

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ ПРОФЕССИОНАЛЬНО СВЯЗАННЫХ С ДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Томилин Н. В., Петров А. Н., Филько О. А., Храброва А. В., Соловьева Н. Е.,
Иванова Т. М. , Шестова Г. В., Сизова К. В., Рутковский Г. В., Глушков Р. К.,
Иваненко А. А., Соловьев Н. Д.

ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1,

Тел. (812) 365-06-80; e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Резюме: Целью настоящего исследования являлась оценка генотоксического действия газосварочных аэрозолей на людей, профессионально связанных со сварочными работами, с помощью одновременной регистрации степени повреждения ядерной ДНК и частоты встречаемости микроядер в клетках периферической крови.

С помощью метода щелочного гель-электрофореза и микроядерного теста было показано увеличение степени повреждения ДНК в ядрах лейкоцитов и частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах периферической крови людей, имеющих длительный контакт с газосварочными аэрозолями по отношению к контрольной группе. Концентрация марганца в цельной крови также достоверно увеличивалась. Была обнаружена отрицательная корреляция между степенью повреждения ДНК и концентрацией марганца, что может свидетельствовать о его защитном действии. При умеренном увеличении концентрации марганца, вероятно, может повышать антиоксидантную защиту клеток, а высокие концентрации увеличивают степень повреждения ядерной ДНК.

По-видимому, генотоксическое действие сварочных аэрозолей определяют другие металлы (свинец, кобальт, никель и алюминий), содержащиеся в сварочных аэрозолях, или их сочетанное действие.

Ключевые слова: генотоксичность, лейкоциты, ретикулоциты, щелочной гель-электрофорез, микроядерный тест, марганец

ASSESSMENT OF DNA DAMAGE IN PERIPHERAL BLOOD CELLS OF PEOPLE OCCUPATIONALLY EXPOSED TO HEAVY METALS

Tomilin N.V., Petrov A. N., Filko O. A., Khrabrova A. V., Solovyeva N. E.,
Ivanova T. M., Shestova G. V., Sizova K. V., Rutkovsky G. V., Glushkov R. K.,
Ivanenko A. A., Solovyev N. D.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency

St. -Petersburg, Russia, 192019, ul Bekhtereva, 1

Tel. (812) 365-06-80, e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Abstract: The alkaline gel-electrophoresis and micronucleus assay showed that the participants of exposed group had higher DNA damage of leucocyte's nuclei and higher micronuclei frequency into reticulocytes than control group. The whole blood concentration of manganese was increasing too. Blood manganese concentration was negative correlated with DNA damage. It seems that manganese protects nuclear DNA from damage. It seems that at low concentration manganese was involved in antioxidant activity but at high concentration it was capable of to induce DNA damage in human leucocytes.

Evidently genotoxicity of welding fumes is determined by other metals (lead, cobalt, nickel or aluminium), which are in welding fumes. It might be their combined action.

Key words: genotoxicity, leucocytes, reticulocytes, alkaline gel-electrophoresis, micronucleus assay, manganese

Введение

Генотоксическое действие вредных химических факторов представляет собой существенную опасность для здоровья людей, работающих в условиях их повышенного действия или проживающих в экологически загрязненных районах. Оно связано с нарушением структуры ядерной ДНК, которое может приводить к генетической нестабильности и являться причиной нейродегенеративных, сердечнососудистых, иммунных и онкологических заболеваний.

Повреждения ДНК являются триггером, запускающим процессы репарации, а в случаях более значительных повреждений и невозможности успешной репарации, вызывают гибель клеток посредством апоптоза или некроза, нарушая тканевой гомеостаз [1].

Одним из перспективных подходов к диагностике состояния генома людей при мониторинговых исследованиях является использование в качестве объекта клеток

периферической крови и комплексного метода, состоящего из тестов: метода щелочного гель-электрофореза единичных клеток (ЩЭЕК, Comet assay), позволяющего оценить прямо степень повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах; микроядерного теста на ретикулоцитах, выявляющего уровень кластогенного (хромосомные aberrации) и анеугенного (численные нарушения) действия и оценку относительного содержания ретикулоцитов как показатель цитотоксического действия (состояние эритропоэза).

Метод щелочного гель-электрофореза единичных клеток позволяет определять повреждения ДНК в клетках различных, в том числе и непролиферирующих, тканей. С помощью метода ЩЭЕК можно оценить общее повреждение ядерной ДНК (одно- и двуспиральные разрывы, AP-сайты и ДНК-ДНК, ДНК-белок сшивки), увеличение которого свидетельствует о повышении риска возникновения различных заболеваний. Для его выполнения достаточно небольших объемов (≈ 30 мкл) цельной крови, что позволяет считать его одним из наиболее перспективных методов для первичной оценки генотоксического действия вредных химических факторов на геном человека.

Поскольку в клетках существуют специальные системы для репарации повреждений ДНК, которые происходят постоянно в нормальных клетках за счет действия экзогенных и эндогенных факторов, для оценки успешности репарации при дополнительной нагрузке, связанной с генотоксическим действием ксенобиотиков и для регистрации нерепарированных мутаций одновременно с методом ЩЭЕК необходимо выполнять микроядерный тест. Для проведения микроядерного теста с помощью флуоресцентного метода Хаяши достаточно 5-7 мкл периферической крови. На препаратах, приготовленных для микроядерного теста можно дополнительно оценить относительное содержание ретикулоцитов, характеризующее состояние эритропоэза.

Цель исследования. Оценка генотоксического действия газосварочных аэрозолей на людях, профессионально связанных со сварочными работами, с помощью одновременной регистрации степени повреждения ядерной ДНК лейкоцитов и частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах периферической крови.

Материалы и методы

Для проведения обследования по оценке состояния генома людей были сформированы две группы: группа испытуемых – из профессиональных сварщиков, имеющих длительный стаж работы, или людей, работавших в сварочном цеху и также подвергавшихся действию сварочных аэрозолей, и контрольная группа – из людей, не

имевших постоянного контакта в быту и на работе с действием вредных химических факторов, обладающих генотоксическим действием.

Участники обеих групп в устной форме были протестированы по ранее разработанной анкете, в которой учитывали различные аспекты: производственный (профессия, наличие вредных факторов, стаж, физические нагрузки), медико-биологический (возраст, отягощенность анамнеза, наличие хронических заболеваний) и социальный (образ жизни, условия проживания, наличие вредных привычек). Все участники обследования были проинформированы о проведении исследований и дали добровольное письменное согласие на участие в них.

Сначала были сформированы две группы из 17 человек каждая. Группы статистически не отличались между собой по полу пациентов, их возрасту и соотношению курящих/некурящих (критерий хи-квадрат). Впоследствии контрольная группа была расширена до 30 участников для расчета референтных интервалов степени спонтанного повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах и частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах периферической крови.

Венозную кровь забирали в вакуумные пробирки с гепарином натрия Vacutest Kima (4 мл) и немедленно смешивали восьмикратным вращением с антикоагулянтом. Конечная концентрация гепарина – 25 ед./мл.

Оценка степени повреждения ДНК. Степень повреждения ДНК в лейкоцитах цельной крови определяли с помощью метода ЩЭЕК [2].

Аликвоты крови от каждого участника обследования объемом 10 мкл смешивали со 150 мкл 0,5 % раствором агарозы с низкой точкой гелеобразования $< 30^{\circ} \text{C}$ (A4018, Sigma), предварительно растворенной на водяной бане при 100°C и охлажденной до 37°C . 30 мкл суспензии помещали на стекла, предварительно покрытые с одного конца 0,75 %-ным водным раствором агарозы с нормальной точкой гелеобразования – 37°C , и накрывали покровным стеклом. Для каждого пациента изготавливали не менее трех препаратов. Освобожденные от стекол препараты лизировали в течение 2 ч при 4°C в растворе следующего состава: 2,5 моль/л NaCl, 100 ммоль/л Na_2 -ЕДТА, 1%-ный тритон X-100 и 10%-ный ДМСО, 10 ммоль/л триса, pH 10–10,5. Затем стекла помещали в камеру, заполненную раствором для электрофореза (300 ммоль/л натрия гидроксида; 1 ммоль/л двунатриевой соли ЭДТА). Денатурацию ДНК проводили в течение 30 мин. Эти процедуры выполняли при слабом желтом освещении. Электрофорез проводили при напряженности поля 0,99 В/см и силе тока 350 мА в течение 30 мин. После окончания

электрофореза предметные стекла промывали нейтрализующим раствором и затем фиксировали в 70%-ном и 96%-ном спирте. После подсушивания препараты окрашивали водным раствором бромистого этидия.

Степень повреждения определяли с помощью компьютерной программы CASP (Польша) по относительному содержанию ДНК в хвосте. С каждого препарата случайным образом с помощью высокочувствительной черно-белой камеры при постоянных установках получали не менее 50 изображений нуклеоидов. Из трех рассчитанных для каждого стекла средних значений вычисляли среднюю, определяющую степень повреждения ядерной ДНК каждого человека.

Микроядерный тест и определение относительного содержания ретикулоцитов. Частоту встречаемости микроядер в ретикулоцитах определяли с помощью флуоресцентного метода после окраски акридиновым оранжевым [3].

Аликвоту крови (7 мкл) помещали на нагретые до 37° С предварительно покрытые акридиновым оранжевым стекла, закрывали покровным стеклом и центрифугировали на цитоцентрифуге CytoTek (Sakura, Япония) при 1000 об/мин в течение 10 мин. Затем препараты заклеивали с помощью лака и помещали в герметической коробке в холодильник. Препараты пригодны для исследования в течение 5 суток. Для каждого обследованного участника изготавливали по два препарата.

Для определения частоты встречаемости микроядер на каждом препарате просматривали не менее 2000 ретикулоцитов с объективом 40х и окулярах 15х, в случаях, если не было обнаружено ни одного микроядра, просмотр продолжали до нахождения микроядра, но не более 4000 ретикулоцитов. Частоту встречаемости микроядер рассчитывали в процентах, исходя из количества просмотренных ретикулоцитов. Затем из результатов анализа двух препаратов, рассчитывали среднюю величину частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах.

Относительное содержание ретикулоцитов определяли на этих же препаратах, для чего фотографировали по диагонали препарата 5 полей с объективом 40х, в которых подсчитывали количество ретикулоцитов (РТ) и эритроцитов (Э). Относительное содержание ретикулоцитов в каждом поле рассчитывали по формуле $[РТ/(Э + РТ)] * 100$. После получения средних величин для препарата, рассчитывали среднюю величину для каждого участника обследования из двух препаратов.

Определение концентрации марганца. Концентрацию марганца в цельной крови определяли с помощью метода атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре

МГА-915 с электротермической атомизацией. Для определения содержания марганца в качестве атомизатора использовали пирографитовую печь Массмана.

Исходные пробы крови перед анализом разбавляли в 10 раз бидистиллированной водой [4].

Статистическая обработка. Сравнение рядов данных, полученных в разных группах, осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Различия считали достоверными, если полученный уровень значимости был меньше 0,05.

Референтные интервалы рассчитывали, как 95%-ный центральный диапазон данных в контрольной группе ($n \geq 30$) с использованием в качестве пределов 2,5% и 97,5% процентиля.

Результаты

Спонтанная степень повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах периферической крови участников обследования контрольной группы составила $2,16 \pm 0,27\%$ ДНК в хвосте кометы, количество ретикулоцитов с микроядрами – $0,02 \pm 0,01\%$ (таблица). Эти два параметра были корреляционно связаны. Ранговый коэффициент корреляции Спирмана (R) – 0,504, $p = 0,0397$. Известно, что повреждения ДНК, регистрируемые с помощью метода ЩЭЕК, могут быть исправлены с помощью специализированных систем репарации клеток. Нерепарированные изменения являются основой мутаций, регистрируемых другими методами. В литературе существуют противоречивые данные о прямой зависимости этих двух параметров. Наличие такой корреляции в контрольной группе участников обследования, по-видимому, объясняется преимущественно эндогенной природой этих спонтанных нарушений.

В группе испытуемых участников обследования степень повреждения ДНК в ядрах лейкоцитов, частота встречаемости микроядер в ретикулоцитах и концентрация марганца в крови увеличиваются (таблица, рисунок).

Несмотря на однонаправленное изменение степени повреждения ДНК и концентрации марганца в крови по средним значениям в группе испытуемых, между этими параметрами обнаружена отрицательная корреляционная зависимость ($R = -0,437$, $p=0,039$), что совпало с данными, полученными в одной работе при исследовании генотоксического действия сварочных аэрозолей [5].

Таблица – Степень повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах, частота встречаемости микроядер в ретикулоцитах и содержание марганца в крови пациентов

Группы	Степень повреждения ДНК, %	Число ретикулоцитов с микроядрами, %	Концентрация марганца, мкг/л	Пол: муж./жен.	Возраст, лет	Некурящие/курящие
Контрольная, n = 17	2,16 ± 0,27	0,02 ± 0,01	9,0 ± 1,0	9/8	49,9	12/5
Испытуемые, n = 17	3,58 ± 0,31 p = 0,0019	0,08 ± 0,03 p = 0,0035	20,1 ± 2,0 p = 0,000039	14/3 p = 0,067	52,8	8/9 p = 0,1634
Примечание – сравнение данных между контрольной группой и группой испытуемых выполняли с помощью непараметрического критерия Манн–Уитни, для сравнения групп по полу и некурящие/курящие использовали критерий хи-квадрат.						

Частота встречаемости микроядер в ретикулоцитах у участников обследования в испытуемой группе также увеличивалась, при этом корреляционная связь со степенью повреждения ДНК в отличие от контрольной группы отсутствовала (таблица).

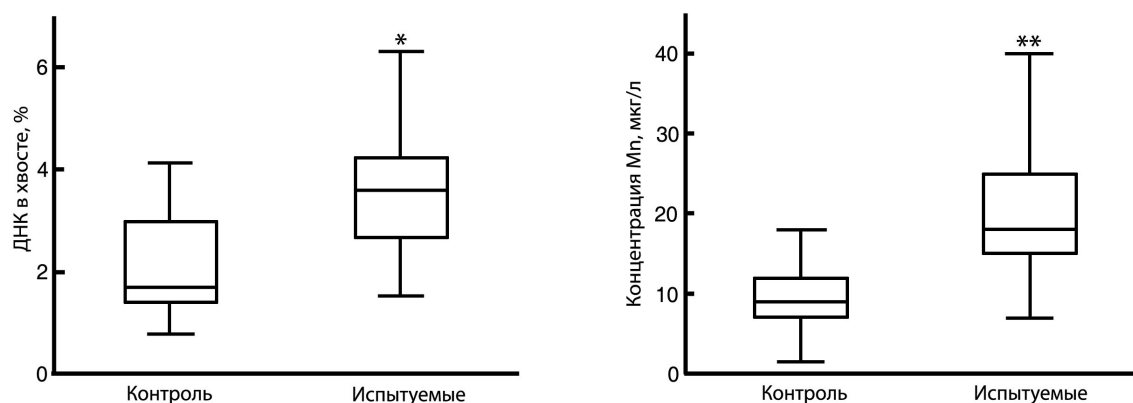


Рисунок – Степень повреждения ДНК в лейкоцитах и концентрация марганца в цельной периферической крови у пациентов двух групп.

Прямоугольники – 25 и 75% процентиля, вертикальные отрезки – 2,5 и 97,5% процентиля. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,0001$ (критерий Манн–Уитни). Горизонтальная черта в прямоугольниках – медиана.

Относительное содержание ретикулоцитов в обеих группах было равным (в контрольной группе $0,93 \pm 0,07 \%$; в группе испытуемых $1,00 \pm 0,07 \%$), что свидетельствует об отсутствии выраженного цитотоксического действия сварочных аэрозолей на гемопоэз.

Для определения референтных интервалов величины спонтанного повреждения ядерной ДНК лейкоцитов, частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах и концентрации марганца в крови количество участников обследования в контрольной группе было увеличено до 30 человек. Величины референтных интервалов нормы составили $0,78 \div 4,14 \%$ для спонтанных повреждений ядерной ДНК в лейкоцитах, $0 \div 0,17 \%$ – частота встречаемости микроядер в ретикулоцитах и $1,6 \div 27,0$ мкг/л – концентрация марганца в цельной крови.

У 17,6 % пациентов из группы испытуемых были отмечены значения показателей, превышавшие максимум референтного интервала по концентрации в крови марганца, у 23,5% – по степени повреждения ядерной ДНК лейкоцитов и 11,8% – по количеству микроядер в ретикулоцитах.

Ранее нами было показано, что высокие концентрации хлористого марганца при внутрибрюшинном введении белым крысам вызвали значимое увеличение степени повреждения ядерной ДНК и частоты встречаемости микроядер в клетках периферической крови [6]. Отрицательная корреляция между степенью повреждения ДНК и содержанием ионов марганца в крови у людей, входящих в группу испытуемых, демонстрирует, что небольшое увеличение концентрации марганца обладает защитным действием, возможно за счет увеличения антиоксидантной защиты клеток [7, 8].

Известно, что в состав аэрозолей, выделяемых при сварочных и газорезательных работах, кроме марганца входят и другие тяжелые металлы: хром, никель, кадмий, кобальт, свинец, молибден и железо. По-видимому, генотоксическое действие сварочных аэрозолей определяют другие металлы (свинец, кобальт, никель и алюминий), содержащиеся в сварочных аэрозолях, или их сочетанное действие. Сочетанное действие этих металлов может снижать их критическую концентрацию для каждого металла, способную вызывать повреждение ядерной ДНК [5].

Полученные данные о статистически значимом увеличении степени повреждения ядерной ДНК лейкоцитов и частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах крови испытуемых участников обследования свидетельствуют о генотоксическом действии газосварочных аэрозолей. Использование малоинвазивного комплексного метода (ЩЭЕК

и микроядерный тест) представляется перспективным для первичной оценки состояния генома людей, работающих в условиях повышенного действия вредных химических факторов или проживающих в экологически загрязненных районах.

Выводы

1. Профессиональное воздействие газосварочных аэрозолей оказывает генотоксическое действие на клетки периферической крови и/или их предшественников.
2. Увеличение концентрации марганца в периферической крови людей, подверженных действию газосварочных аэрозолей, оказывает защитное действие. Генотоксическое действие связано с другими металлами, входящими в состав сварочных аэрозолей.
3. Использование малоинвазивного комплексного метода (ЩЭК и микроядерного теста) является перспективным для первичной оценки состояния генома людей, профессионально связанных с действием тяжелых металлов, входящих в состав газосварочных аэрозолей.

Литература

1. Norbury C. J., Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis // *Oncogene* – 2004 – Vol.23 – P. 2797-2808.
2. Петров А. Н., Томилин Н. В., Филько О. А., Храброва А. В., Соловьева Н. Е., Иванова Т. М., Шестова Г. В., Сизова К. В., Черняк Т. Ф., Рутковский Г. В., Глушков Р. К., Иваненко А. А., Соловьев Н. Д. Оценка степени повреждения ядерной ДНК в клетках периферической крови человека с помощью щелочного электрофореза единичных клеток при медицинских осмотрах работников, профессионально связанных с воздействием токсичных металлов // Методические рекомендации ФМБА России МР 12-37, Москва. – 2011. – 26 с.
3. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides // *Mutat. Res.* – 1990. – Vol. 245 (4) – P. 245-249.
4. Глушков Р. К., Иваненко А. А., Иваненко Н. Б., Рутковский Г. В. Методика выполнения измерений массовой концентрации марганца, алюминия, хрома и титана в крови и плазме крови человека атомно-абсорбционным методом // Методические указания по методам контроля, МУК 4.1.046-08, Москва. – 2008. – 15 с.

5. Botta C., Iarmarcovai G., Chaspoul F., et al. Assesment of occupational exposure to welding fumes by inductively coupled plasma-mass spectroscopy and by the alkaline Comet assay // [Environ Mol Mutagen](#). – 2006. – Vol. 47(4) – P. 284-295.

6. Томилин Н. В., Петров А. Н., Филько О. А., Храброва А. В., Соловьева Н. Е., Рутковский Г. В., Глушков Р. К., Соловьев Н. Д. Исследование генотоксического действия марганца и кадмия в лейкоцитах периферической крови белых крыс. Химическая и биологическая безопасность. Специальный выпуск, посвященный Федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 годы)». ФМБА. М. Кириллица, 2012. – С. 8-14.

7. Oberlay L. W. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression // Biomed. Pharmacother. – 2005. – Vol. 59(4). – P. 143-148.

8. [Day B. J.](#), [Kariya C.](#) A novel class of cytochrome P450 reductase redox cyclers: cationic manganoporphyrins // Toxicol. Sci. – 2005. – Vol. 85(1) – P. 713-719.