофосфатного шунта, а также синтеза жирных кислот и стероидов, повышение уровня транскрипции генов ферментов протеолиза, в том числе и убиквитин-зависимого пептидолиза. Подобная реорганизация метаболических путей рассматривается как защитная реакция клетки от гипоксии и сопряжённого с ней оксидативного стресса. Более высокие значения частоты встречаемости полиплоидных клеток в группе шахтёров с лёгочными профессиональными заболеваниями и без лёгочных патологий относительно контрольной группы (см. табл. 2, 3), а также наличие прямой корреляции между частотой выявления клеток со сдвоенными ядрами и возрастом подтверждают связь данного показателя со степенью гипоксии. Наличие положительных корреляций между частотой выявления двуядерных клеток и клеток со сдвоенными ядрами свидетельствует о единстве сигнальных путей, приводящих к формированию данных пролиферативных аномалий.

Наличие корреляционной зависимости частот показателей микроядерного теста от возраста, пола, стажа работы, а также вредных привычек (алкоголь, курение) при экспозиции различными производственными факторами до сих пор является не однозначной [8]. В данном исследовании не установлено значимых ассоциаций уровня ядерных аномалий со стажем работы и наличием вредной привычки (курение) ни в одной из обследованных групп. Полученные результаты свидетельствуют о преобладающей роли комплексного воздействия химических и физических факторов, связанных с подземной угледобычей в формировании негативного цитологического статуса, который усугубляется наличием в анамнезе хронического пылевого бронхита.

Проведённый в настоящем исследовании корреляционный анализ между показателями цитогенетического исследования метафазных хромосом лимфоцитов, представленных в работе Volobaev et al. [8] и микроядерного теста буккальных эпителиоцитов, в группе здоровых шахтёров не выявил статистически значимых связей между анализируемыми признаками. В группе шахтёров с хроническим пылевым бронхитом установлены статистически значимые положительные корреляции между частотами обнаружения ядерных протрузий типа «пузырёк» и дицентрических хромосом с фрагментом, а также кольцевых хромосом, при которых соответствующие коэффициенты корреляций составили  $0,4600$  ( $p = 0,0207$ ) и  $0,4383$  ( $p = 0,0284$ ) соответственно. Частота протрузий типа «язык» в буккальных эпителиоцитах находится в прямой зависимости с выявляемостью дицентрических хромосом без фрагмента ( $r = 0,4300$ ,  $p = 0,0324$ ) и межхромосомными обменами ( $r = 0,4240$ ,  $p = 0,0347$ ), что позволяет предполагать наличие общих механизмов формирования хромосомных aberrаций и ядерных протрузий.

## Заключение

В настоящей работе установлено, что комплексное воздействие производственных факторов при подземной добыче каменного угля вызывает цитогенетические и пролиферативные нарушения в буккальных эпителиоцитах, частота которых значительно возрастает при наличии в анамнезе хронического пылевого бронхита. Повышение содержания клеток с цитогенетическими нарушениями в популяциях Т-лимфоцитов и буккальных эпителиоцитах у шахтёров с хроническим пылевым бронхитом протекают параллельно, что может быть обусловлено воздействием медиаторов воспаления, гипоксией и нарушением клеточного редокс-гомеостаза. Усугубление гипоксии, связанное со снижением параметров внешнего дыхания, обусловленное воспалением или возрастными изменениями, является факторами риска пролиферативных нарушений, сопровождающихся полиплоидизацией клеток.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-44-420087 p\_a, № 16-44-420926 p\_a, № 18-44-420017p\_a.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

(п.п. 1-5, 7-10, 12-21, 23-24 см. References)

- Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. *Медицинская генетика*. 2007; 6(11): 3-11.
- Петрашова Д.А., Белишева Н.К., Пелевина И.И., Мельник Н.А., Зольсер Ф. Генотоксические эффекты в буккальном эпителии горня-

ков, работающих в условиях облучения природными источниками ионизирующего излучения. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011; 13(1): 1792-6.

22. Мейер А.В., Толочко Т.А., Минина В.И., Тимофеева А.А. Влияние полиморфизма генов репарации ДНК на кариологический статус клеток буккального эпителия человека при экспозиции радоном. *Экологическая генетика*. 2014; XII(1): 28-38.

## References

- Chen Y., Shan N., Huggins F.E., Huffman G.P. Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39(4): 1144-51.
- Schins R.P., Borm P.J. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity. *Ann. Occup. Hyg.* 1999; 48(1): 7-13.
- Ellmerich S., Djouder N., Shjller M., Klein J.P. Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by *Streptococcus bovis*. *Cytokine*. 2000; 12(1): 26-31.
- Yanagita M., Shimabucuro Y., Nozaki T., Yoshimura N., Watanabe J., Koide H. et al. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO-production by gingival epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 297(2): 329-34.
- Thomas P., Hollad N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E. et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2009; 4(6): 825-37.
- Sycheva L.P. Full range of karyological indicators limits of variation, determining criterias and biological significance in assessing of human cytogenetic status. *Meditsinskaya genetika*. 2007; 6(11): 3-11. (in Russian)
- Volobaev V.P., Sinitsky M.Yu., Larionov A.V., Druzhinin V.G., Gafarov N.I., Minina V.I. et al. Modifying influence of occupational inflammatory diseases on the level of chromosome aberrations in coal miners. *Mutagenesis*. 2016; 31(2): 225-9.
- Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmueller S. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.* 2008; 659(1-2): 93-108.
- Leon-Mejia G., Quintana M., Debastini R., Dias J., Espitia-Perez L., Hartmann A. et al. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Environ. Saf.* 2014; 107: 133-9.
- Rohr P., da Silva J., da Silva F. R., Sarmiento M., Porto C., Debastiani R. et al. Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 2013; 54(1): 65-71.
- Petrashova D.A., Belisheva N.K., Pelevina I.I., Mel'nik N.A., Zol'zer F. Genotoxic effects in the buccal epithelium of the miners, occupationally exposure to natural sources of ionizing radiation. *Izvestiya Samarского nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2011; 13(1): 1792 -6. (in Russian)
- Nerseysan A. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutat. Res.* 2005; 588(1): 64-8.
- Serrano-Garcia L., Montero-Montoya R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 38(1): 38-45.
- Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4- dichlorophen-oxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*. 2004; 200(1): 39-47.
- Montero R., Serrano L., Davila V., Segura Y., Arrieta A., Fuentes R. et al. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003; 42(3): 216-22.
- Fenech M., Crott J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2002; 504(1-2): 131-6.
- Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell Biol.* 1998; 140(6): 1307-20.
- Gadhia P.K., Thumbar P.P., Kevadiya B. Cytome assay of buccal epithelium for bio-monitoring genotoxic assessment of benzene exposure among petrol pump attendants. *Int. J. Hum. Genet.* 2010; 10(4): 239-45.
- Celik A., Yildirim S., Ekinci S.Y., Tasdelen B. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction works as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013; 92: 265-70.
- Benedetti D., Nunes E., Sarmiento M.S., Porto C., Santos C.E.I., Dias J.F. et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mut. Res.* 2013; 752(1-2): 28-33.
- Kvitko K., Bandinelli E., Henriques J.A., Heuser V.D., Rohr P., da Silva F.R. 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; 35(4): 1060-8.
- Meyer A.V., Tolochko T.A., Minina V.I., Timofeeva A.A. Influence of polymorphisms of DNA repair genes in the human karyological status buccal epithelial cells during exposure to radon. *Ekologicheskaya genetika*. 2014; XII(1): 28-38. (in Russian)
- Otto M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007; 12: 913-22.
- Yen W.L., Klionsky D.J. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 23: 248-62.

Поступила 15.11.16

Принята к печати 16.01.2017