

Корреляционные связи между долей разрушенных лейкоцитов и долей поврежденных эпителиоцитов

Показатель		1-й класс (n = 50)		10-й класс (n = 50)		1-й и 10-й классы (n = 100)	
		r	p	r	p	r	p
СрЛКЦ	ДЛКЦ	-0,612	0,00002	-0,584	0,00008	-0,635	0,00000
	ДЭПЦ	-0,291	0,040		н/з		н/з
ДЛКЦ	ДЭПЦ	0,399	0,0041		н/з	0,241	0,016

Примечание. СрЛКЦ — среднее число лейкоцитов в поле зрения при анализе 10 полей зрения; ДЛКЦ — доля разрушенных лейкоцитов, %; ДЭПЦ — доля поврежденных эпителиоцитов, %; н/з — статистически незначимо.

и десятиклассников школы, расположенной рядом с ЦБК Коряжмы и в контрольной школе. Показано, что район проживания вблизи ЦБК можно считать неблагоприятным по воздействию выбросов этого предприятия в атмосферу [4, 9]. При этом для слизистой оболочки щеки определена статистически значимая прямая связь ($p < 0,05$) количества буккальных эпителиоцитов в 5-й стадии дифференцировки с долей эпителиальных клеток с начальной стадией лизиса (1-й класс) и с цитогенетическим показателем-протрузией (1-й класс и общая выборка школьников). Повреждающее действие происходит в эпителиоцитах 1-й стадии, но так как они представляют малочисленную популяцию (в норме 1–2% на мазках слизистой оболочки щеки), этот эффект выявляется в многочисленной популяции (в норме 60–70% на мазках) эпителиоцитов 5-й стадии. В группе первоклассников для слизистой оболочки щеки отмечена также слабая положительная корреляция доли клеток с микроядрами с величиной цитологического показателя — адгезии. Между тем ранее была показана корреляционная связь ($r = 0,67$ при $p < 0,005$) между загрязнением атмосферного воздуха химическими соединениями (суммарные превышение ПДК от 7 до 12,8) и адгезией [2], что подтверждает возникновение микроядер при химическом воздействии.

Для слизистой оболочки носа отмечена устойчивая, высокосignальная обратная связь между средним числом лейкоцитов в поле зрения и долей разрушенных лейкоцитов, которые в большем количестве встречаются либо при хроническом, либо при затухающем воспалении. Для слизистой оболочки носа отмечена прямая корреляция между долей клеток с цитотоксическим показателем — атипичной формой ядра — числом лейкоцитов, а так-

же между числом разрушенных лейкоцитов и числом поврежденных эпителиоцитов (табл. 2). Эта корреляционная связь дает основание предположить, что воспалительный процесс, развившийся в слизистой оболочке носа, сопровождался изменением формы ядра, возможно, в связи с воздействием на белки хроматина.

Таким образом, оценка сопряженности изученных показателей служит более полной объективизации картины воздействующих факторов.

Литература

1. Алтаева А. А. // Токсикол. вестн. — 2010. — № 5. — С. 46–49.
2. Беляева Н. Н., Мухамбетова Л. Х., Петрова И. В., Журков В. С. // Гиг. и сан. — 2003. — № 6. — С. 76–79.
3. Беляева Н. Н. // Неинвазивные методы в оценке здоровья населения. — М., 2006. — С. 151–163.
4. Беляева Н. Н., Иванов С. И., Журков В. С. и др. // Гиг. и сан. — 2009. — № 3. — С. 19–21.
5. X конгресс Международной Ассоциации морфологов // Морфология. — 2010. — Т. 137, № 4.
6. Методические рекомендации. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека: Метод. рекомендации / Беляева Н. Н., Сычева Л. П., Журков В. С. и др. — М., 2005.
7. Рахманин Ю. А., Румянцев Г. И., Новиков С. М. // Гиг. и сан. — 2001. — № 5. — С. 3–7.
8. Сычева Л. П., Журков В. С., Рахманин Ю. А., Рязанова Ю. А. // Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. — М., 2007. — С. 287–304.
9. Сычева Л. П., Иванов С. И., Коваленко М. А. и др. // Гиг. и сан. — 2010. — № 1. — С. 7–10.

Поступила 25.02.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 614.77:575.224.4-053.2

А. М.-Х. Солтаева¹, П. М. Джамбетова¹, С. К. Абилев³, Л. П. Сычева², Л. Е. Сальникова³, А. В. Рубанович³

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ПОЧВ НЕФТЕПРОДУКТАМИ В ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

¹Чеченский государственный университет, Грозный; ²ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина Минздравсоцразвития России; ³Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

Впервые проведено исследование по оценке врожденных морфогенетических вариантов (ВМГВ) и сопряженности полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков и репарации с цитогенетическими показателями детей, проживающих в разных природно-климатических зонах и условиях загрязнения окружающей среды продуктами первичной переработки нефти. Результаты анализа ВМГВ и цитогенетических показателей детей указывают на общее генотоксическое воздействие нефтезагрязнений. Повышенная чувствительность к загрязнениям окружающей среды у детей связана с полиморфизмом генов детоксикации, в частности с геном эксцизионной репарации оснований XRCC1.

Ключевые слова: врожденные морфогенетические варианты, микроядра, нефтепродукты, здоровье детей, загрязнение окружающей среды, полиморфизм генов, гены детоксикации ксенобиотиков, гены репарации

A study to evaluate congenital morphogenetic variants (CMGVs) and the association of the polymorphism of the xenobiotic detoxification and repair genes with cytogenetic parameters was conducted for the first time in children living in different climatic zones and areas polluted with primary petroleum refining products. Analysis of CMGVs and cytogenetic parameters in children points to the total genotoxic impact of oil pollutions. The children's higher sensitivity to environmental pollution is associated with the polymorphism of the detoxification gene, with the base excision repair gene XRCC1 in particular.

Key words: congenital morphogenetic variants, micronuclei, petrochemical products, children's health, environmental pollution, gene polymorphism, xenobiotic detoxification genes, repair genes

В настоящее время все более актуальной становится проблема оценки влияния на здоровье людей загрязнения окружающей среды нефтепродуктами в районах добычи и переработки нефти. Эта проблема особенно остро стоит в Чеченской Республике (ЧР), которая несколько последних десятилетий относилась к числу самых неблагоприятных в экологическом отношении территорий на Северном Кавказе. Несмотря на то что в последние годы промышленные предприятия не функционируют, мощными источниками загрязнения окружающей среды на территории ЧР являются многочисленные горящие нефтяные скважины, а также переработка нефти на кустарных мини-заводах.

Наши предыдущие экспериментальные исследования, проведенные в ЧР, также убедительно показали неблагоприятное влияние загрязнения почв нефтепродуктами на природные популяции растений и тест-системы [2, 3]. Однако это влияние практически не изучено у населения, проживающего на территориях, загрязненных нефтепродуктами, особенно в наиболее уязвимой группе — детей младшего возраста. Индивидуальная реакция на мутагенные и канцерогенные факторы физической и химической природы в значительной степени зависит от полиморфизма "генов внешней среды" [13], т. е. генов детоксикации ксенобиотиков, а также генов репарации. Целью данной работы была оценка уровня врожденных морфогенетических вариантов (ВМГВ) и цитогенетических показателей состояния здоровья детей, проживающих в разных природно-климатических зонах и условиях загрязнения окружающей среды продуктами первичной переработки нефти, а также изучение сопряженности полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков и репарации с цитогенетическими аномалиями у изучаемых детей.

Материалы и методы

В 2003 и 2008 гг. проведен химический анализ почв на содержание бенз(а)пирена, который показал наличие в почвах всего спектра полициклических ароматических углеводородов, многие из которых являются канцерогенными и мутагенными веществами. Содержание в исследуемых почвах бенз(а)пирена определяли совместно с испытательной лабораторией почв, кормов, сельскохозяйственной и пищевой продукции, природных вод АНО НПЦ "Экоорма" при МГУ им. М. В. Ломоносова. Для определения содержания бенз(а)пирена использовали метод, предложенный Э. В. Шпольским в 1968 г. (спек-

трофлюориметрический анализ при низких температурах).

Генотипирование и цитогенетическое обследование проведено у 362 детей от 7 до 11 лет (средний возраст $8,40 \pm 0,05$ года), проживающих в 7 селах разных районов ЧР с различной степенью нефтяного загрязнения (Долинск, Мескер-Юрт), высокогорных экологически чистых (Шатой, Зандак), равнинных экологически чистых районов (Гойты, Червленая, Николаевская) (табл. 1). Родители каждого ребенка заполняли анкету сведениями о ребенке и сопутствующих факторах среды проживания.

Забор крови проводили после подписания родителями формы информированного согласия с безымянного пальца левой руки (100—200 мл). Образцы крови собирали в эпендорфы, содержащие K_2EDTA , и хранили при $-80^{\circ}C$. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью наборов Diatom DNA Prep 200, основанных на использовании гуанидинтиоцианата и Nucleus-соберната (фирма "Изоген", Москва). Генотипирование осуществляли с использованием аллельспецифической тетрапраймерной ПЦР [12]. Метод позволяет в одной пробирке амплифицировать фрагменты ДНК, соответствующие альтернативным аллелям. Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. По техническим причинам число лиц, генотипированных по отдельным локусам, незначительно отличалось.

Цитогенетические исследования (отбор материала, приготовление и анализ препаратов) проводили в соответствии с инструкциями, содержащимися в ранее опубликованных работах [7, 10, 11]. Готовили мазки буккального эпителия, фиксировали этанолом и уксусной кислотой в соотношении 3:1, препараты помещали на 1 ч в 2,5% раствор ацетоорсеина ("Merck") при $37^{\circ}C$ для окраски хроматина, затем докрасивали цитоплазму 1% раствором зеленого светлого ("ICN Biomedicals Inc.") при комнатной температуре в течение 1 мин. На шифрованных препаратах учитывали частоту клеток с микроядрами, протрузиями, двумя и более ядрами при подсчете 1000 буккальных эпителиоцитов у каждого обследуемого.

Таблица 1

Данные об обследованных детях

Населенный пункт	Число детей		Средний возраст, годы	
	мальчики	девочки	мальчики	девочки
Долинск	40	34	$8,28 \pm 0,16$	$8,44 \pm 0,15$
Мескер-Юрт	46	45	$7,87 \pm 0,12$	$8,20 \pm 0,13$
Гойты	19	21	$8,89 \pm 0,15$	$8,67 \pm 0,14$
Зандак	18	24	$9,22 \pm 0,17$	$8,75 \pm 0,17$
Шатой	18	19	$8,05 \pm 0,22$	$8,21 \pm 0,21$
Червленая	25	19	$8,64 \pm 0,10$	$8,53 \pm 0,19$
Николаевская	15	20	$8,33 \pm 0,23$	$8,5 \pm 0,20$
Всего...	182	180	$8,36 \pm 0,07$	$8,44 \pm 0,06$

Солтаева А. М.-Х. — преп. каф. физиологии человека и животных биолого-химического факультета; *Джамбетова П. М.* — канд. биол. наук, доц. каф. клеточной биологии, морфологии и микробиологии биолого-химического факультета, (petimat-ig@rambler.ru); *Абилев С. К.* — д-р биол. наук, проф., зам. дир.; *Сычева Л. П.* — д-р биол. наук, зав. лаб. генетического мониторинга (lpsycheva@mail.ru); *Салникова Л. Е.* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экологической генетики, *Рубанович А. В.* — д-р физ.-мат. наук, зав. лаб. экологической генетики

Таблица 2

Содержание нефтепродуктов в почве исследуемых территорий Чеченской Республики

№ пробы	Объект исследования	Содержание нефтепродуктов в почве, %		Концентрация бенз(а)пирена, мг/кг		ПДК бенз(а)пирена в почвах, мг/кг
		2002 г.	2007 г.	2002 г.	2007 г.	
1	Гойты	0,02	0,01	0,03	< 0,001	0,02
2	Долинск	1,56	1,02	0,15	0,066	
3	Мескер-Юрт	1,10	0,81	1,83	0,548	

Для изучения ВМГВ использовали методику, разработанную на кафедре клинической генетики Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова и апробированную в разных городах России [1, 8]. Проводили полный наружный осмотр детей, регистрировали 85 четко распознаваемых ВМГВ [6]. При сравнении мальчиков и девочек признаки "шалевидная мошонка" и "паховая грыжа", характерные для представителей мужского пола, исключали из анализа.

Статистическую обработку результатов исследований выполняли стандартными методами с помощью пакета Win STAT 2003.1.

Результаты и обсуждение

С начала 90-х годов прошлого века в ЧР, в частности в селах Долинск и Мескер-Юрт, местные жители занимались нефтедобычей и нефтеварением кустарным способом, что сильно повлияло на экологическую обстановку данных сел. Наиболее опасными загрязнителями являются продукты горения и низкотемпературной переработки нефти, которые обладают генотоксичными свойствами. Химический анализ почв, взятых с территорий изучаемых населенных пунктов в 2002 и 2007 гг., показал наличие в них нефтепродуктов и бенз(а)пирена в концентрациях, значительно превышающих предельно допустимые нормы (табл. 2). Так, в загрязненных районах содержание нефтепродуктов было в 55 и 78 раз выше, чем на условно контрольной территории. Повторный анализ почв в 2007 г. показал снижение содержания нефтепродуктов и бенз(а)пирена в почве во всех населенных пунктах, тем не менее в Долинске и Мескер-Юрте их концентрации значительно превышают показатели в условно чистой зоне (Гойты).

Таблица 3

Цитогенетические показатели у детей, проживающих в изучаемых населенных пунктах Чеченской Республики

Населенный пункт	Цитогенетические показатели ($X_{cp} \pm m$)		
	микроядра	протрузии	многоядерные клетки
Гойты	0,48 ± 0,09	1,08 ± 0,24	14,12 ± 1,14
Мескер-Юрт	2,37 ± 0,24**	2,58 ± 0,45*	22,97 ± 1,46***
Долинск	2,48 ± 0,26***	3,31 ± 0,56**	22,04 ± 2,09**
Зандак	0,64 ± 0,12	1,39 ± 0,32	10,72 ± 0,82
Шатой	0,80 ± 0,14	0,40 ± 0,09	10,16 ± 0,99
Червленная	0,47 ± 0,09	0,82 ± 0,23	14,38 ± 1,06
Николаевская	0,53 ± 0,11	1,68 ± 0,17	17,68 ± 1,59

Примечание. Проведено сравнение данных по загрязненным селам Долинск и Мескер-Юрт с данными по условно чистому селу Гойты. Значимость различий по отношению к условному контролю по критерию Стьюдента при * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

В наших предыдущих экспериментальных исследованиях была отмечена генотоксичность загрязненных нефтепродуктами почв для природных популяций растений и других тест-систем [3]. У изученных видов растений обнаружено значительное превышение уровня хромосомных aberrаций в районах загрязнения почв нефтепродуктами по сравнению с условно чистой зоной, причем проведенный анализ показал, что уровень мутагенной активности нефтезагрязнений зависит в большей степени от количества нефтепродуктов в почве и в меньшей — от вида растений. Сходные данные получены по всем видам растений, собранных в разных населенных пунктах. Показано отсутствие специфичности действия данного типа загрязнителей окружающей среды, выявлена корреляция между уровнем соматических мутаций и уровнем загрязнения почв бенз(а)пиреном и нефтепродуктами.

Следующим этапом стала оценка генетических и цитогенетических нарушений у детей, проживающих на территориях, загрязненных нефтепродуктами, особенно наиболее уязвимой группы — детей младшего возраста.

Выявлено достоверное повышение частоты цитогенетических нарушений у детей, проживающих в условиях загрязнения окружающей среды нефтепродуктами (табл. 3), в частности 5-кратное повышение основного цитогенетического показателя — доли клеток с микроядрами у детей, проживающих в селах Мескер-Юрт и Долинск. Второй не менее важный показатель — доля клеток с протрузиями — также был в 2,4—3 раза выше, чем в контроле. Повышение частоты этих структур в клеточных популяциях свидетельствует о генотоксическом действии исследуемых факторов (кластогенном и анеугенном) [10]. Повышение на 60% показателей пролиферации (клеток с двумя ядрами и более) свидетельствует о сдвиге клеточной кинетики и также отражает неблагоприятное действие загрязненной среды на организм детей.

У детей, проживающих на загрязненных нефтепродуктами территориях, выявлены достоверные отличия по ВМГВ по сравнению с детьми из условно чистой зоны (Долинск — $p < 0,001$; Мескер-Юрт — $p < 0,05$) (табл. 4).

В основе развития ВМГВ лежит либо действие мутантного гена, либо тератогенное влияние каких-либо факторов в ранние сроки эмбриогенеза, связанное с изменением пролиферативной активности ткани и/или апоптоза и нарушением морфогенеза того или иного органа [1, 5, 6]. Повышенная частота цитогенетических нарушений и сдвиги клеточной кинетики выявлены нами у детей, проживающих на загрязненных нефтепродуктами территориях. Можно предположить, что такие изменения, возникающие при действии нефтепродуктов на ранние этапы эмбриогенеза, привели к формированию ВМГВ у некоторых детей. Показано, что ВМГВ может быть биомаркером врожденных пороков развития, в частности нарушений развития нервной системы, патологии других органов и систем. У детей с 5 ВМГВ и более выявлена предрасположенность к развитию экологически обусловленной патологии и снижению адаптационных возможностей организма [6].

Интересно отметить, что данные обследования людей четко совпадают с результатами, полученными при ана-

Таблица 4

Среднее число ВМГВ у детей, проживающих в изучаемых населенных пунктах Чеченской Республики

Статистические характеристики	Долинск	Мескер-Юрт	Гойты
-------------------------------	---------	------------	-------

Число ВМГВ ($X_{cp} \pm m$) 3,15 ± 0,21** 2,79 ± 0,19* 2,20 ± 0,18

Примечание. Значимость различий по отношению к условному контролю (Гойты) по критерию Стьюдента при * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$

Оценка мутагенного действия нефтепродуктов на живые объекты на чистых и загрязненных территориях Чеченской Республики

Показатель	Отношение До- линск/Гойты	Отношение Мес- кер-Юрт/Гойты
Среднее число ревертантов his Salmonella typhimurium, штамм TA100 с метаболической активацией (тест Эймса) при исследовании органических экстрактов почвы	5,6	4,9
Количество пятен на листьях Glycine max (L.) Merrill (сои), выращенной на почвах сравниваемых территорий	5,2	4,9
Частота aberrантных ана-телофаз в корешках Taraxacum officinale Wigg.s.l, пророщенных из семян растений, собранных на сравниваемых территориях	5,3	4,5
Частота aberrантных ана-телофаз в корешках Matricaria reculita L., пророщенных из семян растений, собранных на сравниваемых территориях	7,5	7,5
Частота aberrантных ана-телофаз в корешках Rumex confertus Willd., пророщенных из семян растений, собранных на сравниваемых территориях	6,4	5,6
Частота aberrантных ана-телофаз в корешках Plantago major L., пророщенных из семян растений, собранных на сравниваемых территориях	10,2	5,2
Частота клеток с микроядрами в буккальных эпителиоцитах детей, проживающих на сравниваемых территориях	4,9	5,2

лизе тест-объектов, использованных для оценки мутагенного действия органических экстрактов почв в тех же населенных пунктах [4]. Обобщенный анализ использования различных тест-систем представлен в табл. 5. Кратность превышения большинства показателей в группах воздействия и сравнения одного порядка и близ-

ка к пяти, как и при обследовании детей (см. табл. 5), что указывает на общебиологические закономерности мутагенного действия нефтепродуктов на этих террито-

риях. Индивидуальная реакция на мутагенные и канцерогенные факторы физической и химической природы в

Таблица 6

Частота микроядер в зависимости от генотипов изученных генов-кандидатов на чистых и загрязненных территориях

Локусы и генотипы	Число микроядер на 1000 клеток			
	n	чистые территории	n	грязные территории
<i>CYP1A1</i> T/T	59	0,44 ± 0,09	53	1,94 ± 0,27
T606G T/G	74	0,62 ± 0,09	106	1,49 ± 0,14
rs2606345 G/G	25	0,72 ± 0,62	30	1,43 ± 0,33
<i>CYP1A1</i> T/T	158	0,62 ± 0,07	179	1,63 ± 0,12
T3801C T/C	4	0,50 ± 0,29	8	1,50 ± 0,76
rs4646903 C/C	0	-	1	2,00
<i>CYP1A1</i> A/A	149	0,60 ± 0,07	169	1,54 ± 0,12
A4889G (Ile462Val) A/G	13	0,85 ± 0,38	29	1,62 ± 0,34
rs1048943 G/G	0	-	0	-
<i>CYP1B1</i> C/C	113	0,65 ± 0,08	136	1,48 ± 0,14
G1294C (Val432Leu) C/G	46	0,50 ± 0,11	53	1,68 ± 0,23
rs1056836 G/G	3	1,00 ± 0,58	9	1,89 ± 0,61
<i>GSTM1</i> D/D	100	0,59 ± 0,08	103	1,66 ± 0,17
I/*	62	0,66 ± 0,12	93	1,41 ± 0,17
<i>GSTT1</i> D/D	20	0,65 ± 0,24	22	1,82 ± 0,41
I/*	142	0,61 ± 0,07	174	1,51 ± 0,12
<i>GSTP1</i> A/A	74	0,69 ± 0,11	157	1,24 ± 0,12
A313G (Ile105Val) A/G	81	0,54 ± 0,08	177	1,04 ± 0,10
rs1695 G/G	7	0,71 ± 0,47	33	1,00 ± 0,22
<i>XRCC1</i> G/G	74	0,68 ± 0,10	138	1,15 ± 0,11
G1996A (Arg399Gln) G/A	75	0,60 ± 0,10	180	1,26 ± 0,12
rs 25487 A/A	7	0,29 ± 0,18	13	0,31 ± 0,18
<i>ERCC1</i> T/T	35	0,54 ± 0,13	67	1,13 ± 0,17
T354C (Asn118Asn) T/C	85	0,61 ± 0,09	184	1,21 ± 0,11
rs11615 C/C	40	0,70 ± 0,14	78	1,18 ± 0,17
<i>APEX1</i> T/T	19	0,79 ± 0,18	34	1,21 ± 0,28
T444G (Asp148Glu) T/G	62	0,50 ± 0,09	144	1,13 ± 0,11
rs1130409 G/G	75	0,68 ± 0,11	158	1,20 ± 0,12
<i>Tp53</i> G/G	115	0,59 ± 0,08	133	1,71 ± 0,15
G215C (Arg72Pro) G/C	31	0,74 ± 0,16	31	1,68 ± 0,35
rs1042522 C/C	11	0,55 ± 0,21	8	1,63 ± 0,26
<i>MTHFR</i> C/C	94	0,55 ± 0,08	177	1,13 ± 0,11
C677T (Ala222Val) C/T	40	0,53 ± 0,11	71	0,97 ± 0,17
rs1801133 T/T	3	1,00 ± 0,58	7	1,71 ± 0,78

Примечание. Жирным шрифтом выделены случаи значимых межгенотипических различий.

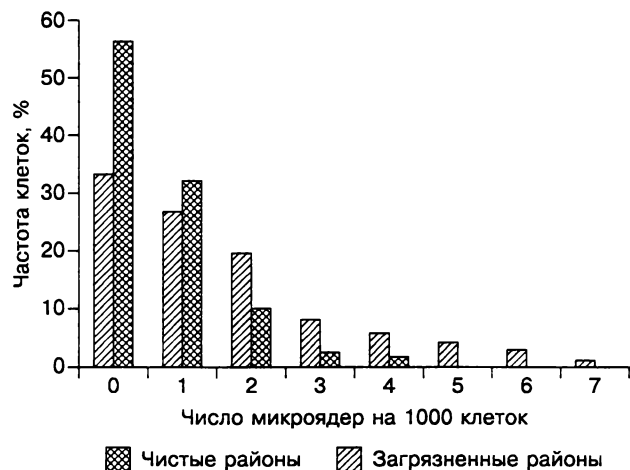


Рис. 1. Распределения частот клеток с микроядрами у детей, проживающих в чистых и загрязненных районах.

значительной степени зависит от полиморфизма "генов внешней среды" [8, 9, 13], т. е. генов детоксикации ксенобиотиков, а также генов репарации. В связи с этим была продолжена работа по оценке цитогенетических показателей состояния здоровья детей, проживающих в разных природно-климатических зонах и условиях загрязнения окружающей среды продуктами первичной переработки нефти, а также изучению сопряженности полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков и репарации с цитогенетическими аномалиями у детей, проживающих в районах нефтяного загрязнения окружающей среды и в экологически чистых районах.

Изменчивость цитогенетических показателей для выборки в целом оказалась достаточно высокой, чтобы обеспечить возможность поиска генотипических ассоциаций. Средние частоты микроядер достоверно различались, составляя у детей в загрязненных районах $1,54 \pm 0,12$ на 1000 просмотренных клеток, в чистых районах $0,62 \pm 0,07$ на 1000 клеток ($p = 4,8 \cdot 10^{-9}$).

На рис.1 приведена гистограмма распределения частот клеток с микроядрами у детей, проживающих в чистых и загрязненных районах. Выборки обследованных по численности достаточно близки (200 человек из загрязненных территорий, 160 человек из чистых районов). У 56,2% детей из экологически чистых населенных пунктов не были обнаружены микроядра. По 3 микроядра и более на 1000 клеток имели всего 3,7% детей. В загрязненных районах число детей, не имевших микроядер на 1000 клеток, составило только 33%, в то же время 21% детей имели по 3 микроядра и более.

Частоты микроядер на 1000 клеток в зависимости от генотипов по кандидатным локусам представлены в табл. 6. В случае инсерционно-делеционного полиморфизма (гены *GSTM1*, *GSTT1*) сравнение проводили для двух вариантов генотипа: "нулевой" — гомозигота по делеции (D/D) и "функциональный" — несущий функциональный аллель в гомо- или гетерозиготном состоянии (I/*). (Здесь и далее * означает произвольный аллель.)

Сниженная частота микроядер отмечена у носителей мажорного аллеля 1996G гена *XRCC1* в гомо- или гетерозиготном состоянии (рис. 2). В загрязненных населенных пунктах соответствующие значения равны $0,33 \pm 0,33$ для носителей минорного аллеля в гомозиготном состоянии против $1,72 \pm 0,13$ для детей с аллелем 1996G/* ($p = 0,018$). В чистых регионах гомозиготные носители 1996A также имеют пониженную частоту микроядер $0,29 \pm 0,18$ по сравнению с $0,64 \pm 0,07$ у лиц, имеющих аллель G/*, однако в данном случае данные различаются недостоверно ($p = 0,31$).

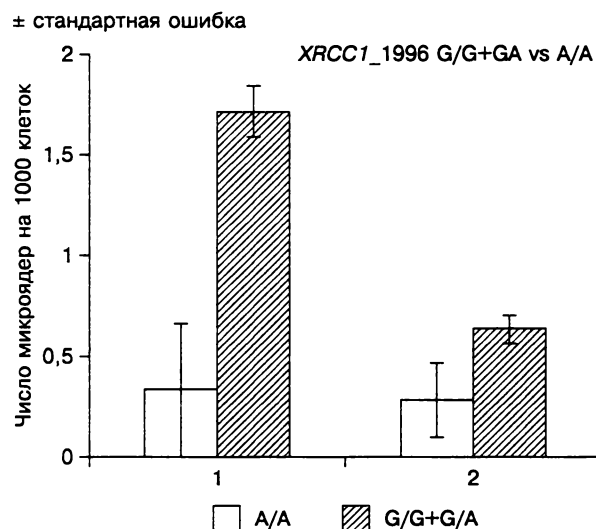


Рис. 2. Средние частоты микроядер на 1000 клеток у детей, проживающих в чистых и загрязненных регионах, в зависимости от генотипов по локусу *XRCC1* G1996A.

1 — загрязненные районы; 2 — чистые районы.

Частота микроядер в буккальном эпителии у чеченских детей, проживающих на загрязненных территориях, существенно выше по сравнению с детьми из чистых регионов. Повышенная чувствительность к загрязнению среды ассоциирована с аллелем 1996G гена эксцизионной репарации оснований (base excision repair — BER) *XRCC1*. Белок *XRCC1* репарирует одностранные и предположительно двустранные повреждения ДНК [12]. Он не имеет собственной каталитической активности, но является центром взаимодействия других ферментов эксцизионной репарации оснований. Аминокислотный остаток в 399-й позиции находится в BRCT1-доме белка, с которым ассоциирована активность других ферментов BER. Литературные данные по сопряженности аллельных вариантов *XRCC1* с мутагенными эффектами факторов среды противоречивы [12, 13]. Данные в настоящей работе коррелируют с полученными нами ранее результатами, касающимися сопряженности повышенной радиочувствительности к γ -индуцированным абберациям хромосомного типа в лимфоцитах крови молодых здоровых добровольцев с аллелем 1996G в данном гене [9, 14].

Выводы. 1. Выявлено 5–10-кратное повышение уровня мутабельности у различных видов растений природной флоры и тест-систем, произрастающих на почвах, загрязненных нефтепродуктами, при этом отмечено отсутствие специфичности действия нефтезагрязнителей.

2. У детей, проживающих в условиях значительного загрязнения (1%) почв нефтепродуктами, повышены частоты генетических и цитогенетических нарушений: ВМГВ в 1,4 раза, доли клеток с цитогенетическими нарушениями в слюистой оболочке щеки в 5 раз, показателя пролиферации (доли клеток с двумя ядрами и более) в 1,6 раза.

3. Выявлена ассоциация повышенного уровня цитогенетических нарушений у детей, проживающих на загрязненных нефтепродуктами территориях, с полиморфизмом генов репарации, в частности с геном эксцизионной репарации оснований *XRCC1*.

4. Результаты цитогенетического исследования буккального эпителия детей с использованием микроядерного теста и анализ микробных и растительных тест-объектов, использованных для оценки мутагенного действия нефтезагрязнений, указывают на общебиологические закономерности мутагенного действия нефтепродуктов на указанных территориях.

Литература

1. Бочков Н. П., Субботина Т. И., Яковлев В. В. и др. // Гиг. и сан. — 1994. — № 3. — С. 53—55.
2. Джамбетова П. М., Реутова Н. В., Ситников М. Н. // Экол. генетика. — 2005. — Т. 3, № 4. — С. 5—10.
3. Джамбетова П. М., Реутова Н. В. // Экол. генетика. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 22—27.
4. Джамбетова П. М., Молочаева Л. Г., Махтиева А. Б., Сычева Л. П. // Экол. генетика. — 2009. — Т. 7, № 4. — С. 34—40.
5. Жученко Н. А., Софронов Г. А., Румак В. С. и др. // Вестн. РАМН. — 2006. — № 7. — С. 3—10.
6. Котышева Е. Н. Врожденные морфогенетические варианты в эколого-гигиенических исследованиях. — Магнитогорск, 2007.
7. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека: Метод. рекомендации / Беляева Н. Н., Сычева Л. П., Журков В. С. и др. — М., 2005.
8. Ревазова Ю. А., Журков В. С., Жученко Н. А. и др. // Гиг. и сан. — 2001. — № 6. — С. 11—16.
9. Сальникова Л. Е., Чумаченко А. Г., Веснина И. Н. и др. // Радиацион. биол. Радиоэкол. — 2010. — Т. 50, № 6. — С. 29—38.
10. Сычева Л. П. // Мед. генетика. — 2007. — № 11. — С. 3—11.
11. Сычева Л. П., Можжаева Т. Е., Умнова Н. В. и др. // Вестн. РАМН. — 2008. — № 1. — С. 19—23.
12. Hamajima N. // Exp. Rev. Mol. Diagn. — 2001. — Vol. 1, N 1. — P. 119—123.
13. Shen M., Hung R. J., Brennan P. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2003. — Vol. 12. — P. 1234.
14. Sterpone S., Cozzi R. // J. Nucl. Acids. — 2010. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2925273/pdf/JNA2010-780369.pdf>

Поступила 25.02.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 614.7:669.018.674]:616-092.11

Н. В. Реутова¹, Т. В. Реутова², Т. И. Воробьева²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РЯДА ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

¹ГУЗ Медицинский консультативно-диагностический центр МЗ КБР, Нальчик; ²ГУ Высокогорный геофизический институт Росгидромета, Нальчик

Определен мутагенный потенциал неорганических соединений вольфрама, молибдена, свинца и меди, отходов горно-обогатительного комбината, связанного с разработкой вольфрамо-молибденового месторождения, и компонентов окружающей среды с использованием растительной тест-системы и видов дикорастущей флоры. Показана их пригодность для определения генотоксичности окружающей среды, загрязненной тяжелыми металлами.

Ключевые слова: генотоксичность, растительные тест-системы, тяжелые металлы

N. V. Reutova, T. V. Reutova, T. I. Vorobyeva. — DETERMINATION OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF INORGANIC COMPOUNDS OF A NUMBER OF HEAVY METALS

The authors determined the mutagenic potential of inorganic compounds, such as tungsten, molybdenum, lead, and copper, as well as waste of a tungsten-molybdenum industrial complex engaged in the exploitation of tungsten and molybdenum deposits, and environmental components, by using a plant test system and species of wild flora. They were shown to be suitable for the determination of genotoxicity of the environment polluted with heavy metals.

Key words: genotoxicity, plant test systems, heavy metals

Для оценки генотоксического влияния окружающей среды наиболее часто используют бактериальные и растительные тест-системы. Поскольку растительные тест-системы обладают целым рядом преимуществ по сравнению с бактериальными, мы использовали именно их в наших исследованиях. Судя по литературным данным, наибольшее число работ по определению мутагенной опасности окружающей среды связано с загрязнением органическими веществами, в основном полициклическими углеводородами. Работ, посвященных исследованию генотоксического влияния тяжелых металлов, значительно меньше [5, 6].

Целью данной работы было определение мутагенного потенциала неорганических соединений тяжелых металлов (ТМ), отходов горнодобывающих предприятий и компонентов окружающей среды, загрязненных рядом этих тяжелых металлов, с использованием растительной тест-системы и видов дикорастущей флоры.

Материалы и методы

Для определения генотоксического потенциала ТМ, отходов горнодобывающих предприятий и компонентов

Реутова Н. В. — д-р биол. наук, генетик отд. лаб. диагностики; Реутова Т. В. — ст. науч. сотр. лаб. экологической химии (Vgikbr@rambler.ru); Воробьева Т. И. — ст. науч. сотр. лаб. экологической химии (Vgikbr@rambler.ru)

окружающей среды мы использовали растительную тест-систему *S. capillaris* L. и виды дикорастущей флоры. Воздушно-сухие семена *S. capillaris* замачивали в исследуемых растворах на 42 ч при 26°C. Такая длительная обработка была выбрана в связи с тем, что, во-первых, мы исследовали мутагенные свойства металлов в весьма низких субтоксических концентрациях, а во-вторых, мы пытались хоть немного приблизиться к естественным условиям, в которых растения подвергаются действию поллютантов длительное время. После обработки семена тщательно промывали в водопроводной воде. Затем их обрабатывали 0,05% раствором колхицина в течение 3 ч для остановки деления клеток на стадии метафазы и накопления метафаз в клетках меристемы кончиков корней. Фиксацию производили в спиртоуксусной (3:1) смеси. Окрашивали ацетокармином и из темно-окрашенных кончиков корней готовили временные давленные препараты по общепринятой методике [2].

При отборе растений дикорастущей флоры визуально отмечали площадь (примерно $10\ 000 \pm 200\ \text{м}^2$), покрытую избранными для исследования видами растений. Всю площадь разбивали по диагонали на участки по $50\ \text{м}^2$, из которых отбирали семена с 10 растений одного вида примерно одинакового габитуса. Исследования проводили на проростках корешков семян выбранных видов растений. Генотоксическое влияние определяли с использованием анафазно-телофазного метода. Этот ме-