

Статья поступила в редакцию 10.08.2018 г.

Тимофеева А.А., Минина В.И., Соболева О.А., Рыжкова А.В.,
Савченко Я.А., Баканова М.Л., Головина Т.А., Глушков А.Н.
Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН,
Кемеровский государственный университет,
г. Кемерово, Россия

УРОВЕНЬ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ, ДОЗА АКТИВНЫХ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК У ШАХТЕРОВ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Предмет исследования. Структурно-функциональные особенности генома у шахтеров Кемеровской области.

Цель исследования. Изучение эффектов воздействия факторов производственной среды на геном шахтеров в зависимости от вариантов генов репарации ДНК XRCC2, XRCC3 и индивидуальной дозы активных кластеров рибосомных генов (АкРГ).

Методы исследования. Уровень повреждений ДНК оценивали с помощью метода учета хромосомных aberrаций в кратковременных культурах лимфоцитов крови 338 рабочих угольных шахт Кузбасса и 480 мужчин контрольной группы. С использованием ПЦР в реальном времени проведен анализ гена XRCC2 (rs3218536) и XRCC3 (rs861539) в изученных группах. Доза активных кластеров рибосомных генов исследована с помощью Ag-окраски хромосом по методу Howell и Black.

Основные результаты. Установлено статистически значимое ($p = 0,0001$) увеличение уровня хромосомных aberrаций у шахтеров по сравнению с контрольной группой. У шахтеров со средней дозой активных рибосомных генов зарегистрировано статистически значимое увеличение частоты встречаемости одиночных фрагментов ($p = 0,038$). Показано увеличение частоты обменов хромосомного типа у рабочих с минорным аллелем Т гена XRCC3, а также у обладателей комбинации гетерозиготного варианта гена XRCC2 GA с низкой дозой активных рибосомных генов.

Область применения. Данные результаты имеют значение при оценке негативных эффектов на организм человека в других популяциях со сходными факторами окружающей и производственной среды. Полученные данные об ассоциациях хромосомных aberrаций с различными вариантами генов репарации ДНК и дозой активных рибосомных генов целесообразно использовать в профилактической медицине для формирования групп повышенного риска.

Выводы. Работа на предприятиях угольного цикла сопряжена с возрастанием частоты встречаемости структурных нарушений хромосом. Установлена ассоциация полиморфизма генов репарации ДНК XRCC2 (rs3218536) и XRCC3 (rs861539) и дозы АкРГ с увеличением риска хромосомной нестабильности.

Ключевые слова: хромосомные aberrации; гены репарации ДНК; доза активных рибосомных генов.

Timofeeva A.A., Minina V.I., Soboleva O.A., Ryzhkova A.V.,
Savchenko Y.A., Bakanova M.L., Golovina T.A., Glushkov A.N.

Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS,
Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

LEVEL OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS, ACTIVE RIBOSOMAL GENES DOSE AND POLYMORPHISM OF DNA REPAIR GENES IN MINERS OF THE KEMEROVO REGION

Objective. Study of the effects of production the environment factors on the miner genome, depending on the variants of the DNA repair genes XRCC2, XRCC3, and the individual dose active ribosomal genes clusters (AcRG).

Methods. The level of DNA damage was assessed using the method of accounting of chromosomal aberrations in short-term cultures of blood lymphocytes in 338 workers of Kuzbass coal mines and 480 men of the control group. Using Real-Time PCR, the analysis of the gene XRCC2 (rs3218536) and XRCC3 (rs861539) was carried out. The dose of ribosomal genes active clusters was studied using Ag-coloring chromosome by the method of Howell and Black.

Results. A statistically significant ($p = 0.0001$) increase of the level of chromosomal aberrations in miners was found in comparison with the control group. Miners with an average dose of active ribosomal genes have a statistically significant increase of single fragments incidence ($p = 0.038$). Increased frequency of chromosome exchanges in workers with a minor T-allele of XRCC3 gene, and in holders of heterozygous GA genotype of XRCC2 with a low dose of active ribosomal genes.

Conclusions. These results are important in assessing of the negative effects on the human in populations with similar environmental and production factors. The obtained data of chromosomal aberrations associations, different variants of DNA repair genes, and active ribosomal genes dose are expedient for use in preventive medicine in the formation of high-risk groups. Working at coal cycle enterprises is associated with an increase in the frequency of occurrence of structural chromosome disorders. The association of the polymorphism of the DNA repair genes XRCC2 (rs3218536) and XRCC3 (rs861539) and the dose of AcRG with an increased risk of chromosomal instability is established.

Key words: chromosomal aberrations; DNA repair genes; ribosome genes dose.

Одной из важных проблем современного общества является накопление потенциально опасных генетических нарушений, таких как повреждение ДНК и патологические проявления экспрессии генов, в результате действия факторов окружающей среды, что в свою очередь может привес-

ти к росту заболеваемости населения. Для жителей регионов с развитой угледобывающей промышленностью данная проблема стоит особенно остро, поскольку работа данных предприятий связана со значительным загрязнением водного и воздушного бассейнов, земель, изменением радиационного фона [1].

В ряде исследований было выявлено наличие прямой взаимосвязи между уровнем добычи угля и увеличением заболеваемости и смертности, связанными с легочными, сердечно-сосудистыми, онкологическими и другими патологиями у населения, проживающего вблизи угольных шахт [1]. Эти негативные эффекты связаны с тем, что в процессе добычи и переработки угля происходит выделение большого количества токсических веществ, таких как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и тяжелые металлы. Сама угольная пыль представляет собой смесь разнообразных химических веществ органической и неорганической природы, в состав которой входят кварц, металлы и углеводороды, способные превращаться в ПАУ при высоких температурах.

Уголь также содержит природные радиоактивные вещества уранового, актиноуранового и ториевого рядов. В исследовании Smerhovsky с соавт. (2002) было показано повышение частоты встречаемости хромосомных aberrаций (ХА) и увеличение риска возникновения рака легких у шахтеров при воздействии α -частиц радона. Высокий уровень повреждений ДНК был выявлен у рабочих предприятий угольного цикла, находящихся в условиях воздействия высоких концентраций угольной пыли [3].

Постоянное воздействие комплекса факторов производственной среды предприятий угольного цикла может привести к возникновению различных легочных заболеваний (хронической пылевой бронхит, эмфизема, рак легкого) и сопровождаться индукцией цитогенетических повреждений [4].

Негативный эффект комплексного воздействия факторов производственной среды в настоящее время оценивается с помощью широкого спектра тестов, включающих в себя молекулярные, молекулярно-цитогенетические и классические цитогенетические методы. Одним из наиболее широко применяемых способов оценки воздействия факторов окружающей среды на геном человека является микроскопический анализ aberrаций хромосом в метафазных клетках культивируемых лимфоцитов, что позволяет оценивать крупные структурные нарушения ДНК, приводящие к дисбалансу большого числа копий множества генов. Хромосомные aberrации могут привести к разрушению генов, изменению экспрессии онкогенов и генов-супрессоров опухолей [5].

Одним из наиболее опасных, с точки зрения возможных последствий, типом повреждения ДНК являются двуниевые разрывы, приводящие к образованию aberrаций хромосомного типа с вовлечением в процесс обеих хроматид одной или нескольких хромосом. Репарация данного типа нарушений регулируется рядом генов, в число которых входят гены XRCC2 и XRCC3.

Ген XRCC2 (X-ray repair cross-complementing group 2) локализован в 7q36.1. Он кодирует RAD51-подобный протеин, играет ключевую роль в репарации двуниевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. XRCC2 кодирует белок семейства RecA/Rad51, участвующий в репарации хромосомных фрагментов, делеций и транслокаций. Распространенный полиморфный вариант 563G>A (rs3218536) в 3 экзоне приводит к замене аминокислот Arg на His в 188 кодоне. Влияние данного SNP функциональный домен белка неизвестно, однако было показано, что His аллель может влиять на чувствительность клеток к повреждениям ДНК [6].

Ген XRCC3 локализован на хромосоме 14q32.3, кодирует белок, структурно и функционально связанный с RAD51, который играет центральную роль в репарации путем гомологичной рекомбинации. В связи с риском рака различной локализации и геномной нестабильностью чаще всего изучают полиморфный вариант rs861539, 722 C>T (Thr241Met). Предполагают, что данная замена может приводить к перемещению сайта фосфорилирования в аденозин-триптофансвязывающем домене, что может изменять его репаративную функцию. Было установлено, что обладатели данного аллеля отличаются повышенным уровнем аддуктов ДНК в лимфоцитах здоровых индивидов, а также повышенной частотой спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер, что может быть связано со сниженной репаративной способностью. Клетки, дефицитные по продуктам генов XRCC2 и XRCC3, характеризуются дефектной репарацией путем гомологичной рекомбинации и демонстрируют высокую геномную нестабильность [7].

В процессах адаптации к неблагоприятным экологическим условиям важную роль могут играть рибосомные гены, контролирующие выработку всего объема белков, необходимых для жизнедеятельности клетки, эффективной работы механизмов, предотвращающих накопление опасных повреждений ДНК (репарации, контроля клеточного цикла, антиоксидантной защиты и других). Кластеры рибосомных генов у человека расположены в коротких плечах пяти пар акроцентрических хромосом (13-15, 21, 22). Общее число активных кластеров рибосомных генов (АкРГ), формирующих ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом у различных индивидов, составляет, в среднем, 400 bp и отличается широкой межклеточной и межиндивидуальной вариабельностью. В ряде исследований было установлено, что характер Ag-окраски, традиционно используемой для выявления кислых негистоновых белков ЯОР (например, UBF, Treacle, ATRX, Sirt7 и других), позволяет проводить оценки дозы АкРГ на метафазных хромосомах и является достаточно стабильным признаком [8]. Было показано, что введение двуниевых разрывов в рДНК (с помощью технологий редактирования генома или лазерного микроизлучения) способно приводить к кардинальной перестройке структуры ядра, АТМ-зависимому подавлению транскрипции и активации различных механизмов репарации, что указы-

Корреспонденцию адресовать:

ТИМОФЕЕВА Анна Александровна,
650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, д. 10,
Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН.
Тел.: +7-909-522-43-20.
E-mail: annateam86@gmail.com

ваит на важную роль рДНК в поддержании структурной целостности генома [9].

В ряде исследований изучалась роль рибосомных генов в процессах адаптации индивидов к неблагоприятным экологическим условиям. Было показано, что появление большого числа хромосом с крупными вариантами Ag-ЯОР можно объяснить компенсаторной активацией резервных копий генов рРНК, имеющихся в отдельных ЯОР, которая подразумевает приспособительное включение адаптивных механизмов и может служить важным фактором поддержания внутриклеточного гомеостаза при стрессовых воздействиях [10].

В связи с вышеизложенным, **целью настоящей работы** является изучение негативных эффектов воздействия комплекса факторов производственной среды у шахтеров с различными индивидуальной дозой АкРГ и вариантами генов репарации ДНК XRCC2 и XRCC3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения негативного влияния факторов производственной среды были обследованы 338 шахтеров, работающих на угольных шахтах Кузбасса (шахты г. Ленинск-Кузнецкий, шахта Березовская и шахта Первомайская). В контрольную группу вошли 480 мужчин, проживающих в г. Кемерово и не работающих на промышленных предприятиях. В обследование не включали людей, получающих медикаментозное лечение, а также проходивших рентгенологическое обследование в течение 3 месяцев до сбора материала. Характеристика обследованных групп представлена в таблице 1.

Следует отметить, что во время исследования было обнаружено превышение ПДК по угольной пыли в воздухе рабочих зон ($4 \text{ мг}/\text{м}^3$). Среднесменная концентрация пыли на рабочем месте у горнорабочих очистительного забоя составила $68,1 \text{ мг}/\text{м}^3$, у проходчиков — $96,6 \text{ мг}/\text{м}^3$, у электрослесарей — $51,2 \text{ мг}/\text{м}^3$, у горных мастеров — $42,5 \text{ мг}/\text{м}^3$.

Генотоксические эффекты в лимфоцитах крови обследованных изучали с помощью метода учета хромосомных aberrаций (ХА) в 48-часовых культурах лимфоцитов периферической крови. Подготовка препаратов метафазных хромосом и принципы учета ХА подробно описаны в работах, опубликованных нами ранее [11].

Активность рибосомных генов оценивали на препаратах хромосом, окрашенных нитратом серебра по методу Howell W.M., Black D.A. (1980) с модификациями. На стекло наносили 50 мкл деионизированной воды, 150 мкл 50%-ного раствора нитрата серебра («ПанЭко», Москва) и 100 мкл коллоидного проявляющего раствора (2%-ный раствор желатина в 0,1%-ной муравьиной кислоте). Препарат накрывали прозрачным стеклом и инкубировали в термостате в течение 10 мин при 56°C . После промывки под струей водопроводной воды препарат окрашивали 1%-ным раствором красителя Гимза. Размеры AgЯОР выражали в условных единицах, оценивая их визуально по 5-балльной системе: 0 баллов — окраска отсутствует, 1 — окраска слабая (зерно серебра меньше ширины хроматиды), 2 — средняя окраска (зерно серебра примерно соответствует ширине хроматиды), 3 — интенсивная окраска (зерно серебра больше ширины хроматиды), 4 — очень интенсивная окраска (зерно серебра намного больше ширины хроматиды). Количество активных копий РГ в индивидуальном геноме определяли путем суммирования усредненных по

Таблица 1
Характеристика изученных групп
Table 1
Characteristic of the studied groups

Группа	N	Возраст, лет		Стаж работы в шахте, лет	
		Mean \pm St.err	Min-max	Mean \pm St.err	Min-max
ш. г. Ленинск-Кузнецкий	63	43,47 \pm 1,0	24 - 58	19,75 \pm 1,1	2,5 - 40
ш. Березовская	165	48,54 \pm 0,65	28 - 66	27,35 \pm 0,67	8 - 50
ш. Первомайская	110	47,27 \pm 0,98	27 - 70	26,19 \pm 0,99	6 - 51
Контроль	480	49,24 \pm 0,29	34 - 67	0	0

Примечание: Здесь и далее: Mean \pm St.err - среднее значение \pm стандартная ошибка.

Note: Here and further: Mean \pm St.err is the mean value \pm standard error.

Сведения об авторах:

ТИМОФЕЕВА Анна Александровна, ст. инженер-технолог, лаборатория цитогенетики, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: annateam86@gmail.com

МИНИНА Варвара Ивановна, доктор биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник, лаборатория цитогенетики, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: vminina@mail.ru

СОБОЛЕВА Ольга Александровна, ведущий инженер-технолог, лаборатория цитогенетики, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: soboleva.olga88@yandex.ru

РЫЖКОВА Анастасия Владимировна, ведущий инженер-технолог, лаборатория цитогенетики, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: kotia1490@mail.ru

САВЧЕНКО Яна Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория цитогенетики, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: yasavchenko@yandex.ru

БАКАНОВА Марина Леонидовна, мл. науч. сотрудник, лаборатория цитогенетики, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: mari-bakano@ya.ru

ГОЛОВИНА Татьяна Александровна, инженер, кафедра генетики, ФГБОУ ВО КемГУ, г. Кемерово, Россия.

ГЛУШКОВ Андрей Николаевич, доктор мед. наук, профессор, директор, Институт экологии человека ФГБНУ ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: ihe@kemt.ru

20 метафазным пластинкам ранговых оценок размера преципитата металлического серебра над каждым из десяти ЯОР в условных единицах от 0 до 4. Таким образом, дозу активных рибосомных генов удалось оценить у 136 шахтеров и 47 человек контрольной группы.

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфных локусов генов XRCC2 (rs3218536) (563G>A, Arg188His) и XRCC3 rs861539 (722C>T, Thr241Met) проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов с использованием наборов реактивов СибДНК. Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов, несущих «гаситель» на 3'-конце (BHQ) и флуоресцентных красителей (FAM и R6G) на 5'-конце. Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 2.

Статистический анализ первичных данных осуществляли средствами STATISTICA for WINDOWS v.8.0 и MS Excel 2007. Для анализа количественных цитогенетических показателей рассчитывались: медианы, размахи, средние величины, стандартные ошибки и стандартные отклонения. С использованием критерия Колмогорова-Смирнова проводили проверку соответствия распределения количественных показателей закону нормального распределения. Было установлено статистически значимое отклонение распределений от нормального всех изучаемых цитогенетических параметров ($p < 0,05$). Сравнение групп проводилось с помощью непараметрического критерия Mann-Whitney U Test. Оценку частоты редкого аллеля, соответствие распределения частот равновесию Харди-Вайнберга (χ^2) проводили с помощью доступного онлайн-ресурса <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwal.pl>. При сравнении частот генотипов и аллелей в группах использовался критерий χ^2 с поправкой Йетса.

При помощи ROC-анализа были определены пороговые значения уровня повреждений ДНК, что позволило разделить исследуемую группу на выборки с низкой и высокой частотой цитогенетических нарушений для проведения логистического регрессион-

ного анализа. Для проведения ROC-анализа была использована программа MedCalc Statistical Software version 14.8.1.

Логистический регрессионный анализ для выявления ассоциаций полиморфных локусов в различных моделях (аддитивной, доминантной, сверхдоминантной, рецессивной и лог-аддитивной) проводили с помощью программы SNPStats. Гипотезу о существенности построенной модели с учетом всех переменных проверяли на основании теста отношения правдоподобия и его значимости P_{adj} . Для выбора лучшей модели использовали информационный критерий Акайке (AIC), при этом выбирали модели с наименьшим значением AIC из всех статистически значимых ($P_{adj} < 0,05$). Для минимизации статистической ошибки первого типа применяли поправку FDR (False discovery rate).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования цитогенетических нарушений у шахтеров, работающих на угольных предприятиях Кузбасса показал увеличение уровня хромосомных aberrаций по сравнению с контрольной группой ($4,25 \pm 0,14$ % против $1,50 \pm 0,05$ %; $p = 0,0001$), что свидетельствует о мутагенном характере воздействия факторов производственной среды на организм работающих и указывает на необходимость разработки мер комплексной профилактики заболеваний, обусловленных накоплением повреждений ДНК.

В ходе дальнейшего исследования проводился анализ распределений полиморфных вариантов генов репарации ДНК XRCC3 722 C>T и XRCC2 563 G>A (табл. 3).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов, как у рабочих угольных предприятий, так и у жителей г. Кемерово, показал соответствие равновесию Харди-Вайнберга, а также данным литературы, полученным при изучении представителей европейской расы [12]. Было установлено, что распределение частот генотипов и аллелей у шахтеров и жителей г. Кемерово, не работающих на промышленных предприятиях, статистически значимо не различались между собой.

Information about authors:

TIMOFEEVA Anna Aleksandrovna, engineer-technologist, cytogenetics laboratory, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: annateam86@gmail.com

MININA Varvara Ivanovna, doctor of biological sciences, docent, a leading researcher, cytogenetics laboratory, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: vminina@mail.ru

SOBOLEVA Olga Alexandrovna, leading engineer-technologist, cytogenetics laboratory, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: soboleva.olga88@yandex.ru

RYZHKOVA Anastasia Vladimirovna, leading engineer-technologist, cytogenetics laboratory, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: kotia1490@mail.ru

SAVCHENKO Yana Alexandrovna, candidate of biological sciences, senior research associate, cytogenetics laboratory, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: yasavchenko@yandex.ru

BAKANOVA Marina Leonidovna, junior research associate, cytogenetics laboratory, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: mari-bakano@ya.ru

GOLOVINA Tatyana Aleksandrovna, an engineer, department of genetics, Kemerovo State University, Kemerovo, Russia.

GLUSHKOV Andrey Nikolaevich, doctor of medical sciences, professor, director, Institute of Human Ecology Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. E-mail: ihe@kemtrel.ru

Таблица 2
Характеристика праймеров и зондов, использованных для типирования SNP
Table 2
Characterization of the primers and the probes used for typing SNP

Ген / RefSNP	Последовательность праймеров	Последовательность зондов	*Ta, °C
XRCC2 rs3218536	5'- GTTCTCAGTGCTTAGAGAAGCT-3' 5'- GCATTATAGTTTGTGTCGTTGC-3'	5'-FAM-TGACTATCGCCTGGTTCCT- BHQ-3' 5'-R6G-TGACTATCACCTGGTTCCT- BHQ-3'	60
XRCC3 rs861539	5'- CCATTCCGCTGTGAATTTGAC-3' 5'- TCTGGAAGGCACTGCTCAGC-3'	5'-FAM-CACGCAGCGTGGCCCC-BHQ-3' 5'-R6G-CACGCAGCATGGCCCC-BHQ-3'	63

Примечание: *Ta - температура отжига праймеров.
Note: *Ta - annealing temperature.

В процессе изучения частоты встречаемости цитогенетических нарушений у шахтеров с различными вариантами генов репарации ДНК было выявлено увеличение уровня обменов хромосомного типа у рабочих, носителей минорного аллеля гена XRCC3 722 C>T (табл. 4).

Статистически значимых отличий по уровню цитогенетических нарушений среди носителей различных генотипов гена XRCC2 выявлено не было. В контрольной группе взаимосвязи частоты встречаемости хромосомных aberrаций с различными вариантами генов репарации ДНК XRCC2 563 G>A и XRCC3 722 C>T не обнаружено.

Полученные результаты указывают на значимое влияние аллельных вариантов гена репарации ДНК XRCC3 722 C>T на частоту встречаемости aberrаций хромосомного типа, поскольку продукт данного гена принимает непосредственное участие в процессе репарации двунитевых разрывов ДНК.

На следующем этапе исследования был проведен анализ дозы активных рибосомных генов в группе рабочих, результаты которого представлены в таблице 5.

В ходе проведенного исследования не было обнаружено статистически значимых отличий показателей АкРГ между группами контроля и шахтеров. Влияния таких факторов как возраст, стаж, статус курения на показатели дозы АкРГ не обнаружено.

Для проведения сравнительного анализа дозы активных рибосомных генов и уровня хромосомных aberrаций все выборки обследованных разделили на три группы копияности в зависимости от уровня активности рибосомных генов [10]: низкокопийные индивиды (доза АкРГ от 15,00 до 17,99 усл. ед.), среднекопийные индивиды (доза АкРГ от 18,00 до 20,99 усл. ед.), высококопийные индивиды (доза АкРГ от 21,00 до 23,99 усл. ед.).

В группе рабочих со средней дозой АкРГ было выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости одиночных фрагментов по сравнению с шахтерами с низкой и высокой дозами (рис.).

В группе контроля зависимости уровня хромосомных нарушений от дозы активных рибосомных генов не было выявлено. Таким образом, полученные результаты указывают на значимость дозы активных

Таблица 3
Распределение частот генотипов и аллелей генов репарации ДНК в изученных группах
Table 3
Frequency distribution of genotypes and alleles of DNA repair genes in the studied groups

Локусы и генотипы	Генотипы и аллели	Шахтеры	Контроль
XRCC2 rs3218536 563 G>A	GG	305 (89,71 %)	324 (89,01 %)
	GA	34 (10,00 %)	36 (9,89 %)
	AA	1 (0,29 %)	4 (1,10 %)
	G/A	322 (94,71 %) / 18 (5,29 %)	342 (93,96 %) / 22 (6,04 %)
XRCC3 rs861539 722 C>T	CC	156 (46,57 %)	162 (45,00 %)
	CT	135 (40,30 %)	158 (43,89 %)
	TT	44 (13,13 %)	40 (11,11 %)
	C/T	224 (66,72 %) / 111 (33,28 %)	241 (66,95 %) / 119 (33,05 %)

Таблица 4
Частота aberrаций хромосомного типа у шахтеров с различными вариантами гена XRCC3
Table 4
The frequency of chromosomal type aberrations in miners with different variants of the XRCC3 gene

Генотипы	Me	St. dev.	Min-Max	Mean ± St. err
XRCC3 722 CC	1,50*	1,31	0 - 9,00	1,58 ± 0,11
XRCC3 722 CT	2,00	1,79	0 - 11,50	2,07 ± 0,14
XRCC3 722 TT	2,00	1,46	0 - 6,50	2,11 ± 0,22

Примечание: Здесь и далее: Me - медиана; St. dev. - стандартное отклонение; *p = 0,013 - статистически значимо отличается от рабочих с генотипами XRCC3 722 CT и XRCC3 722 TT.
Note: Here and further: Me is a median, St. dev. it is standard deviation.
*p = 0,013 - differs from workers with the genotypes of XRCC3 722 CT and XRCC3 722 TT statistically meaningfully.

рибосомных генов в условиях комплексного воздействия неблагоприятных факторов производственной среды.

Для оценки рисков значимости изученных вариантов генотипов генов XRCC2 и XRCC3 и дозы АкРГ вся выборка шахтеров была разделена на группы с высоким (выше 1 %) и низким уровнем aberrаций хромосомного типа. Пороговое значение было рассчитано с использованием ROC-анализа. Для гена XRCC2 (rs3218536) не было выявлено статистически значимых ассоциаций с повышенной частотой нарушений хромосомного типа. В ходе проведенного анализа была выявлена ассоциация локуса XRCC3 (rs861539 C>T) в рецессивной ($OR_{adj} = 0,16$; CI 95%:

Таблица 5
Дозы активных рибосомных генов в изученных группах
Table 5
Doses of active ribosomal genes in the studied groups

Группа	Показатель	Me	St. dev.	Min-Max	Mean ± St. err
Шахтеры	АкРГ всех хромосом	18,05	1,00	15,70 - 21,00	18,08 ± 0,08
	АкРГ хромосом группы D	10,75	1,00	7,50 - 13,85	10,75 ± 0,08
	АкРГ хромосом группы G	7,30	0,85	5,07 - 9,80	7,33 ± 0,07
Контроль	АкРГ всех хромосом	17,60	0,74	15,90 - 18,90	17,54 ± 0,11
	АкРГ хромосом группы D	10,10	0,51	8,80 - 11,20	10,03 ± 0,07
	АкРГ хромосом группы G	7,50	0,43	5,60 - 8,60	7,51 ± 0,06

0,01 – 0,32; $P_{adj} = 0,043$) и лог-аддитивной ($OR_{adj} = 0,09$; CI 95%: 0,01 – 0,17; $P_{adj} = 0,023$) моделях наследования с увеличением уровня aberrаций хромосомного типа.

Для полиморфизма гена XRCC2 (rs3218536) была выявлена ассоциация с высоким уровнем (выше 1 %) обменов хромосомного типа в кодоминантной ($OR_{adj} = 3,86$; CI 95%: 1,39 – 10,70; $P_{adj} = 0,03$), доминантной ($OR_{adj} = 3,52$; CI 95%: 1,29 – 9,62; $P_{adj} = 0,016$) и сверхдоминантной ($OR_{adj} = 3,91$; CI 95%: 1,41 – 10,83; $P_{adj} = 0,01$) моделях. Проведенный анализ также показал ассоциацию генотипа XRCC2 GA в сочетании с низкой дозой активных рибосомных генов с повышением частоты встречаемости обменов хромосомного типа ($OR_{adj} = 9,78$; CI 95%: 1,55 – 61,73). Ассоциаций вариантов гена XRCC3 (rs861539) с частотой встречаемости обменов хромосомного типа выявлено не было.

Таким образом, полученные результаты указывают на значимый вклад полиморфизма генов XRCC2 (rs3218536), XRCC3 (rs861539) и индивидуальной дозы АкРГ в формирование чувствительности к комплексному воздействию факторов производственной среды.

Население угольных регионов подвергается комплексному воздействию факторов производственной среды, способствующих возникновению и развитию окислительного стресса и накопления повреждений ДНК. Полученные в проведенном исследовании результаты цитогенетического анализа показывают статистически значимое увеличение уровня хромосомных нарушений у рабочих предприятий угольного цикла по сравнению с жителями г. Кемерово, не контактирующими с производственными мутагенами. В ряде исследований было показано повышение частоты микроядер, ДНК-комет, хромосомных aberrаций у людей, контактирующих с угольной пылью [3]. Воздействие пылевых частиц, полициклических ароматических углеводородов, тяжелых металлов, изменение радиационного фона способно вызывать рост заболеваемости и смертности от онкологических, сердечно-сосудистых, легочных заболеваний как у рабочих, так и у населения, проживающего вблизи угольных шахт [1].

Большое значение имеет то, что накопление хромосомных aberrаций представляет собой состояние с наследственной предрасположенностью, в развитии которого роль триггеров играют факторы окружающей и производственной среды. Так как дифференциальная чувствительность к воздействию факторов производственной среды может быть связана с различными вариантами локусов систем репарации ДНК, были изучены гены, продукты которых потенциально могут быть вовлечены в процесс накопления хромосомных нарушений, к числу которых относятся гены XRCC2 и XRCC3, участвующие в процессах репарации двуниевых разрывов ДНК. Выявленные в

Рисунок

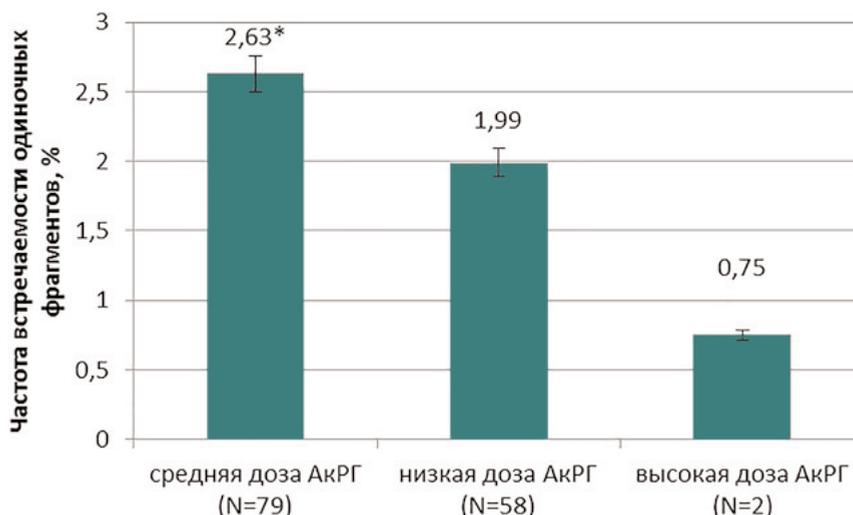
Частота встречаемости одиночных фрагментов у шахтеров с различной дозой АкРГ

Примечание: * $p = 0,038$ - отличие шахтеров со средней дозой АкРГ от шахтеров с низкой дозой.

Figure

Frequency of occurrence of single fragments in miners with different dose of AcRG

Note: * $p = 0,038$ - the difference between miners with an average dose of AcRG from miners with a low dose.



данном исследовании ассоциации полиморфизмов генов XRCC2 и XRCC3 с уровнем обменов и аббераций хромосомного типа позволяют сделать вывод о достаточно важной роли этих генов в формировании чувствительности к негативному влиянию факторов производственной среды.

Доза АкРГ человека в условиях комплексного воздействия факторов среды угольных шахт ранее изучена не была. Средние значения данного показателя, полученные у шахтеров Кемеровской области, согласуются с результатами выполненных ранее работ. Так, в группе рабочих Кемеровского коксохимического завода среднее значение дозы АкРГ составило 18,46 баллов (не различаясь по полу и возрасту), а в группах детей и подростков, экспонированных радоном — 18,26 баллов [13, 14]. Имеются данные о том, что рибосомные гены могут играть роль в процессах адаптации индивидов к неблагоприятным экологическим условиям. Так, было показано увеличение частоты встречаемости экстремально больших вариантов АгЯОР у рабочих производства пиромеллитового диангидрида [15], увеличение дозы активных рибосомных генов у рабочих коксохимического производства со стажем свыше 14 лет [13]. В исследованиях, проводимых среди детей и подростков, контактировавших со сверхнормативными дозами радона, было показано увеличение частоты хромосомных аббераций у лиц со средней дозой АкРГ [14].

В связи с выше изложенным, полиморфизм генов репарации ДНК XRCC2 (rs3218536), XRCC3 (rs861539) и индивидуальную дозу АкРГ можно использовать в качестве биомаркеров при разработке системы прогноза индивидуальной чувствительнос-

ти человека к воздействию факторов производственной среды.

ВЫВОДЫ:

Работа на угольных предприятиях Кемеровской области обуславливает формирование высокого уровня цитогенетических нарушений, что свидетельствует о мутагенном характере воздействия факторов производственной среды на организм шахтеров и указывает на необходимость разработки мер комплексной профилактики заболеваний, обусловленных накоплением повреждений ДНК.

Установлено, что у шахтеров со средней дозой активных рибосомных генов статистически значимо увеличена частота встречаемости одиночных фрагментов по сравнению с индивидами с низкой и высокой дозами. Таким образом, полученные результаты указывают на значимость дозы активных рибосомных генов в условиях комплексного воздействия неблагоприятных факторов производственной среды.

Выявлена ассоциация полиморфизма генов репарации ДНК XRCC2 (rs3218536) и XRCC3 (rs861539) и дозы АкРГ с увеличением риска хромосомной нестабильности в условиях комплексного воздействия факторов производственной среды.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-44-420017-р-а и государственного задания № 0352-2016
Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Mun SA. Vliyanie rosta dobychi uglya na zagryaznenie atmosfery i zaboлеваemost' rakom legkogo v Кемеровской области. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (1): 69. Russian (Мун С.А. Влияние роста добычи угля на загрязнение атмосферы и заболеваемость раком легкого в Кемеровской области //Современные проблемы науки и образования. 2013. № 1. С. 69.)
2. Smerhovsky Z, Landa K, Rucssne P, Juzova D, Brabec M, Zudova Z. Increased risk of cancer in radon-exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations. *Mutat Res*. 2002; 514(1-2): 165-176.
3. Leon-Mejia G, Quintana M, Debastiani R, Dias J, Espitia-Perez L, Hartmann A. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014; 107: 133-139.
4. Ulker OC, Ustundag A, Duydu Y, Yucesoy B, Karakaya A. Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey. *Environ Mol Mutagen*. 2008; 49(3): 232-237.
5. Kloosterman WP, Hochstenbach R. Deciphering the pathogenic consequences of chromosomal aberrations in human genetic disease. *Mol Cytogenet*. 2014; 7: 100-112. doi: 10.1186/s13039-014-0100-9
6. Rafii S, O'Regan P, Xinarianos G et al. A potential role for the XRCC2 R188H polymorphic site in DNA damage repair and breast cancer. *Hum Mol Genet*. 2002; 11(12): 1433-1438.
7. Fayaz S, Karimmirza M, Tanhaei S, Fathi M, Torbati PM, Fard-Esfahani P. Increased risk of differentiated thyroid carcinoma with combined effects of homologous recombination repair gene polymorphisms in an Iranian population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 14(11): 6727-6731.
8. Lyapunova NA, Porokhovnik LN, Kosyakova NV, Mandron IA, Tsvetkova TG. Viability of carriers of chromosomal abnormalities depends on genomic dosage of active ribosomal genes (rRNA genes). *Russian Journal of Genetics*. 2017; 53(6): 722-731. Russian (Ляпунова Н.А., Пороховник Л.Н., Косякова Н.В., Мандрон И.А., Цветкова Т.Г. Жизнеспособность носителей хромосомных аномалий зависит от геномной дозы активных рибосомных генов (генов рРНК) //Генетика. 2017. Т. 53, № 6. С.722-731.)
9. McStay B. Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes Dev*. 2016. 30(14): 1598-1610. doi: 10.1101/gad.283838.116.
10. Lyapunova NA. Ribosomal genes in the human genome: contribution to genetic individuality and phenotypic manifestation of the gene dose. *Annals of the Russian academy of medical science*. 2000; (5): 19-23. Russian (Ляпунова Н.А. Рибосомные гены в геноме человека: вклад в генетическую индивидуальность и фенотипическое проявление дозы гена //Вестник Российской академии медицинских наук. 2000. № 5. С. 19-23.)

11. Minina V, Sinitsky M, Druzhinin V et al. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. *Eur. J. Cancer Prev.* 2016; (1). doi: 10.1097/CEJ.0000000000000270.
12. <http://browser.1000genomes.org>
13. Minina VI, Druzhinin VG. Genomic dosages of active rRNA genes in coke-oven workers. *Russian Journal of Genetics.* 2004; 40(12): 1702-1708. Russian (Минина В.И., Дружинин В.Г. Геномные дозы активных генов рРНК у рабочих коксохимического производства //Генетика. 2004. Т. 40, № 12. С. 1702-1708.)
14. Timofeeva AA, Minina VI, Druzhinin VG, Golovina TA, Tolochko TA, Larionov AV. Cytogenetic effects of excessive radon exposure depending. *Ecological genetics.* 2017; 15(4): 33-40. doi: 10.17816/ecogen15433-40. Russian (Тимофеева А.А., Минина В.И., Дружинин В.Г., Головина Т.А., Толочко Т.А., Ларионов А.В. Цитогенетические эффекты сверхнормативного воздействия радона в зависимости от индивидуальной дозы активных рибосомных генов //Экологическая генетика. 2017. № 4. С. 33-40.)
15. Viktorova TV, Khusnutdinova EK, Viktorov VV et al. Analysis of chromosome aberrations and nucleolar-forming chromosome regions in workers in the production of pyromellitic dianhydride: On the possible adaptive role of Ag-NOR variants. *Russian Journal of Genetics.* 1994; 30(7): 992-998. Russian (Викторова Т.В., Хуснутдинова Э.К., Викторов В.В. и др. Анализ хромосомных aberrаций и ядрышкообразующих районов хромосом у рабочих производства пиромеллитового диангирида: О возможной адаптивной роли вариантов Ag-ЯОР //Генетика. 1994. Т. 30, № 7. С. 992-998.)

