

## ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ ВИТАМИНА С В ДИЕТУ НА УРОВЕНЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У РАБОЧИХ-НЕФТЯНИКОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ГЕНАМ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ

Ильинских Н.Н.<sup>1,2</sup>, Ильинских Е.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России», Томск, e-mail: nauka-tomsk@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет Министерства науки и образования России», Томск, e-mail: ilyinskikh@yandex.ru

Целью настоящей работы явилось использование витамина С для коррекции цитогенетической нестабильности у рабочих-буровиков, различающихся по генам фермента глутатион-S-трансферазы GSTM1 и GSTT1. Обследовано 194 рабочих-буровиков в возрасте 23–38 лет, занятых на нефтепромыслах севера Томской и Тюменской областей. Каждый рабочий ежедневно на протяжении 20 дней получал в составе своего рациона 1 г аскорбиновой кислоты. Взятие биологического материала (соскоб слизистой полости рта) проводили дважды до (контроль) и после (опыт) начала добавления аскорбиновой кислоты в диету. У каждого человека цитогенетически анализировали не менее 1000 эпителиоцитов. Обследование рабочих-буровиков, работающих на нефтепромыслах севера Томской и Тюменской областях, выявило у некоторых из них значимое повышение числа клетокбуккального эпителия полости рта с кариопатологическими нарушениями. Анализ генов глутатион-S-трансферазы показал, что наиболее значимые изменения в числе патологически измененных клеток наблюдалось у носителей нулевых аллелей GSTM1 и/или GSTT1. Добавление в диету аскорбиновой кислоты у этой группы рабочих способствовало достоверному снижению уровня цитогенетических нарушений.

Ключевые слова: эпителиальные клетки, кариопатологические нарушения, GSTM1, GSTT1, генетический полиморфизм, нефтяники, нефтепромыслы, Западная Сибирь.

## EFFECTS OF THE VITAMIN C ADDITION TO THE DIET ON THE CYTOGENETIC ABERRATION FREQUENCY IN OILRIG WORKERS ACCORDING TO GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE GENES

Ilyinskikh N.N.<sup>1,2</sup>, Ilyinskikh E.N.<sup>1,2</sup>

Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: nauka-tomsk@yandex.ru;

National Research Tomsk State University, Tomsk, e-mail: ilyinskikh@yandex.ru

The aim of this study was to assess effects of the vitamin C to rectify the genetic instability in oilrig workers who had genetic polymorphism in glutathione-S-transferase enzyme genes of GSTM1 and GSTT1. We examined 194 oilrig workers, 23 to 38 years of age, who were hired at oil fields of the north of Tomsk and Tyumen regions. Each of the workers received about 1.0 g of ascorbic acid daily in their diet during 20 days. Samples of material (scrapes of buccal epithelial cells) were obtained twice before (controls) and after the beginning of the addition vitamin C to the diet. We were cytogenetically analyzed about 1000 epithelial cells in each individual. The examination of the oilrig workers hired at oil fields of the north of Tomsk and Tyumen regions revealed that some of them had a significant increase in the frequency of buccal epithelial cells with karyopathological damages. Analysis of glutathione-S-transferase genes showed that the highest frequencies of the cells with karyopathological aberrations were detected in the workers with null alleles of GSTM1 and/or GSTT1. The addition of ascorbic acid to the diet of this group of workers contributed to a significant decrease in the frequency of the cytogenetic abnormalities.

Keywords: epithelial cells, karyopathological aberrations, GSTM1, GSTT1, genetic polymorphism, oilrig workers, oil fields, West Siberia.

Ранее проведенными нами исследованиями было показано, что у рабочих-буровиков, работающих на нефтепромыслах севера Сибири, существенно повышено число цитогенетически измененных лимфоцитов крови и буккальных эпителиоцитов, что мы связываем с мутагенным действием генотоксикантов углеводородного происхождения [4].

Установлено, что уровень цитогенетических нарушений у рабочих-буровиков был различен в зависимости от присутствия в их генотипе определенных вариантов аллелей генов фермента глутатион-S-трансферазы GSTM1 и GSTT1 [6,8]. Имеются исследования, в которых было показано, что внедрение некоторых микронутриентов в диету рабочих трудящихся на потенциально вредных производствах существенно снижает в их организме риск возникновения цитогенетических аномалий. При этом особое место занимает использование хорошо апробированного антимуутагена – аскорбиновой кислоты [1,3,12,13]. Целью настоящей работы явилось использование витамина С для коррекции цитогенетической нестабильности у рабочих-буровиков, различающихся по генам фермента глутатион-S-трансферазы GSTM1 и GSTT1.

### **Материал и метод**

Обследовано 194 рабочих-буровиков в возрасте 23–38 лет, работающих вахтовым методом на нефтепромыслах севера Томской и Тюменской областей. Каждый рабочий в утреннее время за завтраком на протяжении 20 дней получал через систему блока-питания 200 г кефира с добавленным 1 граммом аскорбиновой кислоты. Взятие биологического материала (соскоб слизистой полости рта) проводили дважды до (контроль) и после (опыт) 20-дневного окончания эксперимента с аскорбиновой кислотой. Все обследованные дали индивидуальное добровольное согласие на проведение настоящих исследований. У каждого человека цитогенетически анализировали не менее 1000 эпителиоцитов. Приготовление препаратов из клеток буккального эпителия полости рта человека, фиксация, окраска и критерии оценки цитогенетических нарушений в эпителиоцитах изложены нами ранее [7]. Кроме того, из клеток буккального эпителия выделяли ДНК реактивами и методом, разработанным компанией Prep Filer Automated Forensic DNA Extraction Kit (USA). При анализе генов GSTM1 и GSTT1 на наличие делеций использовали мультиплексную ПЦР. В амплификационную пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты каждого из указанных генов. Нормальные аллели генов характеризуются присутствием ПЦР-продуктов: для GSTM1 (гомозиготы GSTM1 +/+ и гетерозиготы GSTM1 +/-) для GSTT1 (гомозиготы GSTT1 +/+ и гетерозиготы GSTT1 +/-). Делеционные («нулевые») гомозиготные варианты (GSTM1 0/0 и GSTT1 0/0) выявлялись по отсутствию фрагментов GSTM1 и GSTT1. Для генов GSTM1 и GSTT1 генотип 0/0 означает отсутствие на электрофореграмме фрагмента, соответственно, и данный индивидуум гомозиготен по делеции. Значок "+" означает присутствие фрагмента и данный донор либо гетерозиготен, либо гомозиготен по отсутствию делеции в указанных генах. Проведено анкетирование обследованных рабочих, при этом учтены: возраст, стаж работы

на нефтепромыслах, национальность, пристрастие к курению, алкоголю, отсутствие в течение года рентгеновского и других видов облучения и вирусных инфекций, способных повлиять на результаты цитогенетического анализа.

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических программ STATISTICA v.6.0. Частоты гаплотипов сцепленных локусов для гена *GSTM1* рассчитывали в программе “The EH software program, Rockefeller University, NY”. Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением корреляционного анализа по Спирмену и *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, поскольку тестирование закона распределения при помощи критерия Колмогорова – Смирнова не выявило отличий от нормального [2]. Различия сравниваемых результатов ( $X \pm m$ , где  $X$  – выборочное среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Полученные данные свидетельствуют (таблица), что наблюдается четко выраженный полиморфизм в числе клеток с кариопатологическими изменениями в буккальном эпителии у рабочих-нефтяников в зависимости от наличия в их генотипе определенных аллелей генов фермента глутатион-S-трансферазы. Особенно существенно повышенным был уровень кариопатологических нарушений у рабочих имеющих сочетание гомозиготного нулевого генотипа одновременно по генам *GSTM1* и *GSTT1*. Значимое повышенное число клеток с кариопатологическими изменениями было зарегистрировано также и для рабочих имеющих сочетание генов *GSTM1* (0/0) и *GSTT1*(+) по сравнению с нормальной гомозиготой *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+) и гетерозиготой *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0). Имеются данные свидетельствующие о том, что нулевые генотипы по глутатион-S-трансфераз (*GSTM1* и *GSTT1*) ассоциированы с более высоким уровнем цитогенетических aberrаций [10,11]. Полученные нами результаты подтверждают это заключение в отношении нулевого генотипа *GSTM1*. Среди наблюдаемых aberrаций наиболее часто наблюдались клетки с микроядрами и протрузиями, которые возможно отнести к истинным цитогенетическим aberrациям, поскольку они образуются в результате отставания в митозе ацентрических фрагментов и отдельных хромосом [7].

Эффекты добавления витамина С на частоту эпителиоцитов буккального эпителия с кариопатологическими изменениями у рабочих-нефтяников в связи с полиморфизмом генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1* и *GSTT1*

| Число клеток патологическими изменениями ( в % )                                  | Генотипы                           |                                  |                                  |                                |
|---|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|   | <i>GSTM1 (0/0)<br/>GSTT1 (0/0)</i> | <i>GSTM1 (+)<br/>GSTT1 (0/0)</i> | <i>GSTM1 (0/0)<br/>GSTT1 (+)</i> | <i>GSTM1 (+)<br/>GSTT1 (+)</i> |
|   | n=36                               | n=48                             | n=34                             | n=76                           |
| Показатели кариопатологических изменений в буккальном эпителии в контроле ( в % ) |                                    |                                  |                                  |                                |
| Аберрантные клетки всех типов   | <u>38,5 ± 3,1</u>                  | 13,1 ± 1,7                       | <u>24,3 ± 3,6</u>                | 9,6 ± 1,1                      |
| Микроядра   | <u>12,8 ± 1,3</u>                  | 5,1 ± 0,6                        | <u>8,1 ± 0,6</u>                 | 4,1 ± 0,4                      |
| Центральная круговая насечка  | <u>6,2 ± 0,5</u>                   | 3,1 ± 0,7                        | <u>4,5 ± 0,5</u>                 | 2,0 ± 0,5                      |
| Протрузии типа «разбитое яйцо»  | <u>5,0 ± 0,7</u>                   | 0,5 ± 0,2                        | 1,9 ± 0,5                        | 0,6 ± 0,2                      |
| Протрузии типа «язык»   | <u>2,1 ± 0,4</u>                   | 0,7 ± 0,2                        | <u>2,0 ± 0,4</u>                 | 0,5 ± 0,2                      |
| Двухядерные клетки  | <u>3,6 ± 0,7</u>                   | 0,5 ± 0,1                        | <u>1,5 ± 0,5</u>                 | 0,2 ± 0,1                      |
| Кариорексис   | <u>1,5 ± 0,5</u>                   | 0,2 ± 0,1                        | <u>1,1 ± 0,2</u>                 | 0,2 ± 0,1                      |
| Кариолизис  | <u>2,6 ± 0,4</u>                   | 0,7 ± 0,4                        | 0,5 ± 0,1                        | 0,4 ± 0,2                      |
| Кариопикноз   | <u>0,9 ± 0,2</u>                   | 0,8 ± 0,3                        | 0,5 ± 0,2                        | 0,5 ± 0,1                      |
| Перинуклеарные вакуоли  | <u>3,8 ± 0,8</u>                   | 1,5 ± 0,5                        | <u>4,2 ± 0,7</u>                 | 1,1 ± 0,5                      |
| Показатели кариопатологических изменений в буккальном эпителии в опыте ( в % )    |                                    |                                  |                                  |                                |
| Аберрантные клетки всех типов   | <u>26,9 ± 2,3*</u>                 | 7,0 ± 1,1*                       | <u>15,2 ± 3,4*</u>               | 5,7 ± 0,7**                    |
| Микроядра   | <u>6,2 ± 0,5*</u>                  | 2,8 ± 0,3*                       | <u>5,1 ± 0,5*</u>                | 2,3 ± 0,2*                     |
| Центральная круговая насечка  | <u>4,0 ± 1,5</u>                   | 1,2 ± 0,3                        | 2,1 ± 0,4**                      | 1,1 ± 0,3                      |
| Протрузии типа «разбитое яйцо»  | <u>2,1 ± 0,5*</u>                  | 0,3 ± 0,1                        | 1,2 ± 0,3                        | 0,3 ± 0,2                      |
| Протрузии типа «язык»   | 0,8 ± 0,3*                         | 0,4 ± 0,3                        | <u>1,1 ± 0,1</u>                 | 0,2 ± 0,1                      |
| Двухядерные клетки  | <u>1,8 ± 0,5</u>                   | 0,4 ± 0,2                        | 1,2 ± 0,4                        | 0,3 ± 0,1                      |
| Кариорексис   | <u>3,4 ± 0,3**</u>                 | 0,1 ± 0,1                        | <u>0,8 ± 0,2</u>                 | 0,2 ± 0,1                      |
| Кариолизис  | 4,0 ± 0,2**                        | 0,3 ± 0,2                        | 0,3 ± 0,1                        | 0,3 ± 0,2                      |
| Кариопикноз   | 1,9 ± 0,1**                        | 0,5 ± 0,1                        | 0,2 ± 0,1                        | 0,3 ± 0,1                      |
| Перинуклеарные вакуоли  | <u>2,7 ± 0,3</u>                   | 1,0 ± 0,2                        | <u>3,2 ± 0,5</u>                 | 0,7 ± 0,4                      |

Примечание. Значимые отличия показателей в опытной и контрольной группах отмечены звездочками, а между группами рабочих, содержащих в генотипе мутантные нулевые аллели и группой с нормальным генотипом *GSTM1 (+)/GSTT1(+)* отмечены чертой: одной – при  $P < 0,05$ ; двумя – при  $P < 0,01$ .

В некоторых группах рабочих, принимавших на протяжении 20 дней аскорбиновую кислоту в дозе 1 г в сутки, наблюдались по некоторым показателям значимые изменения.

Частота клеток с микроядрами у рабочих, получавших витамин С и имеющих нулевой гомозиготный генотип по генам GSTM1 и GSTT1, снижалась в 2,1 раза ( $6,2 \pm 0,5$  при  $12,8 \pm 1,3$  ‰ в контроле;  $p < 0,01$ ), протрузии типа «разбитое яйцо» в 2,1 ( $2,1 \pm 0,5$  и  $5,0 \pm 0,7$  ‰;  $p < 0,01$ ) и типа «язык» в 2,6 раза ( $0,8 \pm 0,3$  и  $2,1 \pm 0,4$  ‰;  $p < 0,01$ ). Иные закономерности отмечены в отношении кариопатологических изменений, характеризующих апоптотический процесс. Известно, что кариопикноз, кариорексис и кариолизис относятся к определенным этапам деструкции ядра и эти изменения характеризуют процесс распада хроматина при апоптозе [7]. У рабочих, получавших витамин С, и имеющих нулевые гомозиготы по генам GSTM1 и GSTT1 число клеток с кариопикнозом было значимо выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), то же возможно сказать и о частоте клеток с кариорексисом ( $p < 0,05$ ) и кариолизисом ( $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ частоты клеток с микроядрами и показателями деструкции ядра свидетельствуют о наличии в буккальном эпителии у рабочих с генотипом GSTM1(0/0)/GSTT1(0/0) обратно пропорциональной связи с кариопикнозом ( $r = -0,56$ ;  $p < 0,05$ ), с кариорексисом ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,01$ ) и кариолизисом ( $r = -0,75$ ;  $p < 0,01$ ). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что некоторая часть клеток с микроядрами устраняется за счет стимуляции апоптотических процессов. Имеется исследование, где показано, что витамин С способен стимулировать апоптоз [9]. Согласно полученным нами данным этот эффект наблюдается только у носителей нулевых аллелей гена GSTM1(0/0)/GSTT1(0/0). В остальных группах рабочих изменений в показателях деструкции ядра клеток буккального эпителия не наблюдались.

Как известно, крупные микроядра формируются в основном за счет отставших целых хромосом, а мелкие из ацентрических фрагментов [7]. Анализ размеров микроядер свидетельствует о том, что у рабочих, получавших витамин С, наблюдается в основном снижение числа мелких микроядер (диаметр меньше 3 мкм). Возможно, это может быть связано с ролью аскорбиновой кислоты в стимуляции эксцизионной репарации ДНК [3]. Антимутагенный эффект аскорбиновой кислоты может проявляться и в том, что она способна повышать активность лимфоцитов-киллеров, одной из функций которых является устранение из организма генетически дефектных клеток [5]. Следует также отметить, что имеются данные, свидетельствующие о неоднозначной роли аскорбиновой кислоты в устранении генетических повреждений, так как в некоторых условиях она может наоборот способствовать усилению мутационного процесса [9].

### **Заключение**

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что у рабочих нефтяников, в диету которых был введен витамин С, наблюдается снижение числа клеток

буккального эпителия с микроядрами. Особенно значительные кариопатологические изменения наблюдались у рабочих-буровиков, имеющих нулевые аллели генов GSTM1 и GSTT1. Показано, что у рабочих, получавших витамин С, имеющих в генотипе нулевой аллель гена GSTM1, наряду со снижением числа клеток с микроядрами и протрузиями значимо возрастает количество клеток с кариопикнозом, кариорексисом и кариолизисом, что является свидетельством об усилении в буккальном эпителии апоптотических процессов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РГНФ № 06-15-10190 и РФФИ № 16-40-700149.*

### Список литературы

1. Бобылева Л.А., Чопикашвили Л.В., Алехина Н.И., Засухина Г.Д. Модификация аскорбиновой кислотой спонтанного и индуцированного уровней ХА и СХО в лимфоцитах рабочих, контактирующих с солями молибдена // Генетика. – 1993. – Т. 29 (3). – С. 430-434.
2. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. – М.: Филинь, 1997. – 608 с.
3. Засухина Г.Д., Чопикашвили Л.В., Бобылева Л.А. Аскорбиновая кислота снижает мутационные преобразования у рабочих, контактирующих с тяжелыми металлами // Докл. Акад. Наук. – 1991. – Т. 316(3). – С. 739-743.
4. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Ильинских Е.Н. Влияние генетического полиморфизма на цитогенетические последствия условий труда у рабочих на нефтепромыслах Сибири // Токсикологический вестник. – 2011. – № 5. – С. 34–40.
5. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.Ф. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. – Новосибирск: Наука, 1986. – 156 с.
6. Ильинских Н.Н., Язиков Е.Г., Ильинских Е.Н. и др. Феногенетические маркеры адаптогенеза к условиям нефтегазопромыслов севера Сибири (новые технологии отбора контингента трудовых ресурсов на нефтегазопромыслы севера Сибири). – Томск: ТПУ, 2012. – 420 с.
7. Ильинских Н.Н., Васильев С.А., Кравцов В.Ю. Микроядерный тест в скрининге и мониторинге мутагенов. Saarbrucken (Deutschland): LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH&Co.KG, 2011. – 216 с.
8. Ямковая Е.В., Ильинских Н.Н., Ильинских Е.Н. К вопросу об использовании генетических критериев в профессиональном отборе трудовых ресурсов на нефтепромыслах Сибири // Экология человека. – 2013. – № 10. – Р. 3–8.

9. Franke S.I., Prá D., da Silva J. et al. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo // *Mutat Res.* 2005. Vol.583(1). C.75-84.
10. Kumar M., Chauhan L.K., Paul B.N. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism in north Indian population and its influence on the hydroquinone-induced in vitro genotoxicity // *Toxicol. Mech. Methods.*2009. Vol. 19(1). P. 59–65.
11. Scarpato R., Hirvonen A., Migliore L. Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers // *Mutat. Res.* 1997. Vol. 389(2-3). P. 227–235.
12. Sram R.J., Dobias L., Pastorkova A. et al. Effect of ascorbic acid prophylaxis on the frequency of chromosome aberrations in the peripheral lymphocytes of coal-tar workers // *Mut. Res.* 1983. Vol. 120. P. 181-186.
13. Sram R.J., Binkova B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental - exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999 // *Environ. Health Perspect.* 2000. Vol. 108 (1). P. 57-70.