

УДК 575.224.46:612.42

ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЙ МОЛИБДЕНА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Бобылева Л.А.*ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова»,
Владикавказ, e-mail: bobial@yandex.ru*

В статье представлены экспериментальные данные по изучению мутагенных свойств соединений молибдена в лимфоцитах человека в условиях производства (*in vivo*) и эксперимента (*in vitro*). В цели исследования входило: 1) изучение спонтанного уровня формирования структурных перестроек хромосом в лимфоцитах рабочих, контактирующих с солями молибдена, в зависимости от стажа работы, для выяснения возможной адаптации человека к действию тяжелых металлов; 2) изучение индивидуальной чувствительности рабочих к воздействию молибдена и его соединений; 3) изучение влияния соединений молибдена на процессы репарации ДНК в лимфоцитах рабочих молибденового цеха. Результаты исследования показали, что в лимфоцитах рабочих молибденового цеха происходило накопление мутационных преобразований, которые регистрировались по критериям формирования хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов. Установлено, что в культивируемых лимфоцитах рабочих молибденового цеха с большим стажем ресинтез молибдениндуцируемых разрывов ДНК у большинства обследованных рабочих был значительно подавлен. В процессе контакта с солями молибдена в организме рабочих не развивались адаптационные механизмы, что выражалось в гиперчувствительности ДНК к этим соединениям и снижении репарационной активности.

Ключевые слова: химический мутагенез, мутагенные эффекты соединений молибдена, хромосомные aberrации, сестринские хроматидные обмены

STUDY OF MUTAGENIC PROPERTIES OF COMPOUNDS OF MOLYBDENUM IN HUMAN LYMPHOCYTES

Bobyleva L.A.*North Ossetian State University K.L. Khetagurov», Vladikavkaz, e-mail: bobial@yandex.ru*

The article presents experimental data on the study of the mutagenic properties of molybdenum compounds in human lymphocytes in the conditions of production (*in vivo*) and experiment (*in vitro*). The objectives of the study included: 1) the study of the spontaneous level of formation of structural rearrangements of chromosomes in lymphocytes of workers in contact with molybdenum salts, depending on the mill work to determine the possible adaptation of man to the action of heavy metals; 2) the study of individual sensitivity of workers to the effects of molybdenum and its compounds; 3) to study the effect of molybdenum compounds on the processes of DNA repair in lymphocytes of workers molybdenum plant. The results of the study showed that the accumulation of mutational transformations occurred in the lymphocytes of the molybdenum workshop workers, which were recorded according to the criteria for the formation of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. It was found that in cultured lymphocytes of workers of molybdenum shop with a long experience of resynthesis of molybdenum induced DNA breaks in most of the examined workers was significantly suppressed. In the process of contact with molybdenum salts in the body of workers did not develop adaptive mechanisms, which was expressed in the DNA hypersensitivity to these compounds and reduction of reparative activity.

Keywords: chemical mutagenesis, mutagenic effects of molybdenum compounds, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges

Важной проблемой современности являются последствия неблагоприятного влияния на здоровье людей промышленного загрязнения, особенно в городах с развитым металлургическим производством. Изучению данной проблемы посвящены разноаспектные исследования зарубежных и отечественных ученых и специалистов [1, 2], разработаны информативные методы экологической токсикологии [3]. Установлено, что из числа опасных загрязнителей среды особое значение имеют тяжелые металлы (кадмий, цинк, свинец и многие другие), обладающие высокими мутагенными свойствами, нарушающими целостность наследственных структур и «разрушающими» механизмы важнейших метаболиче-

ских процессов организма [4–6]. В результате ухудшается качество здоровья людей нынешнего поколения и возрастает угроза нарушений здоровья у будущих поколений.

В контексте сказанного вызывает интерес изучение исследования токсической и мутагенной активности соединений молибдена – одного из типичных загрязнителей производственной среды. Данные многолетних медицинских наблюдений за состоянием здоровья людей, занятых в молибденовом производстве, констатируют токсические явления, классифицирующиеся как молибденозы, которые появляются при избыточных концентрациях молибденовых соединений в атмосфере и почвах. По симптоматике молибденозы напомина-

ют подагру и сопровождаются повышением содержания в крови мочевой кислоты, наблюдаются артрозы, полиартралгии, снижается активность каталазы и количества глобулинов, увеличивается общее содержание глутатиона. У рабочих молибденовых цехов фиксируются гипотонии, лабильность кровяного давления, функциональное нарушение нервной системы, нарушение обменных процессов.

В воздушной среде цехов молибденового производства обнаруживается высокодисперсионная пыль, содержащая молибден в концентрации 9,6–72,3 мг/м³, при этом у рабочих появляются жалобы на частый кашель, сухость в носу, першение в горле, появляются фарингиты, гастриты, сердечно-сосудистая дистония. По своим токсическим характеристикам молибден внесен во 2-й класс опасности химических элементов, содержащихся в выбросах и почвах промышленных предприятий, уступая лишь свинцу, цинку, кадмию, мышьяку и меди. Предельно допустимые концентрации для растворимых соединений молибдена в виде комплекса аэрозолей конденсации 2 мг/м³, в виде пыли – 4 мг/м³, для нерастворимых соединений молибдена – 6 мг/м³, которые по данным справок о средних концентрациях вредных веществ в воздухе рабочих помещений молибденового цеха могут превышать вдвое [7].

Исследования по оценке мутагенной активности соединений молибдена (Мо, молибденовый огарок, молибденат аммония) были ранее проведены нами в экспериментальных условиях на лабораторных млекопитающих методом метафазного анализа хромосом в клетках костного мозга, результаты которых показали высокую генотоксическую активность исследуемых веществ [8]. Было установлено, что наибольшим мутагенным эффектом обладал молибденат аммония, который вызывал наибольшее поражение наследственного аппарата животных (ХА = 11,77 ± 21,44%, число клеток с ХА = 9,66 ± 1,24%) по сравнению с контрольными данными (ХА = 1,27 ± 0,51%) и данными по действию Мо (ХА = 2,86 ± 0,9%) и молибденового огарка (ХА = 2,09 ± 1,05%).

Приведенные данные свидетельствуют о потенциальной генетической опасности воздействия молибдена и его соединения для людей, занятых в молибденовом производстве, а также обуславливает необходимость поиска средств по снижению и защите генома человека от вредного влияния данного мутагена.

В цели исследования входило:

1) изучение спонтанного уровня формирования структурных перестроек хромосом

в лимфоцитах рабочих, контактирующих с солями молибдена, в зависимости от стажа работы, а также выяснения возможной адаптации человека к действию тяжелых металлов (*in vivo*, *in vitro*);

2) изучение индивидуальной чувствительности рабочих к воздействию молибдена и его соединений;

3) изучение влияния соединений молибдена на процессы репарации ДНК в лимфоцитах рабочих молибденового цеха.

Материалы и методы исследования

1. Анализ хромосомных aberrаций (ХА) лимфоциты периферической крови человека культивировали макрометодом общепринятой методики Moorcheda P.S. et al (1960) [9].

2. Учет сестринских хроматидных обменов (СХО) и скорости прохождения генерации (СНГ) лимфоцитов периферической крови человека (препараты окрашивали по модифицированной ФПГ-технике, предложенной Лазутка, Лежачус, 1984) [10].

3. Определение выживаемости клеток при индуцированном влиянии исследуемых агентов (подсчет живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных в синий цвет) клеток проводили в камере Горяева).

4. Математическая обработка полученных результатов.

Результаты исследования и их обсуждение

В цитогенетическом обследовании приняли участие две группы рабочих молибденового цеха, имеющих разный стаж работы на данном производстве (первая группа – стаж работы от 0,5 до 1,5 лет; вторая группа – свыше 10 лет). В третью группу входили 10 здоровых доноров, не имеющих контакта с соединениями молибдена и другими мутагенами. Оценка спонтанного уровня формирования структурных перестроек хромосом осуществлялась методами учета ХА и СХО в лимфоцитах крови и изменения скорости прохождения клеточных генераций под действием мутагенов.

По данным цитогенетического анализа, у рабочих первой группы было зарегистрировано статистически достоверное увеличение спонтанного уровня ХА по сравнению с данными контрольной группы, в которой в среднем уровень ХА был равен 2,01 ± 0,38%. При этом у рабочих с малым стажем работы этот уровень был значительно выше и соответствовал 12,41 ± 1,01%.

Выявленный спектр ХА на 62,35% характеризовался хроматидными нарушениями в виде микрофрагментов, простых делеций, хроматидных транслокаций, изо-

локусов с воссоединением. Хромосомные aberrации, которых выявлено 37,95%, были представлены парными фрагментами и хромосомными обменов, причем последних было всего 7% от общего числа aberrации, что дает основание предполагать, что мутаген блокировал процессы образования различного рода обменов. Приведенные данные по спектру ХА свидетельствуют о том, что увеличение их числа у рабочих происходило преимущественно за счет перестроек хроматидного типа, что свидетельствует о действии мутагенов по задержанному типу – в S и G₂ фазах клеточного цикла.

Уровень СХО в лимфоцитах рабочих этой группы также достоверно превышал контрольные данные. Средние данные в данной группе рабочих равнялись 11,9 обм/кл., в контрольной группе – 7,70 ± 0,23 обм/кл. При этом формирование СХО в клетках рабочих происходило на фоне значительного снижения скорости прохождения генерации лимфоцитов (в контрольной группе СПГ в среднем соответствовала 1,9; в группе рабочих с малым стажем – 1,3).

Средний уровень ХА в лимфоцитах рабочих второй группы (стаж 10 лет) также достоверно превышал уровень контрольной группы, но имел более низкие значения – 7,90 ± 1,14%. Спектр ХА во второй группе отличался от данных первой группы полным отсутствием как хроматидных, так и хромосомных обменов, что подтверждает высказанное предположение о блокаде процессов образования сложных хромосомных перестроек под действием молибдена и его соединений. Отмечено также изменение соотношения количества aberrаций хроматидного и хромосомного

типа в сторону увеличения первых (aberrации хроматидного типа – 84,49%; aberrации хромосомного типа – 15,59%). Соотношение средних данных по спонтанному уровню СХО в первой и второй группах коррелировало с данными по тесту на ХА, т.е. с увеличением стажа работы снижались показатели СХО. А именно, уровень СХО в лимфоцитах рабочих второй группы был равен 9,10 ± 0,54 обм/кл., что достоверно выше, чем в клетках лиц контрольной группы (7,70 ± 0,23 обм/кл.), но ниже уровня СХО в лимфоцитах рабочих первой группы (11,90 ± 0,71 обм/кл.). Формирование СХО и в данном случае происходило на фоне снижения скорости прохождения генерации лимфоцитов до 1,5.

Из приведенных данных следует, что в процессе хронического контакта рабочих с солями молибдена происходила стабилизация спонтанных уровней ХА и СХО в клетках крови. Можно предположить, что это происходило либо за счет некоторой адаптации организма к их действию, либо за счет «отсева» людей с повышенной чувствительностью генотипа к молибдену, сказывающейся на состоянии их здоровья.

В производственных условиях рабочие молибденового цеха кроме солей молибдена подвергаются воздействию целого ряда других вредных факторов, таких как повышенная температура, аммиачные пары, металлическая пыль и других. В связи с этим целью следующего этапа исследований явилось выяснение степени чувствительности ДНК рабочих данного цеха к основному загрязнителю. С этой целью в условиях *in vitro* лимфоциты рабочих в течение 24 ч обрабатывались молибденатом аммония в концентрации 10⁻⁵ М.

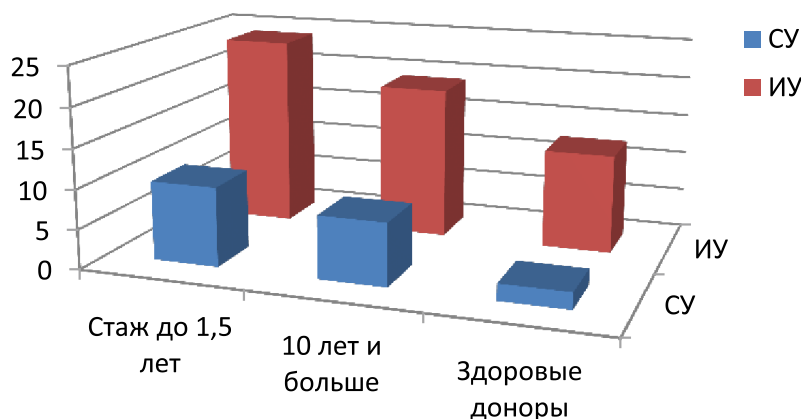


Рис. 1. Спонтанный (СУ) и индуцированный (ИУ) соединениями молибдена уровни хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах рабочих молибденового цеха с разным стажем работы на фоне контрольных данных

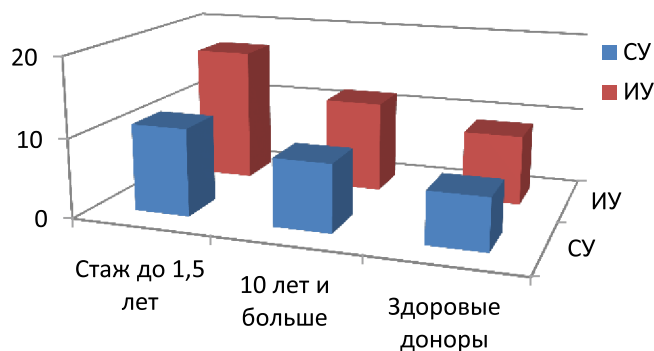


Рис. 2. Спонтанный (СУ) и индуцированный (ИУ) соединениями молибдена уровни сестринских хроматидных aberrаций (СХО) в лимфоцитах рабочих молибденового цеха с разным стажем работы на фоне контрольных данных

На рис. 1 и 2 представлены средние данные по обеим группам проведенного эксперимента, в котором учитывалась частота ХА, число СХО на клетку и изменения показателей СПГ лимфоцитов, обработанных мутагеном. Наибольшее возрастание индуцированного уровня ХА (на 15,29%) наблюдалось в лимфоцитах рабочих первой группы – $27,78 \pm 2,46\%$. В лимфоцитах рабочих второй группы индуцированный уровень ХА был равен $19,12 \pm 2,31\%$, что на 11,22% выше спонтанного. У лиц контрольной группы этот уровень возрос до $9,93 \pm 1,93\%$.

Спектр индуцированных мутагеном aberrаций в лимфоцитах рабочих обеих групп коррелировал со спонтанным уровнем – в обеих группах преобладали структурные нарушения хроматидного типа (до 68%).

По тесту СХО также была обнаружена повышенная чувствительность ДНК рабочих к действию мутагена в условиях *in vitro*. В клетках рабочих первой группы индуцированный уровень СХО равнялся $17,30 \pm 0,91$ обм/кл. (спонтанный уровень – $11,90 \pm 1,04$ обм/кл.), второй группы – $10,50 \pm 1,34$ обм/кл. (спонтанный уровень – $9,10 \pm 1,20$ обм/кл.). В лимфоцитах лиц контрольной группы, при индукции мутагеном число СХО на клетку возросло до $11,20 \pm 0,87$ обм/кл., при спонтанном уровне равном $7,70 \pm 0,23$ обм/кл. Приведенные данные подтвердили повышенную чувствительность к действию основного мутагена (молибдену и его солям) наследственных структур всех обследованных рабочих молибденового цеха независимо от стажа работы.

При изучении индивидуальных показателей чувствительности к действию молибденовых соединений были получены

следующие результаты. Наиболее широкий разброс данных по частоте ХА наблюдался в первой группе (от $4,40 \pm 0,32\%$ до $23,40 \pm 3,12\%$). Во второй группе показатели уровня ХА были более равномерными и колебались в меньших пределах (от $1,70 \pm 0,85\%$ до $12,0 \pm 2,83\%$). Разброс данных по уровню ХА в контрольной группе не выявил достоверных отличий (от $1,48 \pm 0,24\%$ до $3,15 \pm 1,02\%$). Интересным является тот факт, что у лиц с высоким спонтанным уровнем структурных нарушений наследственного аппарата в исследованиях *in vivo* наблюдалось кратное возрастание числа этих нарушений при индуцированном влиянии молибдена аммония на их лимфоциты в условиях *in vitro*. Сходные результаты были получены по показателям СХО и СПГ.

По мнению В.С. Баранова, индивидуальная реакция генома на различные экзогенные (экологические) факторы в значительной мере определяется функциональными особенностями генов метаболизма и генов системы репарации ДНК [11]. Данное утверждение подтверждается результатами нашего исследования, в котором выявлена индивидуальная чувствительность генома рабочих к действию соединений молибдена. Полагаем, что свойство индивидуальной чувствительности генома человека к влиянию разных производственных вредностей, в том числе соединений молибдена, может быть использовано для проведения экспресс-диагностики (методом цитогенетического анализа в условиях *in vitro*) лиц, поступающих на работу во вредное производство, что позволит исключить из штата металлургических предприятий работников с высоким риском неблагоприятных генетических последствий от контакта с названными мутагенами.

Заключение

Проведенные исследования по критериям формирования хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов показали, что в лимфоцитах рабочих молибденового цеха происходило накопление мутационных преобразований. Процесс индукции структурных перестроек хромосом может быть связан с возникающими под действием мутагенов нарушениями в работе репарационных механизмов, восстанавливающих спонтанные и индуцированные повреждения ДНК в норме. Показатели устойчивости ДНК к влиянию соединений молибдена или, наоборот, повышенной чувствительности к ним характеризуют состояние ключевых систем клеточного гомеостаза в условиях длительного контакта с мутагеном.

Анализ формирования разрывов ДНК в культивируемых лимфоцитах рабочих молибденового цеха с большим стажем показал, что чувствительность ДНК к соли молибдена была значительно повышена по сравнению с чувствительностью. Ресинтез молибден-индуцированных разрывов ДНК у большинства обследованных рабочих был значительно подавлен. Обследованных рабочих можно разделить на две группы: первая характеризовалась определенной устойчивостью к используемому мутагену; вторая группа характеризовалась повышенной чувствительностью к этим мутагенам. Независимо от чувствительности ДНК к использованным мутагенам в большинстве случаев ресинтез возникающих разрывов ДНК был сниженным. Анализ данных по формированию структурных перестроек хромосом и репарации ДНК позволяет предполагать, что в процессе контакта с солями молибдена в организме рабочих адаптационные механизмы на уровне клеток не развивались.

Подводя итог, важно подчеркнуть, что представленные данные о генотоксических эффектах соединений молибдена в производственных и экспериментальных условиях, свидетельствуют о продолжающемся нарастании антропогенно-

го давления на здоровье людей. В группе повышенного риска, по данным исследований, теперь оказываются не только рабочие вредного производства, но и все население промышленных городов, поскольку такое производство сопровождается загрязнением опасными мутагенами среды жизни людей на значительно больших территориях, чем территории самого производства.

Список литературы

1. Wnuk M., Lewinska A., Bartosz G., Slota E. Oxidant induced decrease of the expression of nucleolar organizer regions in pig lymphocytes can be useful for monitoring the cellular effects of oxidative stress. *Mutation Research*. 2008. № 653 (1–2). P. 124–129.
2. Алборов И.Д., Харебов Г.З., Гасанов С.А., Пономарь Р.В. Влияние отходов цветной металлургии на экологию региона // *Вестник Международной академии наук экологии, безопасности человека и природы (Вестник МАНЭБ)*. 2013. Т. 18. № 4. С. 9–11.
3. Губина Т.И., Рогачева С.М. Основы экологической токсикологии. Саратов: СГТУ, 2012. 108 с.
4. Ringer T.M. C->T transition mutations are not solely UVB-signature mutations, because they are also degenerated by UVA. *The Journal of investigative dermatology*. 2008. № 128 (9). P. 2138–2140.
5. Helbig K., Grosse C., Nies D.H. Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2008. № 190 (15). P. 5439–5454.
6. Абилов С.К. Полиморфизм генов, как индикатор чувствительности человека факторам окружающей среды // *Материалы объединенного пленума научных советов Минздрава и РАМН по экологии человека и гигиене окружающей среды и по медико-экологическим проблемам здоровья работающих* / Под ред. Ю.А. Рахманина, Н.Ф. Измерова. М., 2010. С. 22.
7. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды и природных ресурсов Республики Северная Осетия – Алания в 2014 году». Владикавказ, 2014. С. 123–135.
8. Чопикашвили Л.В., Бобылева Л.А., Золотарева Г.Н. Генотоксические эффекты тяжелых металлов и их солей в эксперименте на дрозофиле и млекопитающих // *Цитология и генетика*. 1989. Т. 24. № 3. С. 35–38.
9. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exper. Cell. Res.* 1960. Vol. 20. P. 613–616.
10. Лазутка Ю.С., Лежневич Р.К. Методические указания по изучению мутагенов среды. Вильнюс, 1984. 184 с.
11. Баранов В.С. Полиморфизм генов, экогенетические болезни и генетический паспорт // *Экологическая генетика*. 2011. Т. 9. № 3. С. 3–14.