

УДК 575.113:615.916'149

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ И УРОВНИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У НАСЕЛЕНИЯ В РАЙОНЕ ДОБЫЧИ И ПЕРЕРАБОТКИ РТУТЬСОДЕРЖАЩИХ РУД

© 2016 г. Н. Н. Ильинских, *Е. Н. Ильинских, **И. Н. Ильинских, **О. В. Гвоздарева

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

**Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Цель работы заключалась в оценке связи между частотой лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями, полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз (GST) и концентрацией ртути (Hg) в периферической крови у рабочих ртутного производства, а также у местного населения (контроль) с. Акташ Республики Алтай. У 184 рабочих и 156 контрольных лиц были взяты образцы венозной крови для хромосомного анализа, определения концентрации Hg и полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 с помощью полимеразной цепной реакции. Для статистического анализа применялся t-критерий Стьюдента, однофакторная ANOVA и линейная регрессия. Установлено значительное повышение уровня клеток с анеуплоидией и полиплоидией в крови рабочих по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Наиболее высокие уровни клеток с анеуплоидией и полиплоидией были определены в подгруппе рабочих, имеющих двойной делеционный GSTM1(0)/GSTT1(0) генотип ($p < 0,01$ и $p < 0,05$). Установлены статистически значимые зависимости числа гипоплоидных и полиплоидных клеток в крови от нулевых вариантов генов GSTM1, GSTT1 и концентрации Hg ($p < 0,001$). Кроме того, не было обнаружено связи между уровнями хроматидных и хромосомных aberrаций и полиморфизмом генов GSTM1 и GSTT1 ($p > 0,05$).

Ключевые слова: ртуть, полиморфизм генов, GSTM1, GSTT1, анеуплоидия, полиплоидия, хромосомные aberrации

GENE POLYMORPHISMS, MERCURY CONCENTRATION, AND CYTOGENETIC DAMAGE IN THE INHABITANTS OF THE MERCURY ORE MINING AND RECYCLING AREA

N. N. Ilyinskikh, *E. N. Ilyinskikh, **I. N. Ilyinskikh, **O. V. Gvozdareva

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "National Research Tomsk State University" of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation; *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "National Research Tomsk Polytechnic University" of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation; **State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education "Siberian State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Tomsk, Russia

The aim of the study was to evaluate the association between the frequency of cytogenetically damaged lymphocytes, glutathione-S-transferase (GST) gene polymorphisms, and mercury concentrations in the peripheral blood of mercury industry workers as well as a non-exposed local population (control group) of Aktash village, the Republic of Altay. The venous blood samples were obtained from 184 workers and 156 controls for chromosome assay, mercury blood concentration analysis, and the GSTM1 and GSTT1 gene polymorphism assessment by a polymerase chain reaction approach. Statistical analyses were carried out using Student's t-test, one-way ANOVA, or linear multiple regression. We demonstrated a significant increase in the frequency of lymphocytes with aneuploidy and polyploidy in the workers as compared with the controls ($p < 0.001$). The highest levels of aneuploid and polyploid lymphocytes were determined in the subgroup of workers with double null GSTM1(0)/GSTT1(0) genotype ($p < 0.01$ or $p < 0.05$). The study revealed significant relationship between the levels of hypoploid and polyploid lymphocytes according to GSTM1 or GSTT1 genotypes and mercury concentrations ($p < 0.001$). In addition, we found no difference in the levels of chromatid and chromosome aberrations according to GSTM1 or GSTT1 genotypes ($p > 0.05$).

Keywords: mercury, gene polymorphism, GSTM1, GSTT1, aneuploidy, polyploidy, chromosomal aberrations

Библиографическая ссылка:

Ильинских Н. Н., Ильинских Е. Н., Ильинских И. Н., Гвоздарева О. В. Полиморфизм генов, содержание ртути и уровни цитогенетических нарушений у населения в районе добычи и переработки ртутьсодержащих руд // Экология человека. 2016. № 5. С. 17–23.

Ilyinskikh N. N., Ilyinskikh E. N., Ilyinskikh I. N., Gvozdareva O. V. Gene Polymorphisms, Mercury Concentration, and Cytogenetic Damage in the Inhabitants of the Mercury Ore Mining and Recycling Area. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2016, 5, pp. 17-23.

На территории Республики Алтай имеются биогеохимические провинции с высоким содержанием ртути вблизи с. Акташ Улаганского района [5]. Основанное в 1942 году, в настоящее время ГУП «Акташское горнометаллургическое предприятие» (АГП) является единственным в России предприятием, где производят металлическую ртуть. За длительный период работы предприятия на участке АГП накопились большие объемы разнообразных ртутьсодержащих отходов, которые являются источником загрязнения тяжелыми металлами природных вод и почв [5].

Ртуть представляет собой токсичный металл, который поражает различные органы и системы организма, а также вызывает гено- и цитотоксичные эффекты у людей, особенно употребляющих в пищу рыбу, проживающих на загрязненной территории или у работников ртутных производств [1, 10, 19].

В настоящее время доказано, что как неорганическая ртуть, так и метилртуть способны взаимодействовать с глутатионом, опосредовано через реакцию, катализируемую глутатион-S-трансферазами [11]. Поэтому у лиц, подвергшихся воздействию ртути и

имеющих делеционные варианты генов GSTM1 и GSTT1, происходит замедление процессов элиминации ртути, повышение её биоаккумуляции и индукции оксидативного стресса [11].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке связи между частотой выявляемых лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями, полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз и концентрацией ртути в периферической крови у рабочих, занятых на производстве и утилизации ртутьсодержащих материалов, и у местного населения, проживающего в зоне ртутной геологической аномалии (контроль).

Методы

Отбор участников для специально организованного массового скринингового исследования осуществлялся методом простой случайной выборки среди работников АГП или жителей с. Акташ в течение лета 2009 года. Объектом исследования были 184 человека мужского пола в возрасте ($39,61 \pm 0,83$) года, занятых выполнением современных видов механизированного физического труда на АГП. В качестве контроля проведено обследование 156 человек (в возрасте ($38,3 \pm 0,68$) года), жителей с. Акташ (Улаганский район, Республика Алтай), непосредственно не связанных с процессом производства или утилизации ртути. Группы были сопоставимы по возрасту, этнической принадлежности (преимущественно славянских национальностей и коренной народности алтайцев), образованию, пристрастию к курению и алкоголю. Предварительно у каждого обследованного было взято информированное согласие. Критериями включения потенциальных участников в исследование были мужской пол, возраст от 25 до 55 лет, стаж работы на предприятии (для группы рабочих) не менее одного года, а критериями исключения — возраст 56 лет и более, работа на других вредных и опасных производствах в анамнезе, любые рентгенологические обследования в течение последних 3–4 месяцев. Взятие 20 мл венозной крови проводилось опытной медсестрой на базе межрайонной больницы. Образцы цельной крови использовались для изготовления препаратов хромосомного анализа, детекции концентрации ртути и определения полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков GSTM1 и GSTT1. Каждый участник ответил на вопросы анкеты, касающиеся возраста, этнической принадлежности, профессионального маршрута, пристрастия к курению, алкоголю, предпочтений в питании, наличия заболеваний и места жительства. Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации 1975 года и её пересмотра 1983 года.

Делеционные варианты генов GSTM1 (GenBank № X68676) и GSTT1 (GenBank № AP000351) были идентифицированы в мультиплексной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) [7]. ДНК выделяли из образцов периферической крови, хранившихся при температуре 20 °С, согласно стандартному протоколу. В амплификационную пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты каждого из указанных генов. В данной работе использовали амплификато-

ры «Терцик» («ДНК-Технология», РФ). Разделение продуктов амплификации и продуктов рестрикции ампликонов проводили в горизонтальном 3 % агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм). Нормальные аллели генов, обозначенные знаком «+», характеризуются присутствием ПЦР-продуктов для генов GSTM1(+) или GSTT1(+), что свидетельствует о том, что данный донор либо гетерозиготен, либо гомозиготен по отсутствию делеции в указанных генах. В то же время генотип GSTM1(0) или GSTT1(0) означает отсутствие на электрофореграмме фрагментов размером 215 и 480 пар оснований, что говорит о том, что данный индивидуум гомозиготен по делециям этих генов.

Для хромосомного анализа культуральная смесь состояла из 0,5 мл цельной гепаринизированной крови и 5 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», РФ) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma Aldrich Co.», США), антибиотиков (100 МЕ/мл бензилпенициллина и 100 мкг/мл гентамицина) и фитогемагглютинина (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл («ПанЭко», г. Москва, РФ). Культуральную смесь разливали по флаконам по 2 мл в каждом (около $1,0 \times 10^6$ клеток/мл), которые инкубировали в термостате в присутствии 5 % CO₂ при 37 °С в течение 52 ч. Колхицин («Sigma Aldrich Co.», США) добавляли в культуры за 2 ч до фиксации клеток в концентрации 0,5 мкг/мл культуральной смеси. После чего готовили хромосомные препараты стандартным способом [4, 16]. Клетки фиксировали в трех сменах охлажденной смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (в соотношении 3 : 1). Препараты подсушивали над пламенем горелки без воспламенения фиксатора и окрашивали азур II-эозином. У каждого человека или варианта опыта в условиях *in vitro* анализировали не менее 200 метафаз. Изучение хромосом проводили при увеличении 10 × 100 с помощью микроскопа «Prima Star iLED» («Carl Zeiss», Германия), оснащенного цифровой камерой «AxioCam» («Carl Zeiss», Германия). Метафазные пластинки с цитогенетическими нарушениями фотографировали при помощи цифровой камеры, переносили полученные изображения в компьютер и анализировали с помощью программы «AxioVision» модуль «Caruo» для кариотипирования. При анализе учитывали все типы структурных aberrаций хромосом (кроме гепов), а также клетки с полиплоидией и анеуплоидией (гипоплоидией и гиперплоидией).

Для определения содержания ртути в крови был использован метод инструментального нейтронно-активационного анализа (ИНАА) [3]. Пробы крови маркировались, высушивались в муфельной печи до твердого состояния, истирались в порошок и упаковывались в фольгу. Облучение проб осуществлялось на базе исследовательского ядерного реактора НИИ ядерной физики при Национальном исследовательском Томском политехническом университете (ТПУ).

Согласно Комиссии по токсикологии Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC

Commission of Toxicology) фоновое содержание ртути в крови человека составляет от 4 до 14 мкг/л, а первые признаки легкого ртутного отравления выявляются при дозе 18–22 мкг/л [9]. В связи с этим нами проведена оценка уровней цитогенетических нарушений в зависимости от содержания ртути в крови: 1-я подгруппа доноров имела содержание ртути ≤ 14 мкг/л, 2-я – от 15 до 17 мкг/л, 3-я ≥ 18 мкг/л.

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакетов статистических программ Statistica 6.0 [2, 6]. Проведенное нами тестирование закона распределения при помощи критерия Колмогорова – Смирнова не выявило отличий от нормального. Для сравнения средних случайных величин, полученных в выборках рабочих и контроля, применялся t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Кроме того, для сравнения средних величин двух или нескольких групп, полученных из одной выборки, применялся модуль однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, где в качестве группирующих переменных были использованы низкие (≤14 мкг/л), средние (15–17 мкг/л) и повышенные концентрации (≥18 мкг/л) ртути в крови обследованных (код – 0, 1, 2), а также четыре сочетания (код – 0, 1, 2, 3) вариантов генов GSTM1 и GSTT1 (GSTM1(0)/GSTT1(0); GSTM1(+)/GSTT1(0); GSTM1(0)/GSTT1(+); GSTM1(0)/GSTT1(+) или GSTM1(+)/GSTT1(+)). Различия сравниваемых результатов ($M \pm m$ где M – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Влияние содержания ртути в крови или полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 на уровни клеток с цитогенетическими нарушениями в периферической крови рабочих были изучены с по-

мощью модуля линейной множественной регрессии: β – стандартизованный коэффициент регрессии, SE (β) – стандартная ошибка β [6].

Результаты

Сравниваемые группы рабочих и контроля существенно не отличались по возрасту ($p = 0,163$). Частота гомозигот по делеции генов GSTM1 (45,7 % против 48,7, $\chi^2 = 0,32$, $p = 0,572$) и GSTT1 (39,1 % против 41,0, $\chi^2 = 0,13$, $p = 0,722$) также не имела достоверных отличий между группами рабочих и контроля. Концентрация ртути в образцах цельной крови рабочих была существенно выше по сравнению с контрольной группой – ($18,67 \pm 0,94$) мкг/л против ($11,98 \pm 0,62$), $p < 0,001$.

Результаты хромосомного анализа (табл. 1) показали значительное повышение уровня клеток с различными типами цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови рабочих по сравнению с контрольной группой – ($16,37 \pm 0,43$) % против ($9,81 \pm 0,25$), $p < 0,001$. Вместе с тем статистически значимых отличий частоты клеток с различными типами структурных нарушений хромосом в крови между группами рабочих и контроля доказано не было – ($4,68 \pm 0,16$) % против ($4,38 \pm 0,17$), $p = 0,207$. Это не было установлено как в отношении хроматидных ($4,29 \pm 0,16$) % против ($3,93 \pm 0,15$), $p = 0,106$, так и хромосомных ($0,71 \pm 0,07$) % против ($0,66 \pm 0,06$), $p = 0,621$, aberrаций. Более того, линейный регрессионный анализ (табл. 2) показал отсутствие зависимости между полиморфизмом генов GSTM1 и GSTT1 или концентрацией ртути и числом клеток с хроматидными или хромосомными нарушениями в периферической крови обследованных рабочих ($p > 0,05$).

Таблица 1

Частота лимфоцитов с хромосомными нарушениями в периферической крови рабочих, занятых в производстве и утилизации ртути, и контрольной группы в зависимости от различных сочетаний вариантов генов биотрансформации GSTM1 и GSTT1 ($M \pm m$)

Частота клеток, %	Сочетания активных (+) или неактивных (0) вариантов генотипов GSTM1 / GSTT1 у рабочих и контроля			
	GSTM1 (0) GSTT1 (0)	GSTM1 (+) GSTT1 (0)	GSTM1 (0) GSTT1 (+)	GSTM1 (+) GSTT1 (+)
	n=26 (24)*	n=46 (41)	n=58 (48)	n=54 (41)
С хроматидными aberrациями	4,23±0,34 (4,01±0,39)*	4,34±0,32 (3,78±0,28)	4,14±0,29 (3,91±0,34)	4,46±0,31 (3,85±0,30)
с фрагментами	4,20±0,33 (3,97±0,37)	4,31±0,31 (3,76±0,28)	4,06±0,27 (3,88±0,32)	4,43±0,30 (3,82±0,29)
с обменами	0,03±0,01 (0,02±0,01)	0,03±0,02 (0,01±0,01)	0,04±0,02 (0,02±0,01)	0,03±0,01 (0,02±0,01)
С хромосомными aberrациями	0,81±0,18 (0,70±0,15)	0,72±0,12 (0,63±0,10)	0,59±0,10 (0,61±0,11)	0,78±0,13 (0,71±0,14)
Всего со структурными aberrациями хромосом	5,01±0,40 (4,70±0,43)	4,89±0,29 (4,26±0,30)	4,10±0,28 (4,50±0,35)	4,98±0,30 (4,19±0,31)
С анеуплоидным набором хромосом	9,11±0,79* (4,20±0,26)	6,47±0,69** (3,18 ±0,22)^	5,81±0,39** (3,19±0,19)^	3,52±0,24** (2,05±0,22)^
С полиплоидным набором хромосом	8,00±0,65* (3,21±0,35)	6,39±0,63* (2,19±0,29)^	5,02±0,39** (2,41±0,23)^	2,22±0,27** (1,17±0,15)^
Всего с цитогенетическими нарушениями	22,11±0,62* (12,10±0,31)	17,74±0,51** (9,62±0,27)^	14,92±0,36** (10,10±0,28)^	10,70±0,25** (7,41 ±0,23)^

Примечание. Все значения для контроля приведены в скобках; значимые отличия показателей отмечены знаками: «*» ($p < 0,001$) в группе рабочих от контроля; «^» ($p < 0,001$) у лиц с двойным активным (+/+) или смешанным (+/0 или 0/+) вариантами генотипа GSTM1/GSTT1 от показателей у лиц с двойным нулевым генотипом GSTM1(0) /GSTT1(0).

Таблица 2

Влияние полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* и концентрации ртути на частоту лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями в периферической крови у рабочих ($n = 184$), занятых производством и утилизацией ртутьсодержащих материалов: линейный регрессионный анализ

Частота клеток, %	<i>GSTM1</i> * (+ vs 0)			<i>GSTT1</i> (+ vs 0)			Ртуть, мкг/л		
	β^{**}	SE (β)	P	β	SE (β)	P	β	SE (β)	P
Полиплоидия	-0,241	0,071	<0,001	-0,432	0,067	<0,001	0,630	0,058	<0,001
Гипоплоидия	-0,255	0,071	<0,001	-0,349	0,069	<0,001	0,646	0,056	<0,001
Гиперплоидия	-0,113	0,073	0,125	-0,076	0,074	0,304	0,204	0,072	0,005
Хроматидные aberrации	0,056	0,074	0,445	-0,002	0,074	0,973	-0,029	0,074	0,697
Хромосомные aberrации	0,056	0,074	0,447	-0,041	0,074	0,576	-0,022	0,074	0,762

Примечание. * – *GSTM1* и *GSTT1* генотипы были рассмотрены как дихотомные показатели: значение «1» соответствовало *GSTM1*(+) или *GSTT1*(+), а значение «0» – *GSTM1*(0) или *GSTT1*(0). ** – β – стандартизованный коэффициент регрессии, SE (β) – стандартная ошибка β .

В то же время частота клеток с измененным числом хромосом (анеуплоидией и полиплоидией) в периферической крови рабочих была значительно выше, чем в контроле (для анеуплоидии ($5,77 \pm 0,28$) % против ($3,04 \pm 0,12$), $p < 0,001$; для полиплоидии – ($4,95 \pm 0,27$) % против ($2,14 \pm 0,14$), $p < 0,001$) (см. табл. 1). Наиболее высокие уровни клеток с анеуплоидией и полиплоидией были установлены в подгруппе рабочих, имеющих сочетание нулевых генотипов *GSTM1*(0) и *GSTT1*(0), как по сравнению с подгруппой с активными вариантами генов *GSTM1*(+) и *GSTT1*(+) ($p < 0,001$ для анеуплоидии и полиплоидии), так и по сравнению со смешанными генотипами *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0) или *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+) ($p = 0,002$ и $p < 0,001$ для анеуплоидии и $p = 0,041$ и $p < 0,001$ для полиплоидии соответственно). Кроме того, в контроле (см. табл. 1) также были определены статистически значимые отличия числа клеток с анеуплоидией и полиплоидией в периферической крови лиц, имеющих неактивные аллели *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0), от подгрупп, обладающих функционально активными вариантам обоим этим генам *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+) ($p < 0,001$) или от лиц-носителей разных комбинаций делеционных и активных их аллелей ($p = 0,004$ и $p = 0,003$ для анеуплоидии и $p = 0,012$ и $p = 0,044$ для полиплоидии).

В табл. 3 показано влияние полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* и содержания ртути в крови на частоту анеуплоидных и полиплоидных лимфоцитов в периферической крови рабочих и группы контроля. Установлено, что в отличие от частоты гиперплоидных лимфоцитов уровни гипоплоидных и полиплоидных клеток у рабочих были значительно выше по сравнению с соответствующими значениями в контроле. У рабочих, имеющих генотип *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0), при различных уровнях содержания ртути в крови (менее 14 мкг/л, 15–17 мкг/л и более 18 мкг/л) число гипоплоидных ($p = 0,037$, $p = 0,021$ и $p < 0,001$) и полиплоидных ($p = 0,003$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$) клеток было значимо выше, чем в контроле. Аналогичные достоверные отличия уровней гипо- и полиплоидных клеток между группами рабочих и контроля были установлены для других сочетаний генов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0) и *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+)

(варьируя от $p = 0,022$ до $p < 0,001$). В то же время частота гиперплоидных клеток в периферической крови рабочих не имела значимых отличий от соответствующих значений в контроле (варьируя от $p = 0,841$ до $p = 0,059$).

Анализ показал, что для лиц-носителей генотипов *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0) и *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+) в подгруппе рабочих, имеющих низкий уровень ртути в крови (менее 14 мкг/л), число гипоплоидных клеток было существенно ниже, чем в подгруппах с уровнем ртути более 18 мкг/л ($p < 0,001$ во всех случаях). Частота полиплоидных клеток в подгруппах рабочих, имеющих эти генотипы, при средних (от 15 до 17 мкг/л) или высоких (более 18 мкг/л) уровнях ртути в крови была значимо выше (варьируя от $p = 0,023$ до $p < 0,001$) по сравнению с лицами, имеющими относительно низкое содержание ртути (менее 14 мкг/л). В то же время частота гиперплоидных клеток имела существенные отличия в зависимости от содержания ртути в крови рабочих только у рабочих-носителей генотипов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0) ($p = 0,018$, $p = 0,023$) и *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+) ($p = 0,011$), но не генотипа *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0) ($p = 0,355$, $p = 0,961$).

В подгруппе рабочих, имеющих сочетание активных вариантов генов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+), статистически значимые отличия между лицами, имеющими низкие и высокие (или средние) концентрации ртути в крови, выявлены только в отношении частоты полиплоидных клеток ($p < 0,001$ и $p = 0,021$), но не числа гипоплоидных ($p = 0,076$, $p = 0,348$) или гиперплоидных лимфоцитов ($p = 0,849$, $p = 0,565$). Наиболее низкое число гипоплоидных и полиплоидных клеток было выявлено у рабочих, имеющих активные варианты генов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+), которое достоверно отличалось как при низком, среднем, так и высоком уровнях содержания ртути в крови от соответствующих значений у лиц, имеющих неактивные аллели *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0) ($p < 0,001$ во всех случаях).

Более того, в контрольной группе, представленной населением, проживающим на загрязненной территории, так же как и в группе рабочих, были выявлены статистически значимые отличия частоты гипоплоидных и полиплоидных клеток между лицами,

Таблица 3

Частота лимфоцитов с измененным числом хромосом в периферической крови рабочих ртутного производства и контрольной группы в зависимости от уровней содержания ртути в крови (≤ 14 , 15–17 или ≥ 18 мкг/л) и наличия у обследованных лиц различных сочетаний вариантов генов биотрансформации GSTM1 и GSTT1 ($M \pm m$)

Генотип	Ртуть, мкг/л п		Частота клеток, %			
			Гипоплоидия	Гиперплоидия	Полиплоидия	
GSTM1 (0) GSTT1 (0)	I	≤ 14	9 (9)*	5,22±1,02** (2,78±0,32)*	0,89±0,31 (0,78±0,22)	5,33±1,00* (1,56±0,34)
	II	15–17	6 (6)	7,50±1,31** (3,83±0,30)	1,33±0,21 (0,67±0,29)	8,00±0,68*## (4,02±0,45)#
	III	≥ 18	11 (9)	10,81±0,90*# (4,22±0,43)#	0,90±0,21 (0,78±0,22)	10,18±0,79*# (4,33±0,44)#
GSTM1(+) GSTT1 (0)	I	≤ 14	23 (17)	3,00±0,26* (1,82±0,26)	0,60±0,14 (0,59±0,12)	3,13±0,36* (0,76±0,26)
	II	15–17	10 (14)	5,40±1,13*# (2,85±0,35)#	1,40±0,40## (0,64±0,13)	7,80±1,08*# (2,43±0,39)#
	III	≥ 18	13 (10)	10,07±1,12*# (3,40±0,40)#	1,23±0,22## (0,80±0,20)	11,07±0,84*# (4,30±0,37)#
GSTM1 (0) GSTT1 (+)	I	≤ 14	22 (17)	3,41±0,33* (1,82±0,23)	0,72±0,15 (0,47±0,12)	3,04±0,55** (1,29±0,28)
	II	15–17	16 (13)	4,50±0,52* (2,53±0,31)	0,75±0,21 (0,69±0,17)	4,75±0,54*# (2,15±0,37)##
	III	≥ 18	20 (18)	6,60±0,49*# (3,61±0,30)#	1,45±0,34## (1,09±0,12)	7,40±0,48*# (3,67±0,29)#
GSTM1 (+) GSTT1 (+)	I	≤ 14	23 (16)	2,39±0,25* (0,93±0,17)	0,52±0,15 (0,25±0,11)	0,78±0,17 (0,37±0,13)
	II	15–17	19 (15)	3,05±0,33* (1,73±0,26)##	0,68±0,15 (0,33±0,13)	2,37±0,24**## (1,53±0,23)#
	III	≥ 18	12 (10)	3,83±0,56* (1,70±0,30)#	0,58±0,14 (0,70±0,15)##	4,67±0,66*# (1,90±0,27)#

Примечание. Все значения для контроля приведены в скобках; значимые отличия показателей отмечены знаками: «*» ($p < 0,01$) или «**» ($p < 0,05$) в группе рабочих от контроля; «#» ($p < 0,01$) или «##» ($p < 0,05$) в подгруппах II или III от подгруппы I.

имеющими низкий и высокий (или/и средний) уровни содержания ртути в крови для всех вариантов сочетания генов: GSTM1(+)/GSTT1(+) ($p = 0,042$, $p < 0,001$ для гипоплоидных клеток; $p = 0,0046$, $p < 0,001$ для полиплоидных клеток), GSTM1(0)/GSTT1(+) ($p < 0,001$, $p < 0,001$; $p = 0,039$, $p < 0,001$); GSTM1(+)/GSTT1(0) ($p = 0,009$, $p < 0,001$; $p < 0,001$, $p < 0,001$); GSTM1(0)/GSTT1(0) ($p = 0,005$, $p < 0,001$; $p < 0,001$, $p < 0,001$).

Результаты линейного множественного регрессионного анализа (см. табл. 2), отражающего влияние уровней содержания ртути в крови и полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 на частоту лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями в периферической крови рабочих, показали наличие достоверно значимых зависимостей числа гипоплоидных и полиплоидных клеток в крови от нулевых вариантов генов GSTM1, GSTT1 и концентрации ртути ($p < 0,001$). В то же время частота гиперплоидных клеток значимо зависела только от уровня содержания ртути в крови ($p = 0,005$), но не от полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

В настоящее время целый ряд исследований позволил доказать влияние соединений ртути на уровень цитогенетических нарушений в периферической крови людей, проживающих на загрязненной территории и употребляющих в пищу рыбу и другие местные продукты питания [10, 19]. В то же время результаты

изучения этой зависимости при обследовании рабочих, занятых на производстве и утилизации ртутьсодержащих материалов, носит противоречивый характер. В частности, по данным некоторых исследователей, у лиц, профессионально подвергшихся воздействию неорганических соединений ртути, было зафиксировано значимое повышение частоты структурных нарушений хромосом, анеуплоидии и клеток с микроядрами [8, 20]. В ряде других работ был получен отрицательный результат [14], что может быть связано с тем, что рабочие в большей степени подвергаются воздействию неорганической ртути и её паров на производстве, а в организм местного населения, проживающего на загрязненной территории, поступает в основном метилртуть и другие органические соединения этого тяжелого металла с продуктами питания. Известно, что только очень высокие дозы неорганической ртути индуцируют значимое повышение уровней клеток с хромосомными абберациями и микроядрами у человека [17]. Вместе с тем установлено, что в условиях как in vitro, так и in vivo даже относительно небольшие дозы метилртути индуцируют существенное увеличение числа клеток с полиплоидией, анеуплоидией, хроматидными разрывами и микроядрами в культурах лимфоцитов периферической крови человека [15, 17, 18].

В результате проведенного исследования, хотя нами не были выявлены статистически значимые отличия в отношении частоты структурных аббераций хромосом, было установлено статистически значимое

увеличение в периферической крови рабочих уровней лимфоцитов с полиплоидией и анеуплоидией, которые положительно коррелировали с содержанием ртути в цельной крови и полиморфизмом генов GSTM1 и GSTT1. Преобладание гипоплоидных клеток среди лимфоцитов с анеуплоидией в периферической крови рабочих может быть следствием не только артефактной утери хромосом в процессе изготовления препаратов, но и результатом утраты клетками микроядер, которые, как известно, формируются на стадии ана- и телофазы в результате либо структурных aberrаций хромосом, либо при патологических митозах [12].

В проведенном нами исследовании было показано, что не только рабочие, но и местное население, не связанное с производством ртути (контроль), имеет относительно высокие уровни содержания ртути в крови. Хотя у 68,7 % членов контрольной группы содержание ртути в крови не превышало фоновых значений (менее 14 мкг/л в подгруппе I и 15–18 мкг/л в подгруппе II), но у 30,1 % (47 человек) соответствовало состоянию легкого ртутного отравления (более 18 мкг/л подгруппа III). Поэтому не исключено, что отсутствие статистически значимых отличий частоты клеток со структурными aberrациями хромосом между группами рабочих и контроля может быть связано с относительно высоким содержанием этого тяжелого металла в организме людей из группы сравнения. Вместе с тем во всех трех подгруппах (I, II и III) средние уровни содержания ртути среди рабочих были существенно выше, чем в соответствующем контроле: $(8,96 \pm 0,41)$ мкг/л против $(2,69 \pm 0,21)$, $p < 0,001$; $(15,98 \pm 0,13)$ мкг/л против $(15,25 \pm 0,09)$, $p < 0,001$ и $(34,46 \pm 1,49)$ мкг/л против $(19,91 \pm 0,48)$, $p < 0,001$, что может свидетельствовать о том, что рабочие в отличие от контрольной группы подвергаются воздействию как метилртути, так и неорганической ртути, поступающих в организм из разных источников, как на производстве, так и с продуктами питания. Известно, что присутствие ртути, прежде всего метилртути, в продуктах питания свидетельствует о загрязнении территории ртутьсодержащими отходами. Изучение рациона питания у обследованных лиц позволяет заключить, что жители с. Акташ употребляют в пищу рыбу, отловленную в р. Ярлыамры, где концентрации ртути в донных осадках составляют 532–683 мг/кг [5].

В ряде эпидемиологических исследований лиц, подвергающихся воздействию соединений ртути, ранее было установлено, что наиболее высокие концентрации ртути в образцах волос или цельной крови были характерны для людей, имеющих сочетание делеционных вариантов генов GSTM1 и GSTT1 [11, 15]. Известно, что биоаккумуляция ртути может приводить к поражению нервной и мочевыделительной систем, врожденной патологии и злокачественным новообразованиям [13].

В настоящей работе у обследованных рабочих впервые была показана зависимость не только между

полиморфизмом генов глутатион S-трансферазы и содержанием ртути, но и между вариантами этих генов и уровнями клеток с цитогенетическими нарушениями (главным образом анеуплоидией и полиплоидией). Такого рода хромосомные нарушения, как полиплоидия и анеуплоидия, могут быть ассоциированы со спонтанными абортными, врожденными дефектами, клеточной трансформацией и процессом опухолевой прогрессии [12]. Поэтому носительство нулевых вариантов генов GSTM1 и GSTT1 можно рассматривать как фактор риска, свидетельствующий о повышенной чувствительности к воздействию соединений ртути.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке гранта РГНФ № 15-06-10190.

Список литературы

1. Арефьев А. С., Барыгина В. В., Зацепина О. В. Современные представления о влиянии соединений ртути на клеточном и системном уровне (обзор) // Экология человека. 2010. № 8. С. 35–41.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. С. 81–121.
3. Кист А. А. Феноменология биогеохимии и бионеорганической химии. Ташкент: Изд-во «Фан», 1987. 296 с.
4. Назаренко С. А., Васильева Е. О. Тест-система внешнего контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы: пособие для врачей. Томск: Печатная мануфактура, 2003. 34 с.
5. Робертус Ю. В., Пузанов А. В., Любимов Р. В., Архипов И. А. Экогеохимия ртути в природных средах и техногенных объектах района Акташского ГМП (Республика Алтай) // Мир науки, культуры, образования. 2010. № 2. С. 280–282.
6. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. М.: Бином-Пресс, 2008. С. 86–96, 15–163.
7. Abdel-Rahman S. Z., El-Zein R. A., Anwar W. A., Au W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies // Cancer Lett. 1996. Vol. 107, N 2. P. 229–233.
8. Barregard L., Hogstedt B., Schutz A., Karlsson A., Sallsten G., Thiringer G. Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei // Scand J Work Environ Health. 1991. Vol. 17, N 4. P. 263–268.
9. Cornelis R., Heinzow B., Herber R. F. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. IUPAC Commission of Toxicology // J. Trace Elem. Med. Biol. 1996. Vol. 10, N 2. P. 103–127.
10. Crespo-López M. E., Macêdo G. L., Arrifano G. P., Pinheiro Mda C., do Nascimento J. L., Herculano A. M. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations // Environ. Int. 2011. Vol. 37, N 1. P. 136–141.
11. Gundacker C., Komarnicki G., Jagiello P., Gencikova A., Dahmen N., Wittmann K. J. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria // Sci. Total Environ. 2007. Vol. 385, N 1–3. P. 37–47.
12. Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., De Boeck M., Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations // Mutation Research. 2002. Vol. 504, N 1–2. P. 137–148.

13. Lee B.-E., Hong Y.-C., Park H., Ha M., Koo B.S., Chang N., Roh Y.-M., Kim B.-N., Kim Y.-J., Kim B.-M., Jo S.-J., Ha E.-H. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight // *Environ. Health Perspect.* 2010. Vol. 118, N 3. P. 437–443.

14. Mabilite V., Roels H., Jacquet P., Leonard A., Lauwerys R. Cytogenetic examination of leukocytes of workers exposed to mercury vapor // *Int Arch Occup Environ Health.* 1984. Vol. 53, N 3. P. 257–260.

15. Mazzaron Barcelos G. R., de Marco K. C., Grotto D., Valentini J., Garcia S. C., Leite Braga G. Ú., Barbosa F. Jr. Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and methylmercury metabolism in an exposed Amazon population // *J Toxicol Environ Health A.* 2012. Vol. 75, N 16–17. P. 960–970.

16. Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M., Hungerford D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood // *Exp. Cell Res.* 1960. Vol. 20. P. 613–616.

17. Ogura H., Takeuchi T., Morimoto K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes // *Mutation Research.* 1996. Vol. 340, N 2–3. P. 175–182.

18. Silva-Pereira L. C., Cardoso P. C., Leite D. S., Bahia M. O., Bastos W. R., Smith M. A., Burbano R. R. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro // *Braz J Med Biol Res.* 2005. Vol. 38, N 6. P. 901–907.

19. Soto-Ríos M.L., Rothenberg S., Gonsebatt M.E., Talavera-Mendoza O. Cytogenotoxicity in uroepithelial cells of women exposed to mercury in a mining area // *Occup. Environ. Med.* 2010. Vol. 67, N 9. P. 620–624.

20. Verschaeve L., Tassignon J.-P., Lefevre M., De Stoop P., Susanne C. Cytogenetic investigation on leukocytes of workers exposed to metallic mercury // *Environ Mutagen.* 1979. Vol. 1, N 3. P. 259–268.

References

1. Aref'ev A. S., Barygina V. V., Zacepina O. V. Modern views on the impact of mercury compounds on cellular and systemic level (review). *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2010, 8, pp. 35-41. [in Russian]

2. Glanc S. *Mediko-biologicheskaya statistika* [Biomedical Statistics]. Moscow, Practice Publ., 1998, pp. 81-121.

3. Kist A. A. *Fenomenologiya biogeokhimii i bioorganicheskoy khimii* [Phenomenology of biogeochemistry and bioinorganic chemistry]. Tashkent, 1987, 296 p.

4. Nazarenko S. A., Vasil'eva E. O. *Test-sistema vneshnego kontrolya kachestva citogeneticheskikh issledovaniy v uchrezhdeniyakh mediko-geneticheskoy sluzhby: posobie dlya vrachey* [The test system of external quality control cytogenetic studies in health and genetic services: a manual for physicians]. Tomsk, Print Manufactory Publ., 2003, 34 p.

5. Robertus Ju. V., Puzanov A. V., Ljubimov R. V., Arhipov I. A. *Ecogeochemistry of mercury in the environment and technogenic facilities in the area of Aktash mining-metallurgical enterprises (Altai Republic). Mir nauki, kul'tury, obrazovaniya* [The World of Science, Culture, Education]. 2010, 2, pp. 280-282. [in Russian]

6. Halafyan A. A. *STATISTICA 6. Statisticheskii analiz dannykh. 3-e izd.* [STATISTICA 6. Statistical analysis of the data. 3rd ed.]. Moscow, 2008, pp. 86-96, 155-163.

7. Abdel-Rahman S. Z., El-Zein R. A., Anwar W. A., Au W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996, 107, 2, pp. 229-233.

8. Barregard L., Hogstedt B., Schutz A., Karlsson A.,

Sallsten G., Thiringer G. Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei. *Scand J Work Environ Health.* 1991, 17, 4, pp. 263-268.

9. Cornelis R., Heinzow B., Herber R. F. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. IUPAC Commission of Toxicology. *J Trace Elem Med. Biol.* 1996, 10, 2, pp. 103-127.

10. Crespo-López M. E., Macêdo G. L., Arrifano G. P., Pinheiro Mda C., do Nascimento J. L., Herculanio A. M. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. *Environ. Int.* 2011, 37, 1, pp. 136-141.

11. Gundacker C., Komarnicki G., Jagiello P., Gencikova A., Dahmen N., Wittmann K. J. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. *Sci. Total. Environ.* 2007, 385, 1-3, pp. 37-47.

12. Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., De Boeck M., Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research.* 2002, 504, 1-2, pp. 137-148.

13. Lee B.-E., Hong Y.-C., Park H., Ha M., Koo B.S., Chang N., Roh Y.-M., Kim B.-N., Kim Y.-J., Kim B.-M., Jo S.-J., Ha E.-H. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight. *Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 3, pp. 437-443.

14. Mabilite V., Roels H., Jacquet P., Leonard A., Lauwerys R. Cytogenetic examination of leukocytes of workers exposed to mercury vapor. *Int Arch Occup Environ Health.* 1984, 53, 3, pp. 257-260.

15. Mazzaron Barcelos G. R., de Marco K. C., Grotto D., Valentini J., Garcia S. C., Leite Braga G. Ú., Barbosa F. Jr. Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and methylmercury metabolism in an exposed Amazon population. *J Toxicol Environ Health A.* 2012, 75, 16-17, pp. 960-970.

16. Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M., Hungerford D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 1960, 20, pp. 613-616.

17. Ogura H., Takeuchi T., Morimoto K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutation Research.* 1996, 340, 2-3, pp. 175-182.

18. Silva-Pereira L. C., Cardoso P. C., Leite D. S., Bahia M. O., Bastos W. R., Smith M. A., Burbano R. R. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 2005, 38, 6, pp. 901-907.

19. Soto-Ríos M.L., Rothenberg S., Gonsebatt M.E., Talavera-Mendoza O. Cytogenotoxicity in uroepithelial cells of women exposed to mercury in a mining area. *Occup. Environ. Med.* 2010, 67, 9, pp. 620-624.

20. Verschaeve L., Tassignon J.-P., Lefevre M., De Stoop P., Susanne C. Cytogenetic investigation on leukocytes of workers exposed to metallic mercury. *Environ Mutagen.* 1979, 1, 3, pp. 259-268.

Контактная информация:

Ильинских Николай Николаевич — доктор биологических наук, профессор кафедры экологического менеджмента ФГАОУВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Адрес: 634050, г. Томск, а/я 808

E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru