

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ШАХТЕРОВ

А. В. Махалин, Л. Ю. Редкокаша, В. В. Мороз,
Ю. А. Чурляев, Н. Н. Ильинских*, М. С. Романова*

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

* ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Cytogenetic Changes in T Lymphocytes in Miners

A. V. Makhalin, L. Yu. Redkokasha, V. V. Moroz,
Yu. A. Churlyayev, N. N. Ilyinskikh*, M. S. Romanova*

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

* Siberian State Medical University, Tomsk

Цель исследования. Изучить влияние уровня содержания хрома на цитогенетические нарушения Т-лимфоцитов у шахтеров юга Кузбасса. **Материалы и методы.** Проводилось культивирование лейкоцитов периферической крови шахтеров, методом P. S. Moorhead (1960), с использованием цитогенетического анализа полученных препаратов. При анализе хромосом учитывали изменения в числе хромосом (гипер-, гипо- и полиплоидный набор хромосом) и структурные нарушения хромосом. Обследовано 93 шахтеров городов Новокузнецка и Междуреченска Кемеровской области. В зависимости от стажа подземной работы горняков разделили на 2 группы: со стажем работы 1–5 лет ($n=32$ человека) и 10–15 лет ($n=31$ человек). Контрольную группу составили 30 сотрудников административно-хозяйственного аппарата шахт. В среднем возраст шахтеров составил $38,6\pm 3,4$ года. Ранее, проведенный химический анализ угля ряда шахт, выявил значительные концентрации соединения хрома (до 298 мг/кг при кларке в земной коре 83 мг/кг). Проведено количественное определение хрома в лимфоцитах методом атомно-эмиссионным с индуктивно-связанной плазмой. Статистические данные обрабатывали с использованием пакета компьютерных программ «Statistica» 5.01. **Результаты.** Проведено цитогенетическое обследование и определение уровня хрома в периферической крови у шахтеров с различным стажем подземной работы. Показано наличие у шахтеров повышенного числа Т-лимфоцитов периферической крови с цитогенетическими нарушениями, что коррелировало с увеличением содержания в крови хрома. **Заключение.** Таким образом, в результате проведенных исследований было выявлено, что у шахтеров со стажем подземной работы 10–15 лет отмечено высокое содержание хрома в крови, которое сопровождалось не только увеличением числа клеток со структурными абберациями хромосом, но и клеток с поли- и гиперплоидией. **Ключевые слова:** лейкоциты, лимфоциты, хромосомы, хром и его соединения, шахтеры.

Objective: to study the impact of chromium levels on cytogenetic impairments in T lymphocytes in miners from the south of Kuzbass. **Subjects and methods.** Peripheral blood leukocytes were cultured, as described by P. S. Moorhead (1960), by using the cytogenetic assay of the obtained specimens. Analysis of chromosomes considered changes in the number of chromosomes (hyper-, hypo-, or polyploid sets of chromosomes) and their structural derangement. Ninety-three miners from Novokuznetsk and Mezhdurechensk (Kemerovo Region) were examined. According to the length of underground service, the miners were divided into 2 groups: 1) 32 miners with a service length of 1–5 years; 2) 31 with a service length of 10–15 years. A control group included 30 employees from the mine maintenance departments. The mean age of the miners was 38.6 ± 3.4 years. Previous coal chemical analysis in a number of mines revealed significant concentrations of chromium compounds (as high as 298 mg/kg in the clark of 83 mg/kg). Lymphocytic chromium was quantified by the atomic emission method using inductively bound plasma. The statistically data were processed using a package of Statistica 5.01 computer programs. **Results.** Cytogenetic study and measurement of peripheral blood chromium were made in miners with a various underground service length. They were found to have elevated peripheral blood T lymphocytes with cytogenetic disorders, which correlated with the increased blood chromium levels. **Conclusion.** Thus, the miners with an underground service length of 10–15 years were ascertained to have high blood chromium levels, which was accompanied by increases in the count of both cells with chromosomal structural aberrations and those with poly- and hyperploidy. **Key words:** leukocytes, lymphocytes, chromosomes, chromium and its compounds, miners.

Ранее проведенные исследования химического состава углей шахт юга Кузбасса показали, что в нём содержатся значительные концентрации соединений хрома (до 298 мг/кг при кларке в земной коре 83 мг/кг), который обладает выраженным мутагенным действием [1–3]. В связи с этим была поставлена цель изучить влияние уровня содержания хрома на цитогенетические нарушения Т-лимфоцитов у шахтеров юга Кузбасса.

Материалы и методы

Цитогенетическое обследование проведено у 93 человек, работающих на шахтах городов Междуреченска и Новокузнецка Кемеровской области. В зависимости от стажа подземной работы горняков разделили на 2 группы: имеющие стаж работы 1–5 лет (32 человека) и 10–15 лет (31 человек). Контролем послужили 30 сотрудников административно-хозяйственного аппарата шахт. Во всех группах средний возраст составил $38,6\pm 3,4$ года. Согласно данным анкетного опроса и медицин-

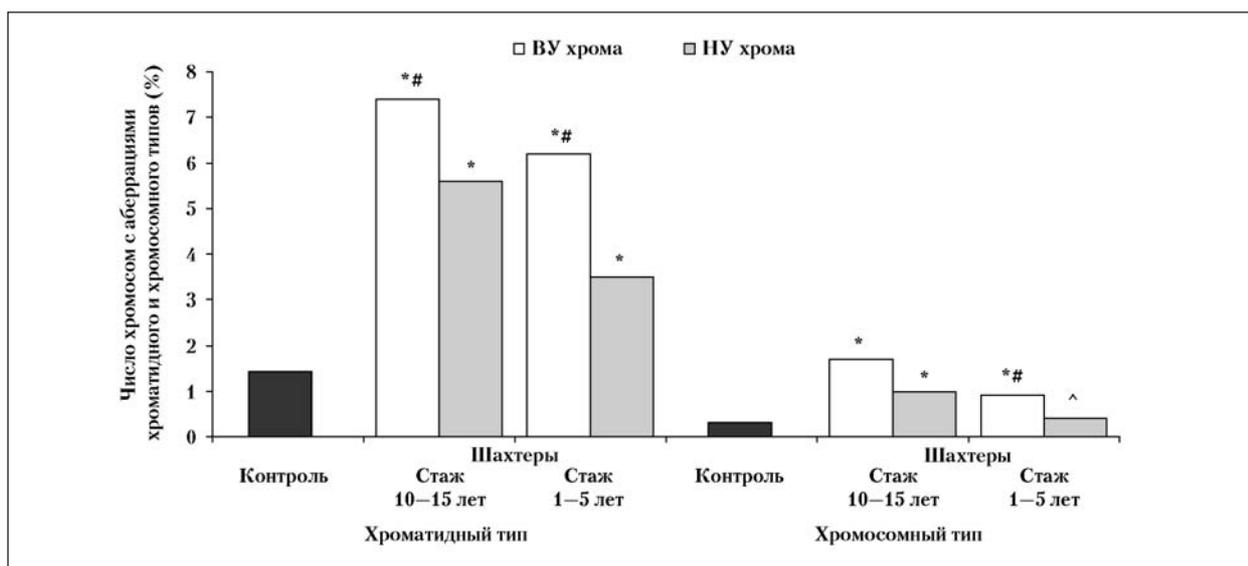


Рис. 1. Число хромосом с абберациями хроматидного и хромосомного типов (в %, $X \pm m$) у шахтеров и лиц контрольной группы. **Примечание.** Здесь и на рис. 2, 3: ВУ — высокий уровень хрома; НУ — низкий уровень хрома. Достоверность различий в показателях между группами шахтеров с высоким и низкими уровнями хрома в крови: # — при $p < 0,05 - 0,01$. Достоверность различий в показателях между группами шахтеров со стажем работы 1–5 лет и 10–15 лет: ^ — при $p < 0,05 - 0,01$. Достоверность различий в показателях между группой шахтеров от контрольной: * — при $p < 0,05 - 0,01$.

ских карт обследованные в течение года не проходили рентгеновских процедур и не болели вирусными инфекциями.

Культивирование лейкоцитов периферической крови, полученной из локтевой вены горняков, проводили по методу P. S. Moorhead [4]. Полученную плазму с взвесью лимфоцитов разбавляли в 3–4 раза питательной средой RPMI-1640, чтобы получить концентрацию 106 клеток на 1 мл культуральной среды, добавляли фитогемагглютинин (ФГА) (Difco P) 0,02 мл. Культуры инкубировали в термостате при 37° в течение 48–54 часов. За 3 часа до приготовления препаратов во флаконы с культурами лейкоцитов вводили колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг на 1 мл среды. Гипотоническую обработку производили 6 минут 0,56% раствором КСI. Фиксировали клетки в трех сменах смеси ледяной уксусной кислоты с метанолом (1:3). В последней смене фиксатора оставляли 0,5 мл надосадочной жидкости, в которой тщательно ресуспендировали клетки. Наносили по 1–2 капли на охлажденные предметные стекла и проводили высушивание [4]. Через 1–2 недели хранения препаратов проводили дифференциальное окрашивание хромосом, используя технику G-окраски. Препараты помещали в 0,025% раствор трипсина, подогретый до 37°, на 1–2 минуты, ополаскивали в 2xSSC (стандартном солевом растворе), далее в трех сменах этилового спирта (70°, 96°, 100°) и окрашивали по Романовскому-Гимза, разведенным 1:50 фосфатным буфером Зеренсена (рН 6,8) в течение 5–15 минут [5].

При анализе хромосом учитывали изменения в числе хромосом (гипер-, гипо- и полиплоидный набор хромосом) и структурные нарушения хромосом. В каждом случае анализировали не менее 100 клеток. Абсолютные значения фактически наблюдаемых уровней структурных нарушений хромосом сравнивали с ожидаемыми уровнями, которые вычисляли, исходя из относительных длин хромосом кариотипа человека и равной вероятности возникновения структурных аббераций в любом участке хромосомы [6].

Помимо цитогенетического анализа крови шахтеров и контрольной группы доноров проведено количественное определение хрома в лимфоцитах методом атомно-эмиссионным с индуктивно-связанной плазмой на базе ядерно-геохимической лаборатории Томского государственного политехнического университета согласно инструкции НСАМ ВИМС №410-ЯФ.

Все полученные данные обрабатывали при помощи пакета компьютерных программ «Statistica» 5.01 с использованием ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты и обсуждение

По результатам исследований в каждой группе шахтеров были выделены две подгруппы с высоким и низким уровнем содержания хрома в периферической крови. Установлено, что во всех обследованных подгруппах наблюдалось статистически достоверное повышение (при $p < 0,01$) числа хромосом как с абберациями хроматидного, так и хромосомного типов в лимфоцитах периферической крови в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе (рис. 1). Шахтеры с высоким уровнем хрома в лимфоцитах периферической крови имели достоверное увеличение числа хромосом с абберациями хроматидного и хромосомного типов в сравнении с шахтерами с низким уровнем содержания хрома в крови: $1,71 \pm 0,31$ против $0,98 \pm 0,10$ (при $p < 0,05$) и $0,92 \pm 0,12$ против $0,41 \pm 0,11$ (при $p < 0,01$), соответственно (рис. 1). Кроме того, у шахтеров с высоким содержанием хрома в крови со стажем подземной работы 10–15 лет число хромосом с абберациями хромосомного и хроматидного типов в лимфоцитах периферической крови было статистически достоверно выше ($p < 0,01$) в сравнении с соответствующими показателями горняков со стажем работы 1–5 лет.

Среди структурных нарушений хромосом у шахтеров со стажем подземной работы 10–15 лет с высоким содержанием хрома в крови преобладали абберации хроматидного типа (81,2%). Парные фрагменты и разрывы встречались в 7,6 раза реже (10,6%), а дигентрики и другие абберации обменного типа встречались ещё менее часто (7,8%). Среди абберации хромосомного типа у шахтеров со стажем работы 10–15 лет с высоким

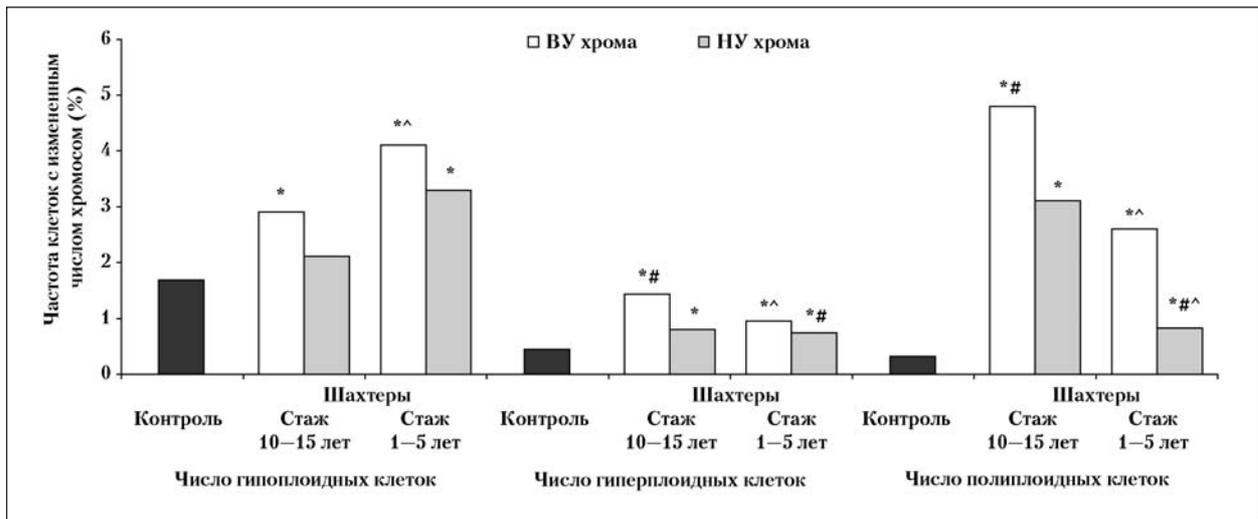


Рис. 2. Частота клеток с измененным числом хромосом (в %, $X \pm m$) у шахтеров и лиц контрольной группы.

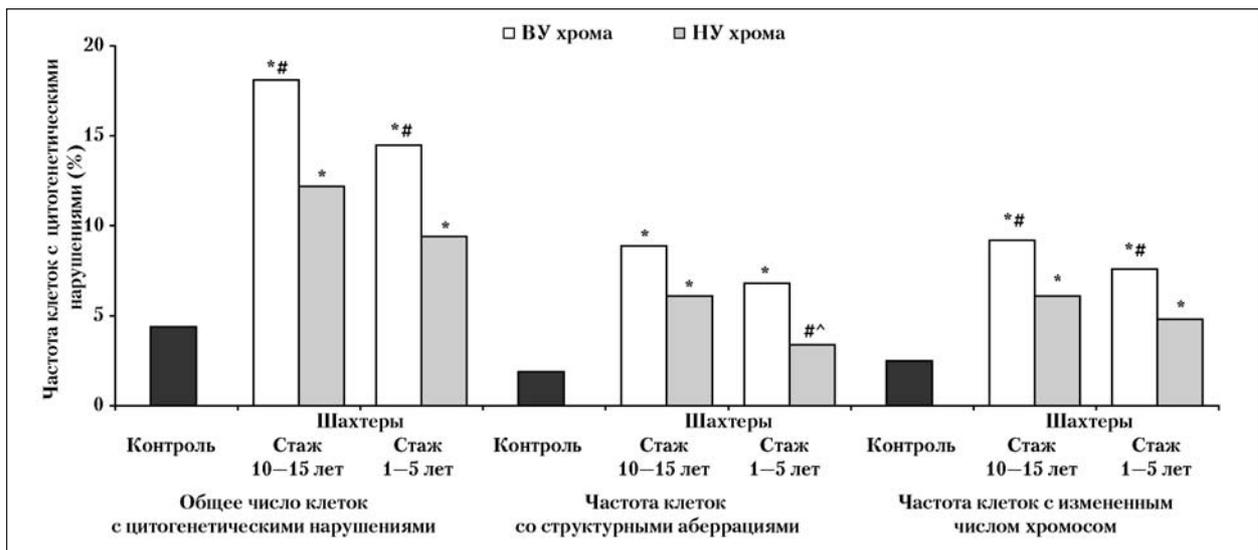


Рис. 3. Частота клеток с цитогенетическими нарушениями (в %, $X \pm m$) у шахтеров, и лиц контрольной группы.

уровнем хрома в крови было установлено статистически достоверное повышение ($p < 0,01$) числа парных фрагментов и разрывов хромосом, а также хромосомных обменов в сравнении с аналогичным показателем контрольной группы (рис. 1).

Число лимфоцитов с гиперплоидией и полиплоидией в периферической крови у шахтеров было статистически достоверно выше соответствующих показателей контрольной группы (при $p < 0,05 - 0,01$). Число гипоплоидных клеток в периферической крови у шахтеров оказалось статистически достоверно выше ($p < 0,05$), чем в контрольной, только в трех подгруппах: у шахтеров со стажем работы 10–15 лет, имевших высокое содержание хрома и у шахтеров со стажем работы 1–5 лет с высоким и низким уровнем содержания хрома в крови (рис. 2). В подгруппе шахтеров с высоким содержанием хрома в периферической крови определялось статистически достоверное большее число (при $p < 0,05 - 0,01$) гиперплоидных и полиплоидных лимфоцитов в сравнении с подгруппой шахтеров с низким

уровнем содержания хрома в крови. Статистически достоверные отличия частоты полиплоидных клеток были зарегистрированы и у шахтеров с относительно низким уровнем хрома в крови ($p < 0,01$). В случае высокого уровня хрома в крови у горняков с подземным стажем работы 10–15 лет частота гиперплоидных и полиплоидных лимфоцитов оказалось существенно выше аналогичных показателей у обследованных со стажем подземной работы 1–5 лет (рис. 2).

Общее число лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями, которое включало в себя показатели частоты этих клеток со структурными нарушениями и с измененным числом хромосом в наборе, во всех подгруппах шахтеров оказалось статистически достоверно выше (при $p < 0,05$) соответствующих показателей контрольной группы (рис. 3). У всех шахтеров с высоким уровнем содержания хрома отмечалось статистически достоверное повышение количества клеток с цитогенетическими нарушениями, со структурными aberrациями и с измененным числом хромосом в сравнении с шахтерами с

Сопоставление эмпирического и ожидаемого уровней нарушений структуры отдельных хромосом (в % и абсолютных значениях, $X \pm m$) в лимфоцитах периферической крови у шахтеров и лиц контрольной группы

Номер хромосомы	Эмпирический уровень структурных нарушений						Ожидаемый уровень структурных нарушений хромосом, %
	Шахтеры				Лица контрольной группы		
	стаж работы 10–15 лет		стаж работы 1–5 лет		%	абс.	
%	абс.	%	абс.				
1	3,1	3	5,2	3	10,5	2	8,4
2	16,7	16*	6,9	4	10,5	2	8,0
3	14,6	14*	10,3	6	10,5	2	6,8
4	0	0	1,7	1	5,2	1	6,3
5	0	0	10,3	6	5,2	1	6,0
6	13,5	13*	3,4	2	5,2	1	5,9
7	3,1	3	8,6	5	5,2	1	5,3
8	12,5	12	5,2	3	5,2	1	4,9
9	2,0	2	8,6	5	5,2	1	4,8
10	2,0	2	5,2	3	5,2	1	4,5
11	1,0	1	8,6	5	5,2	1	4,6
12	11,4	11*	6,9	4	5,2	1	4,6
13	0	0	3,4	2	5,2	1	3,7
14	9,4	9*	1,7	1	5,2	1	3,5
15	1	1	1,7	1	0	0	3,4
16	0	0	1,7	1	0	0	3,3
17	2	2	1,7	1	5,2	1	3,2
18	0	0	1,7	1	0	0	2,9
19	1,0	1	1,7	1	0	0	2,6
20	0	0	1,7	1	0	0	2,5
21	0	0	0	0	0	0	1,9
22	6,2	6*	0	0	0	0	2,0
X	0	0	3,4	2	5,2	1	5,1
Y	0	0	0	0	0	0	2,1
Критерий χ^2	$p < 0,01$		$p > 0,05$		$p > 0,05$		

Примечание. * — статистически достоверное повышение эмпирического уровня структурных нарушений хромосом в сравнении с ожидаемым с помощью критерия χ^2 К. Пирсона.

низким уровнем хрома в лимфоцитах периферической крови. Более того, значительное количество цитогенетических изменений клеток со структурными абберациями и с измененным числом хромосом статистически достоверно выявлялось среди горняков со стажем подземной работы 10–15 лет в сравнении с горняками со стажем подземной работы 1–5 лет (рис. 3). У шахтеров были установлены прямые корреляционные зависимости между содержанием хрома в крови и частотой хромосом с абберациями хроматидного ($r=+0,78$ при $p<0,01$) или хромосомного ($r=+0,89$ при $p<0,01$) типов. Уровни клеток с полиплоидным или гиперплоидным наборами хромосом также положительно коррелировали с содержанием хрома в крови ($r=+0,77$ при $p<0,01$).

Распределения структурных нарушений хромосом у обследованных горняков не всегда соответствовали ожидаемому уровню (см. таблицу). Наиболее близкие величины относительно ожидаемого уровня были зарегистрированы в контрольной группе. При сопоставлении эмпирических значений, полученных у шахтеров со стажем работы 1–5 лет, с ожидаемыми уровнями, также не выявлялись достоверные отличия с использованием критерия χ^2 К. Пирсона. В то же время, у шахтеров со стажем работы 10–15 лет между эмпирическими и ожидаемыми уровнями структурных нарушений хромосом были обнаружены значительные отличия ($p<0,01$).

Повышенное содержание хрома в окружающей среде может приводить к иммуносупрессии из-за повреждения ДНК и снижения выживания лимфоидных клеток [7]. Ранее нами было показано, что поражение цитогенетического аппарата приводит к иммуносупрессивному состоянию и дисфункциональным изменениям Т-лимфоцитов [8].

В результате проведенных исследований было установлено, что особенно у шахтеров со стажем работы в шахте 10–15 лет высокое содержание хрома в крови сопровождалось увеличением числа клеток со структурными абберациями хромосом, а также клеток с поли- и гиперплоидией. Содержание хрома в крови шахтеров прямо коррелировало с частотой хромосом с абберациями хромосомного и хроматидного типов, а также с частотой клеток с изменением числа хромосом. Загрязнение окружающей среды хроматами приводит не только к достоверному повышению содержания хрома в крови у шахтеров, но и к увеличению уровня ДНК-белковых сшивков, способствующих цитогенетическим поражениям клеток крови [9, 10]. У шахтеров с высоким уровнем содержания хрома в крови основную долю структурных нарушений составляли одиночные и парные фрагменты или разрывы, что может свидетельствовать о химической природе мутагенного воздействия. В экспериментах *in vivo* трехвалентные соединения хрома (оксид хрома) обладали

несколько меньшей мутагенной активностью, по сравнению с бихроматом калия (VI) и вызывали, главным образом, хроматидные aberrации. Однако, хром способен накапливаться в тканях и органах, находясь в малорастворимой трехвалентной форме, и постоянно индуцировать хромосомные aberrации, то есть проявлять кумулятивный эффект [2]. Известно, что внутриклеточный хром (V) является главным продуктом, с которым связаны хроматидные и хромосомные aberrации [11]. Все это указывает на то, что повреждение ДНК обусловлено активизацией образования в клетках свободных радикалов кислорода и пероксида водорода. Кроме структурных aberrаций, шестивалентный и трехвалентный хром индуцируют образование анеуплоидных и полиплоидных лимфоцитов [2]. Возможно, это связано с тем, что воздействие хрома на культуры клеток приводит к значительному увеличению уровней патологических митозов, таких как многополюсные и многогрупповые мета-, ана- и телофазы, мосты в ана- и телофазе, эндомитозы, а также к повышению образования многоядерных клеток и клеток с микроядрами [2]. Кроме того, хром подавляет митотическую активность клеток, что связано с блоком S-фазы митотического цикла [10]. Появление клеток с изменением числа хромосом и патологическими митозами, возможно, также связано с эффектами хрома на центромерные участки хромосом или митотиче-

ское веретено. Переходные металлы, такие как хром, в субтоксических дозах способны нарушать естественный клеточный баланс между окислительно-восстановительной и антиоксидантной системами. Развивающийся в результате этого оксидативный стресс приводит к значительным нарушениям в сигнальной системе клеток и дезорганизует активность сигнальных молекул и их эффекты на экспрессию или подавление активности различных генов. Это способствует разнообразным нарушениям в клетках, в том числе мутагенезу и канцерогенезу [8].

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что с увеличением подземного стажа работы у шахтеров нарастает содержание хрома в лимфоцитах периферической крови. Повышенное содержание хрома в крови сопровождается не только увеличением числа клеток со структурными aberrациями, но и клеток с поли- и гиперплоидией.

Положения, вытекающие из данной работы, могут быть полезны реаниматологам, так как необходимо учитывать иммунодепрессивное состояние и дисфункциональные изменения Т-лимфоцитов у шахтеров данного региона при проведении интенсивной терапии послеоперационного периода или посттравматической болезни.

Литература

1. Ильинских Н. Н., Ильинских Е. Н., Ильинских И. Н. Мониторинг тяжелых металлов в шахтах Кузбасса. *Естествознание и гуманизм* 2007; 4 (1): 110.
2. Бигалиев А. Б. Генетические эффекты ионов металлов. *Алма-Ата: Наука*; 1986.
3. Gao M., Binks S. P., Chipman J. K. et al. Induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes by soluble chromium compounds. *Hum. Exp. Toxicol.* 1992; 11(2): 77–82.
4. Moorhead P. S., Nowel P. C., Mellman W. J. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exper. Cell Res.* 1960; 20: 613–616.
5. Seabright M. A. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2: 971–972.
6. Фогель Ф., Мотульски А. *Генетика человека*. М.: Мир; 1989; 1: 312.
7. Chukhlovi A. B., Tokalov S. V., Yagunov A. S. et al. *In vitro* suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. *Sci. Total. Environ* 2001; 281 (1–3): 153–163.
8. Ильинских И. Н., Ильинских Е. Н., Ильинских Н. Н. *Инфекционная карнопатология*. Томск: Изд-во Томского у-та; 2005.
9. De Flora S., Wetterhahn K. E. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* 1989; 7: 169–244.
10. Witmer C., Faria E., Park H. -S. et al. *In vivo* effects of chromium. *Environ. Health Perspect.* 1994; 102 (Suppl. 3): 169–176.
11. Sugiyama M., Sugiyama M. Role of paramagnetic chromium in chromium (VI)-induced damage in cultured mammalian cells. *Environ. Health Perspect.* 1994; 102 (Suppl. 3): 31–33.

Поступила 04.05.07