

МАРУЩАК АННА ВЛАДИМИРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ФОРМИРОВАНИЯ
ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ У РАБОТНИКОВ УГОЛЬНЫХ
ТЕПЛОЭЛЕКТРОСТАНЦИЙ**

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2026 г.

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный руководитель: **Минина Варвара Ивановна** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук»; заведующий кафедрой генетики и фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет»

Официальные оппоненты: **Ингель Фаина Исааковна** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетической токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

Лавряшина Мария Борисовна – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «2» декабря 2026 г. в «10.00» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференцзал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года

Ученый секретарь диссертационного совета
24.1.218.01 доктор биологических наук, доцент

Корытина Гульназ Фаритовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Поддержание стабильности генома – ключевое условие нормальной жизнедеятельности организма. Профессиональные группы, контактирующие с мутагенами, например, работники угольных теплоэлектростанций, подвергаются особому риску (Минина и др., 2019; Hendryx, Zullig, Luo, 2020; Tong et al., 2020; Zhao et al., 2022). В воздухе таких предприятий присутствует комплекс генотоксичных веществ (тяжёлые металлы, ПАУ, бензол, угольная пыль), что создаёт высокую опасность повреждения ДНК (Donbak et al., 2005; Kvitko et al., 2012; Leon-Mejia et al., 2016; da Silva et al., 2021; Muller et al., 2022; Wang et al., 2023; Wultsch et al., 2024).

Для оценки генотоксических эффектов применяют цитогенетические методы, такие как микроядерный тест с блоком цитокинеза (CBMN), позволяющий регистрировать хромосомные повреждения (Ингель, 2006; Fenech, Bonassi, 2011; Kirsh-Volders et al., 2014). Также важны эпигенетические исследования, например, анализ метилирования ДНК (Ganie et al., 2023; Mamontova et al., 2024). Индивидуальная чувствительность к мутагенам зависит от генетических вариантов в системах метаболизма ксенобиотиков (Oliveira de Araújo Melo et al., 2020; León-Mejía et al., 2021; Quintana-Sosa et al., 2023) и репарации ДНК (Wang et al., 2022). Высокой точностью отличаются современные подходы с использованием полногеномного секвенирования, позволяющие выявлять новые мутационные сигнатуры в клетках, включающие замены оснований, небольшие вставки и делеции (Pleguezuelos et al., 2020; Pan et al., 2021).

Высокая опасность производственной среды для здоровья работников сподвигла многие страны практически полностью отказаться от эксплуатации угольных теплоэлектростанций. Однако для угольных регионов мира высокая экономическая эффективность пока перевешивает, и число действующих угольных ТЭЦ остается довольно высоким. В связи с этим задача снижения генотоксических рисков у действующих работников угольной энергетики представляется чрезвычайно важной, имеющей не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Таким образом, для защиты здоровья работников угольной энергетики необходима комплексная оценка генетических и эпигенетических маркеров риска.

Цель исследования

Установить молекулярно-генетические особенности формирования геномной нестабильности у работников угольных теплоэлектростанций на основе комплексного анализа показателей микроядерного теста, статуса метилирования промоторов генов репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков и полиморфизма генов-кандидатов.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать показатели микроядерного теста с блоком цитокинеза в лимфоцитах периферической крови у работников угольных теплоэлектростанций в сравнении с контрольной группой с учётом известных конфаундеров (возраст, пол, статус курения, стаж, производственный участок, хронические заболевания).
2. Оценить статус метилирования промоторных регионов генов репарации ДНК (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*) и биотрансформации ксенобиотиков (*GSTP1*, *CYP1A1*, *GSTT1* – у носителей функционального аллеля) у работников угольных ТЭС и лиц контрольной группы; проанализировать связь уровня метилирования с производственными (стаж, производственный участок) и индивидуальными (пол, возраст, статус курения, хронические заболевания) факторами.
3. Провести сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов репарации ДНК (*XRCC1 rs25489*, *XRCC2 rs3218536*, *XRCC3 rs861539*,

ERCC2 rs13181, *ERCC5 rs17655*) и биотрансформации ксенобиотиков (*GSTP1 rs1138272*, делеция *GSTT1*, *CYP1A1 rs4646903*) у работников угольных ТЭС и лиц контрольной группы.

4. Установить ассоциации показателей микроядерного теста со статусом метилирования промоторов генов-кандидатов и с полиморфными вариантами генов репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков у работников угольных ТЭС; идентифицировать маркерные комбинации, ассоциированные с повышенным риском геномной нестабильности, методами логистической регрессии и анализа межлокусных взаимодействий.

5. Построить функциональную сеть взаимодействий генов-кандидатов, интегрирующую пути детоксикации ксенобиотиков и репарации ДНК, с целью обоснования кооперативного вклада изученных генов в единую систему защиты генома при воздействии производственных поллютантов.

6. Оценить относительный вклад производственных (стаж, производственный участок), индивидуальных (пол, возраст, статус курения, хронические заболевания) и молекулярных (генетический полиморфизм, статус метилирования промоторов генов-кандидатов) факторов в формирование геномной нестабильности у работников угольных ТЭС методами многофакторного регрессионного анализа.

Научная новизна

Впервые осуществлена комплексная (цитогенетическая, эпигенетическая и генетическая) оценка состояния генома работников угольных ТЭС, доказавшая сочетанное негативное влияние производственной среды на разные уровни его стабильности.

На репрезентативной выборке жителей промышленного региона (n=936) впервые у рабочих теплоэлектростанций верифицировано повышение (по сравнению с неработающими на производстве индивидами) частоты встречаемости ядерных повреждений (двухядерных клеток с микроядрами, мостами и протрузиями), частоты клеточной гибели (апоптоз) и зарегистрировано снижение пролиферативной активности лимфоцитов. Впервые определены цеха, сотрудники которых обладают наибольшей частотой цитогенетических нарушений и уровня метилирования изученных генов: топливно-транспортный, тепловой автоматики и измерений, ремонтный и химический.

Впервые у рабочих угольных теплоэлектростанций установлена большая распространенность гиперметилированного статуса промоторов генов *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*, *GSTP1*, *GSTT1*, *CYP1A1* по сравнению с не работающими на производстве индивидами.

Впервые показано, что эпигенетические изменения (в частности, гиперметилирование промотора гена *ERCC2*) выступают значимым связующим звеном между стажем работы и увеличением частоты цитогенетических повреждений, формируя основу для модели «производственный стаж → эпигенетические модификации → геномная нестабильность».

Впервые у работников ТЭС выявлены генетические маркеры как повышенного риска (*XRCC1*, *XRCC2*, *CYP1A1*, *GSTT1*), так и пониженного риска (*ERCC5*) развития цитогенетических повреждений, что расширяет понимание механизмов индивидуальной устойчивости.

Впервые выявлена ассоциация между полиморфизмом генов репарации (*XRCC1*, *ERCC5*) и гиперметилированием их собственных промоторов, указывающая на наличие генетически-контролируемой эпигенетической реакции на профессиональную экспозицию.

Впервые с использованием методов системной биологии (анализ белковых сетей STRING, функциональное обогащение KEGG/Reactome) построена и охарактеризована

функциональная сеть взаимодействия белков, кодируемых изученными генами, что позволило обосновать их кооперативное действие в единой системе защиты генома и идентифицировать *XRCC1* и *ERCC2* как ключевые интегративные узлы.

Впервые методами многофакторного регрессионного анализа установлены значимые детерминанты геномной нестабильности у работников угольных ТЭС: производственный стаж, принадлежность к производственному участку и гиперметилование промотора гена *ERCC2*.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знания в области генетической токсикологии промышленных производств относительно особенностей накопления ядерных повреждений у работников угольных теплоэлектростанций с учетом возраста, пола, производственного участка, генетического полиморфизма и эпигенетических характеристик. Полученные результаты по метилированию промоторных областей генов репарации ДНК *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5* и биотрансформации ксенобиотиков *GSTP1*, *GSTT1*, *CYP1A1* формируют представления о возможности влияния производственной среды теплоэлектростанций на эпигенетический статус изученных генов. Результаты комбинаторного анализа вносят вклад в понимание природы геномной нестабильности, демонстрируя, что синергическое взаимодействие нескольких аллельных вариантов и эпигенетических статусов оказывает более сильное влияние на геномную стабильность, чем каждый фактор в отдельности. Впервые предложена и экспериментально обоснована функциональная модель взаимодействия генов репарации и детоксикации (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*, *CYP1A1*, *GSTP1*, *GSTT1*) в ответ на продолжительное действие сложной смеси соединений, присутствующих в угольных ТЭС, что углубляет понимание фундаментальных механизмов адаптации и клеточной защиты. Выявленные протективные аллельные варианты (*ERCC5* GG) вносят вклад в развитие представлений генетической устойчивости к неблагоприятным факторам среды угольных предприятий. Полученные данные показывают, как эпигенетические изменения могут определять цитогенетический ответ на воздействие сложной смеси факторов производственной среды угольных теплоэлектростанций в связи с унаследованными вариантами генов систем репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков. Проведенное исследование вносит вклад в развитие молекулярной эпидемиологии, доказывая, что метилирование промоторных регионов генов систем репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков и наличие цитогенетических нарушений являются биомаркерами ранних, доклинических эффектов у работников угольных предприятий. Такой многоуровневый анализ может стать моделью для изучения профессиональных рисков в других промышленных отраслях.

Практическая значимость исследования состоит в потенциальной возможности использования полученных результатов для разработки способов профилактики и коррекции накопления повреждений ДНК у работников угольных производств. Полученные результаты могут быть полезны для разработки стратегий поддержания здоровья и работоспособности лиц, подвергающихся воздействию факторов производственной среды угольных предприятий. Комплексная оценка генетических вариантов и эпигенетических изменений позволяет персонализировать уязвимость к воздействию факторов производственной среды (ротация, более частый мониторинг). Разработанные многофакторные модели риска (включающие комбинации генотипов, статус метилирования и стаж работы) могут служить основой для создания персонализированных алгоритмов прогноза развития геномной нестабильности и формирования среди работников ТЭС групп риска, нуждающихся в первоочередных профилактических мероприятиях. Обнаруженная протективная комбинация генотипов позволяет не только выявлять уязвимых, но и идентифицировать работников с

потенциально более высокой устойчивостью к воздействию производственных факторов, что важно для профессионального отбора. Предложенная панель из восьми генов (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*, *GSTP1*, *GSTT1*, *CYP1A1*) для комбинированной оценки генетического и эпигенетического статуса может быть предложена для включения в программы углубленных медицинских осмотров работников угольной энергетики. Полученные данные обосновывают необходимость дифференцированного подхода к медицинскому наблюдению за работниками из разных цехов (ТТЦ, ХЦ, ЦТАИ) с наибольшей частотой выявленных нарушений.

Результаты проведенного исследования могут быть также полезны при подготовке современных биомедицинских специалистов (акты о внедрении в учебный процесс кафедры генетики и фундаментальной медицины Кемеровского государственного университета, кафедры молекулярной и клеточной биологии Кемеровского государственного медицинского университета, а также института экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук).

Методология и методы исследования

Изучены отечественные и зарубежные исследования по теме диссертации в области оценки эффектов комплексного воздействия промышленной среды на организм работников угольных предприятий. В работе были использованы данные анкетирования обследуемых доноров, принимавших участие в исследовании. Были проведены лабораторные исследования (СВМН-тест в лимфоцитах крови, выделение ДНК и анализ ее качества, бисульфитная обработка, полимеразная цепная реакция), регистрация полученных данных и статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Профессиональное действие комплекса генотоксических факторов угольных теплоэлектростанций обуславливает достоверное повышение частоты микроядер, нуклеоплазменных мостов, протрузий, апоптоза и снижение пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови. Выраженность цитогенетических нарушений прямо зависит от стажа работы (максимальна при стаже более 20 лет) и производственного участка – наибольшие значения зарегистрированы у работников топливно-транспортного, химического цехов и цеха тепловой автоматики и измерений.

2. Индивидуальная чувствительность к геномным повреждениям у работников угольных ТЭС имеет генетическую составляющую. Полиморфные варианты *XRCC1 rs25489*, *XRCC2 rs3218536*, *CYP1A1 rs4646903* и делеция *GSTT1* ассоциированы с повышенной частотой цитогенетических нарушений, тогда как дикий тип *ERCC5 rs17655* ассоциирован с протективным эффектом. Синергические межлокусные взаимодействия усиливают риск: максимальная частота нарушений зарегистрирована при сочетанном носительстве рискованных аллелей *ERCC2*, *XRCC1*, *CYP1A1* и делеции *GSTT1*; комбинация *XRCC2 GG* × *GSTT1(+)* ассоциирована со статистически значимым протективным эффектом в отношении цитогенетических нарушений.

3. Производственная среда угольных ТЭС ассоциирована с формированием специфического профиля гиперметилирования промоторных регионов генов репарации ДНК (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*) и биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1*, *GSTP1*, *GSTT1*), степень выраженности которого нарастает при стаже более 20 лет и достигает максимума у работников топливно-транспортного, ремонтного и химического цехов. Гиперметилирование промотора *ERCC2* является значимым независимым предиктором частоты цитогенетических нарушений в многофакторной модели ($p < 0,001$) и представляет собой ранний эпигенетический биомаркер профессионального генотоксического воздействия. Выявленные ассоциации генотипов

XRCC1 rs25489 и *ERCC5 rs17655* со статусом метилирования соответствующих промоторов указывают на генотип-зависимый характер эпигенетических изменений при профессиональной экспозиции.

4. Многоуровневый анализ геномной нестабильности у работников угольных ТЭС позволил установить иерархическую модель её детерминации: ведущий вклад вносят производственные факторы (стаж, производственный участок) и эпигенетические изменения (гиперметилирование *ERCC2*), тогда как прямой независимый вклад генетического полиморфизма в многофакторной модели статистически не значим. Функциональная сеть белок-белковых взаимодействий продуктов изученных генов характеризуется высокой интеграцией путей репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков с ключевой координационной ролью *ERCC2* и *XRCC1* как топологических хабов, что объясняет эпигенетическую уязвимость этих локусов при профессиональной экспозиции.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на Ежегодной конференции молодых ученых ФИЦ УУХ СО РАН «РАЗВИТИЕ» (Кемерово, 2023, 2024, 2025, 2026), Инновационном конвенте «КУЗБАСС: ОБРАЗОВАНИЕ, НАУКА, ИННОВАЦИИ» (Кемерово, 2022, 2024, 2025), Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием (Кемерово, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026), Международном конгрессе «Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровье сберегающих технологий» (Кемерово, 2022, 2023, 2024, 2025), Всероссийской конференции с международным участием «Информационная школа молодого учёного» (Екатеринбург, 2023, 2024), IV Национальном конгрессе с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды «Сысинские чтения-2024 (Москва, 2024), XI Съезде Российского общества медицинских генетиков с международным участием (Санкт-Петербург, 2025).

Личный вклад автора в проведенные исследования

Все этапы подготовки диссертационной работы выполнены лично автором. Автором проведён анализ отечественной и зарубежной литературы, обозначены цели и задачи исследования. Автор самостоятельно проводил 90 % молекулярно-генетических и цитогенетических исследований. Автор лично подготавливал публикации по теме диссертации, осуществлял анализ анкетных данных, статистическую обработку результатов с последующей интерпретацией и формулированием выводов, а также написал и оформил данную рукопись.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 2 статьи в журналах, индексируемых в базах Web of Science или Scopus, 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные выводы и положения диссертационной работы соответствуют специальности 1.5.7. – Генетика (п. 5. Мутационная изменчивость. Радиационный и химический мутагенез. Геномные и хромосомные перестройки. Модификационная изменчивость; п. 8. Эпигенетика: эпигеном; п. 20 – Популяционная генетика. Генетическая структура популяций).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 254 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и

обсуждения, заключение, выводы, список условных обозначений и сокращений, список литературы, приложения. Список литературы состоит из 429 источников, из которых 33 отечественных и 396 зарубежных. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 32 рисунками и дополнена приложениями.

Благодарности

Коллективу института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, сотрудникам ТЭС и донорам биоматериала, добровольно принимавшим участие в исследовании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН (г. Кемерово). Участие людей в исследовании базировалось на принципах добровольности и информированности о целях, методах и результатах работы. Все участники подписывали бланк добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Было проведено исследование по типу «случай – контроль». Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

В основную группу включены 445 действующих работников угольных ТЭС г. Кемерово (мужчины – 347, женщины – 98; средний возраст $51,6 \pm 0,4$ года; средний стаж $21,8 \pm 0,5$ года). Распределение по цехам: топливно-транспортный (ТТЦ, $n=201$), цех тепловой автоматики и измерений (ЦТАИ, $n=73$), электрический (ЭЦ, $n=65$), административно-управленческий персонал (АУП, $n=38$), химический (ХЦ, $n=36$), ремонтно-строительный (ПУОРОСО, $n=32$). Курящих – 167 человек. У 118 работников имелись хронические неинфекционные заболевания (преимущественно сердечно-сосудистые, пищеварительной и костно-мышечной систем). Группа сравнения – 491 житель г. Кемерово, регулярный донор крови без промышленного стажа (мужчины – 352, женщины – 139; средний возраст $47,7 \pm 0,5$ года; курящих – 163).

Материалом исследования послужила цельная периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях с использованием разовых вакуумных систем (пробирки «Вакутейнер»). Для постановки клеточных культур кровь распределялась в пробирку с Na-гепарином, а для выделения образцов геномной ДНК в пробирку с K2-ЭДТА. Образцы крови транспортировали в лабораторию цитогенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН в термokonтейнере ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Цитогенетический анализ включал использование микроядерного теста с блокировкой цитокинеза в лимфоцитах периферической крови для оценки уровня геномных повреждений по стандартному протоколу (Fenech, 2007). Для каждого индивида анализировали минимум 1000 двуядерных лимфоцитов, регистрируя клетки с микроядрами, нуклеоплазменными мостами и протрузиями; дополнительно на 500 клетках оценивали распределение по ядерности, клетки на стадии митоза и апоптоза.

Геномную ДНК экстрагировали из цельной крови фенол-хлороформным методом (Sambrook and Russell, 2006). Полиморфные варианты *XRCC1 rs25489*, *ERCC2 rs13181*, *ERCC5 rs17655* определяли методом аллель-специфической ПЦР с электрофоретической детекцией (тест-системы «НПФ Литех», Москва); *XRCC2 rs3218536*, *XRCC3 rs861539*, *GSTP1 rs1138272*, *CYP1A1 rs4646903* – ПЦР в реальном времени с конкурирующими TaqMan-зондами («Синтол», Москва; «СибДНК», Новосибирск). Делецию *GSTT1* выявляли мультиплексной ПЦР в реальном времени с SYBR Green и анализом кривых плавления («СибДНК»). Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью онлайн-калькулятора (<https://www.had2know.org/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>); сравнение с мировыми популяциями проводили по базам gnomAD (<http://gnomad-sg.org>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) и GDBPOP (<https://gdbpop.nir.cspfmiba.ru>).

Дизайн праймеров и характеристика промоторов. Для каждого гена конструировали метил-специфическую (М) и метил-неспецифическую (U) пары праймеров, комплементарные бисульфит-конвертированной ДНК, с использованием программ MethPrimer (<https://methprimer.com>) и SnapGene v.3.2.1; специфичность подтверждали в BLAST (GRCh38/hg38, NCBI). Промоторные регионы верифицированы по базе EPDnew; амплифицируемые CpG-сайты локализованы в пределах классических CpG-островков, картированных с помощью UCSC Genome Browser (GRCh38, cpgIslandExt). Характеристики островков: для *XRCC1* – длина 323 п.н., 38 CG, GC 69%, Obs/Exp 0,99; для *ERCC2* – 694 п.н., 66 CG, GC 68,6%, Obs/Exp 0,82; для *GSTP1* – 1025 п.н., 96 CG, GC 70,7%, Obs/Exp 0,75; для *CYP1A1* – 1150 п.н., 103 CG, GC 68%, Obs/Exp 0,78; для *GSTT1* классический островок отсутствует. Все островки перекрывают старт транскрипции и распространяются вглубь генов, что подтверждает их функциональную значимость.

Бисульфитная конверсия. Аликвоты ДНК (350 нг) лизировали с протеиназой К и РНКазой, денатурировали 3 М NaOH, дезаминировали насыщенным Na₂S₂O₅ (pH 5,0) в присутствии гидрохинона (55 °C, 4-16 ч). После десульфенирования и нейтрализации ацетатом аммония ДНК осаждали этанолом, промывали 70% этанолом и растворяли в воде.

Метил-специфическая ПЦР. Метил-специфическую ПЦР проводили в двух параллельных реакциях (М и U) объемом 25 мкл, содержащих 5 мкл обработанной ДНК. Программа: 94 °C – 6 мин, затем 35 циклов (94 °C – 45 с, 55-65 °C – 45 с, 72 °C – 11 мин). Продукты разделяли в 3 % агарозном геле с бромистым этидием. Статус метилирования определяли визуально: гиперметилованный (только полоса М), частично метилилованный (обе полосы), деметилилованный (только полоса U). Отрицательными контролями служили не подвергнутая обработке ДНК (для М) и вода (для U); положительным – заведомо метилилованная обработанная ДНК.

Валидация метода. Достоверность полуколичественного подхода подтверждена двумя независимыми способами.

Полногеномное бисульфитное секвенирование (WGBS). Пять случайных образцов ДНК работников секвенировали на платформе NovaSeq 6000 (Illumina) с глубиной $\geq 30\times$ после приготовления библиотек набором EpiArt DNA Methylation Library Kit for Illumina V3 (Vazyme) в лаборатории Центра генетики и репродуктивной медицины «Генетико» (Москва, Россия). Чтения картировали на GRCh38 программой Bismark v.0.22.3. Уровень метилирования каждого CG-сайта оценивали β -значением, после чего вычисляли среднее по промотору и классифицировали: $<20\%$ – деметилилованный, $20-70\%$ – частично метилилованный, $>70\%$ – гиперметилованный. Совпадение с категориями метил-специфической ПЦР составило 90% (95% ДИ 81,3-100%).

Количественная метил-специфическая ПЦР в реальном времени (qMSP) с TaqMan MGB-зондами. На 45 образцах, равномерно представляющих все статусы, провели ПЦР в реальном времени (CFX96 C1000 Touch, BioRad) с теми же М/У праймерами. Специфичность подтверждали по кривым плавления (единственный пик при ожидаемой T_m). Процент метилирования рассчитывали по методу сравнительного Ct с коррекцией на эффективность амплификации: $\%M = 2^{(CtM)} / (2^{(CtM)} + 2^{(CtU)}) \times 100$. Из 320 сравнений (40 образцов $\times$ 8 генов) совпадение с полуколичественной ПЦР достигло 92,8% (ДИ 92,8-95,5%). Расхождения приходились на пограничные значения (15-25% или 65-75%). Наилучшую точность показали *ERCC2*, *GSTP1*, *XRCC1* и *XRCC2* (OPA $\geq 95,6\%$). Таким образом, использованный протокол обладает высокой аналитической точностью.

Статистический анализ выполнен в StatSoft STATISTICA 13.0 и MedCalc. Для количественных показателей с распределением, отличным от нормального, применяли U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса, корреляции Спирмена.

Оптимальные пороговые значения цитогенетических параметров определяли ROC-анализом. Ассоциации генотипов и статусов метилирования с бинарными цитогенетическими исходами оценивали логистической регрессией с поправкой на возраст, пол, стаж и курение; для множественных сравнений вводили поправку Бенджамини-Хохберга (Benjamini and Yekutieli, 2001). Комплексный вклад факторов исследовали с помощью порядковой регрессии и общей линейной модели (GLM). Апостериорная мощность для ключевых тестов составила $>0,9$ (G*Power). Системно-биологический анализ проводили в STRING v.12.0 (<https://string-db.org>) с визуализацией в Cytoscape v.3.10.4; функциональное обогащение – по KEGG (<https://www.kegg.jp>), Reactome (<https://reactome.org>) и Gene Ontology.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Общая характеристика цитогенетических и пролиферативных показателей в изученных группах

У работников угольных ТЭС по сравнению с группой сравнения выявлено статистически значимое ($p < 0,000001$) повышение частоты двуядерных лимфоцитов с микроядрами (23% против 6%), нуклеоплазменными мостами (14% против 3%) и протрузиями (22% против 3%). Одновременно у рабочих наблюдалось увеличение доли клеток в апоптозе (1,0% против 0,6%) и снижение митотической активности (1,0% против 2,7%) (рис. 1). Индексы репликации и пролиферации также демонстрировали тенденцию к снижению ($p < 0,05$).

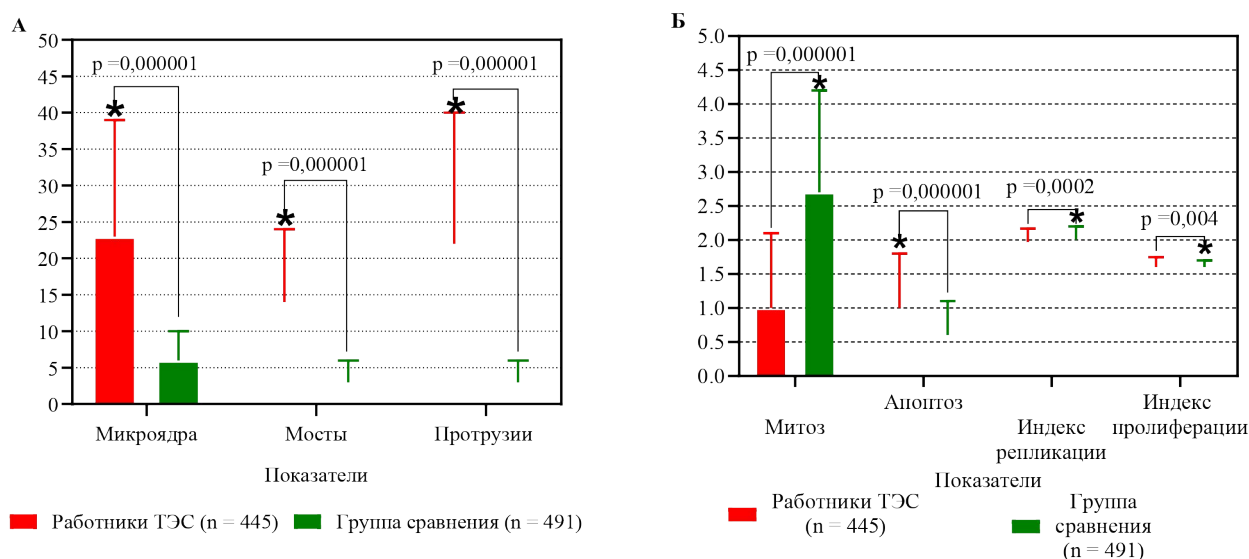


Рисунок 1. Цитогенетические параметры (А) и показатели пролиферативной активности клеток (Б) в изученных группах. Здесь и далее представлена медиана и стандартное отклонение

Установлена прямая связь между стажем работы на ТЭС и частотой лимфоцитов с микроядрами ($p < 0,000001$, $r^2 = 0,0437$) и нуклеоплазменными мостами ($p = 0,0014$, $r^2 = 0,0114$). При стаже более 20 лет уровень цитогенетических повреждений был значительно выше, чем при меньшем стаже (рис. 2).

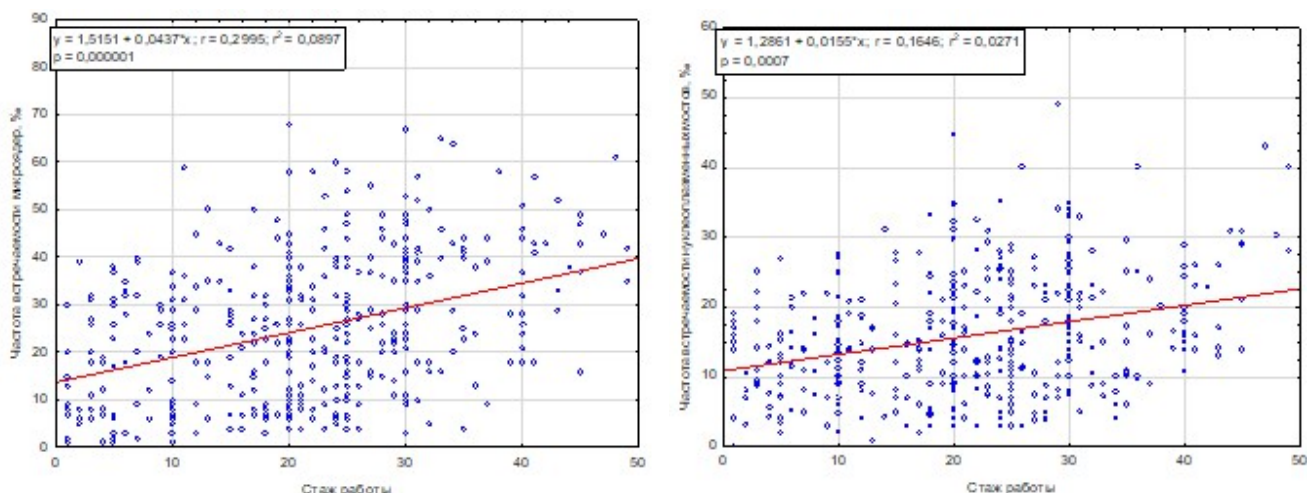


Рисунок 2. Частота встречаемости двуядерных лимфоцитов с микроядрами и нуклеоплазмными мостами у работников угольных теплоэлектростанций с разным стажем работы: на оси X – стаж работы, на оси Y – частота встречаемости двуядерных лимфоцитов с микроядрами

Максимальные частоты нарушений регистрировались у сотрудников (рис. 3) топливно-транспортного (ТТЦ), химического (ХЦ) цехов и цеха тепловой автоматики и измерений (ЦТАИ). В ТТЦ наблюдалось наибольшее количество клеток с микроядрами (26%, $p < 0,00001$) при прямой зависимости от стажа; в ЦТАИ – повышены микроядра и частота делящихся клеток (26% и 1,2% соответственно); в ХЦ – увеличена частота протрузий (25%, $p = 0,03$). Даже у административно-управленческого персонала (АУП), имеющего наименьший контакт с вредными факторами, все цитогенетические показатели оставались достоверно выше, чем в контроле (микроядра 15% vs 6%, мосты 12% vs 3%, протрузии 15% vs 3%, $p < 0,000001$).

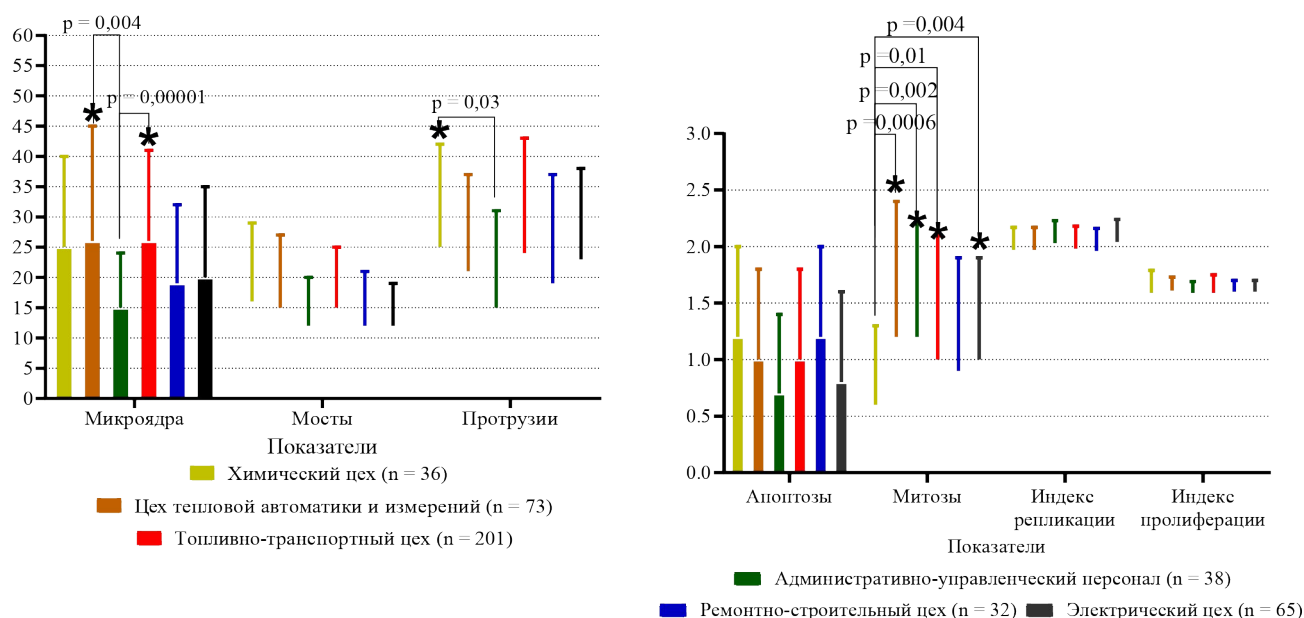


Рисунок 3. Показатели микроядерного теста у работников угольных теплоэлектростанций в зависимости от места работы на конкретном производственном участке: на оси X – параметры теста, на оси Y – частота встречаемости цитогенетических нарушений

Гендерных различий в частоте микроядер, мостов и протрузий не выявлено; у мужчин-рабочих чаще регистрировались клетки в апоптозе (1,0% vs 0,8% у женщин, $p = 0,04$). Возраст положительно коррелировал с частотой микроядер и мостов у рабочих,

но не в контроле. Статус курения и количество выкуриваемых сигарет в день (в среднем $18 \pm 0,6$) не влияли ни на один из показателей ни в одной из групп. Наличие хронических заболеваний (сердечно-сосудистых, эндокринных, респираторных, пищеварительной, мочеполовой и костно-мышечной систем) в группе работников также не приводило к дополнительному росту цитогенетических нарушений ($p > 0,05$), что может объясняться небольшим размером нозологических подгрупп.

С помощью ROC-анализа установлены дискриминационные пороги: микроядра $\geq 13\%$ ($AUC=0,856$, чувствительность/специфичность отличные), нуклеоплазменные мосты $\geq 7\%$ ($AUC=0,922$), протрузии $\geq 8\%$ ($AUC=0,962$), апоптоз $\geq 1,1\%$ ($AUC=0,659$), делящиеся лимфоциты $\leq 1,8\%$ ($AUC=0,787$). Эти значения позволяют надёжно выделять группы с высокой генотоксической нагрузкой.

Полученные данные согласуются с результатами немногочисленных исследований, выполненных на работниках угольных ТЭС и смежных производств. Так, Celik с соавторами (2007) зафиксировали у 48 мужчин турецкой ТЭС повышение частоты хромосомных aberrаций и микроядер с нарастанием стажа. Donbak et al. (2005) показали увеличение генотоксических маркеров у шахтёров; аналогичные результаты получены в бразильских (Espitia-Pérez et al., 2016) и колумбийских (Espitia-Pérez et al., 2018) когортах. Отечественные исследования на шахтёрах Кузбасса (Sinitsky et al., 2016) также демонстрируют рост цитогенетических повреждений в зависимости от стажа. Повышение частоты микроядер, мостов и протрузий в нашем исследовании, выполненном на репрезентативной выборке ($n=936$), полностью вписывается в эту закономерность, причём наиболее выраженные изменения обнаружены в цехах с максимальным пылевым и химическим воздействием (ТТЦ, ХЦ, ЦТАИ). Отсутствие значимого влияния курения (Bonassi et al., 2003; Ulker et al., 2006) и хронических заболеваний на цитогенетические показатели может быть обусловлено отсутствием «заядлых» курильщиков и умеренным характером сопутствующей патологии, что не противоречит литературным данным (Bonassi et al., 2003).

2. Статус метилирования промоторных областей ключевых генов систем репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков у работников угольных теплоэлектростанций и в группе сравнения

У работников ТЭС по сравнению с неработающими жителями Кузбасса обнаружено значительное перераспределение статуса метилирования промоторов всех восьми генов (рис. 4, $p < 0,000001$). Доля гиперметилированных образцов среди рабочих была в 2-5 раз выше: для *GSTP1* – 29,2% vs 5,8%, для *GSTT1* – 30,1% vs 6,5%, для *ERCC5* – 30,3% vs 11,0%, для *ERCC2* – 28,5% vs 19,1%. В группе сравнения преобладал деметилированный статус (69-83% в зависимости от гена), тогда как у рабочих распределение было более равномерным. Интегральный индекс метилирования (GMI) у рабочих более чем вдвое превышал контрольный: 60,3% обследованных имели высокие значения GMI против 14,4% в контроле.

Стаж работы более 20 лет ассоциировался с повышенной частотой гиперметилирования промоторов *ERCC2*, *XRCC1* и *XRCC3* ($p < 0,02$). Наиболее выраженное гиперметилирование регистрировалось у работников ТТЦ, ЦТАИ, ПУОРОСО и ХЦ, особенно для генов *ERCC2*, *ERCC5* и *GSTT1* ($p < 0,005$). При этом пол, возраст, статус курения и сопутствующие хронические заболевания значимого влияния на профиль метилирования не оказывали ($p > 0,05$).

Методом логистической регрессии с поправкой на ковариаты установлено (табл. 1), что гиперметилирование промотора *ERCC2* повышает риск обнаружения клеток с микроядрами (ОШ=2,734; 95% ДИ 2,128-3,543), нуклеоплазменными мостами (ОШ=2,135; 1,473-3,103) и протрузиями (ОШ=1,529; 1,227-1,888). Гиперметилирование *XRCC2*

ассоциировалось с увеличением частоты мостов (ОШ=1,738; 1,292-2,326) и протрузий (ОШ=1,563; 1,169-2,104). Напротив, статус метилирования промоторов генов детоксикации (*GSTP1*, *GSTT1*, *CYP1A1*) не продемонстрировал независимых связей с цитогенетическими показателями после учёта производственных и генетических факторов.

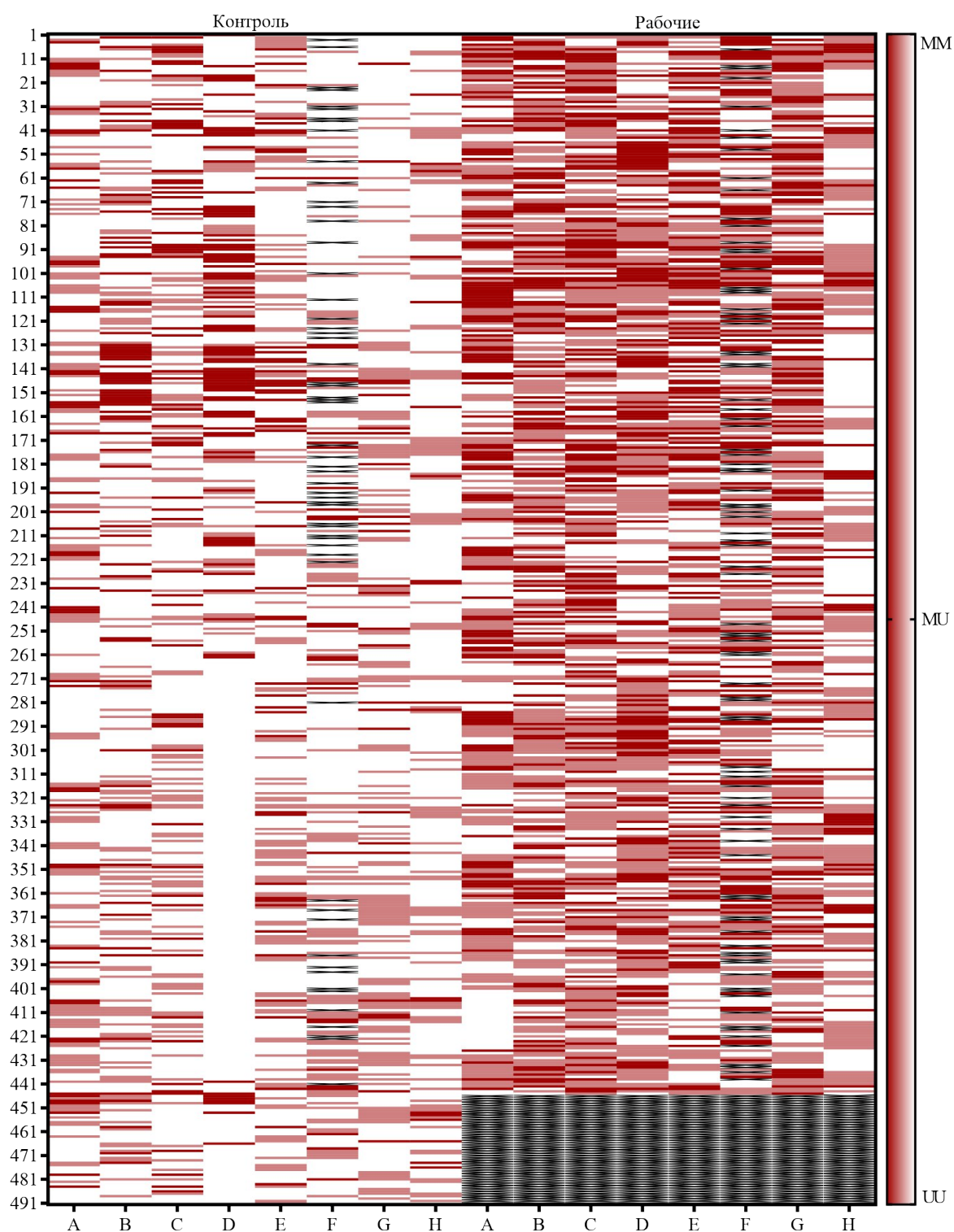


Рисунок 4. Индивидуальные профили метилирования промоторов изученных генов в обеих группах: по оси X – гены (A – *XRCC1*, B – *XRCC2*, C – *XRCC3*, D – *ERCC2*, E – *ERCC5*, F – *GSTT1*, G – *GSTP1*, H – *CYP1A1*); по оси Y – каждая строчка соответствует каждому обследуемому донору. Цветовая шкала определяет статус метилирования промотора: MM – гиперметилованный, MU – частично метилированный, U – деметилированный; черным обозначено: в столбце F – делеция гена *GSTT1*, в конце

выборки рабочих – отсутствие данных, поскольку число обследованных доноров в обеих группах не одинаково (491 и 445).

Таблица 1. Ассоциация статуса метилирования промоторов изученных генов с цитогенетическими повреждениями и пролиферативными параметрами в группе работников ТЭС

Ген	Статус	b ± SE	ОШ	95 % ДИ	p	Исход
<i>ERCC2</i>	MM	1,01 ± 0,13	2,734	2,128-3,543	0,00001	Повышение частоты клеток с микроядрами
<i>ERCC2</i>	MM	0,76 ± 0,19	2,135	1,473-3,103	0,00152	Повышение частоты клеток с мостами
<i>ERCC2</i>	MM	0,42 ± 0,11	1,529	1,227-1,888	0,00051	Повышение частоты клеток с протрузиями
<i>XRCC2</i>	MM	0,55 ± 0,15	1,738	1,292-2,326	0,00051	Повышение частоты клеток с мостами
<i>XRCC2</i>	MM	0,45 ± 0,15	1,563	1,169-2,104	0,01536	Повышение частоты клеток с протрузиями

Эпигенетические эффекты производственной среды угольных предприятий изучены значительно хуже цитогенетических. Известно, что у шахтёров и работников коксохимических производств изменяется глобальное метилирование ДНК (de Souza et al., 2019; Zhang et al., 2023), а также метилирование отдельных генов-супрессоров опухолей (Wang et al., 2015). Нами впервые показано, что факторы угольных ТЭС вызывают согласованное гиперметилирование промоторов целого ряда генов репарации и детоксикации. Полученные результаты согласуются с данными о гиперметилировании *ERCC2* и других генов эксцизионной репарации нуклеотидов при воздействии бензола и ПАУ (Bollati et al., 2007; Duan et al., 2013; Yang et al., 2018). Обнаруженная нами связь гиперметилирования *ERCC2* и *XRCC2* с накоплением хромосомных повреждений подтверждает гипотезу о том, что эпигенетический сайленсинг этих генов снижает эффективность репарации и способствует фиксации мутаций (Cheng et al., 2009; Liu et al., 2023). Тот факт, что метилирование нарастает со стажем и зависит от цеха, но не от возраста и курения, указывает на доминирующую роль профессиональной экспозиции в формировании наблюдаемого эпигенетического профиля.

3. Анализ аллельных вариантов генов ферментов репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков в исследуемых группах

Распределение генотипов всех изученных локусов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга как в группе работников, так и в контроле. Единственное статистически значимое различие между выборками касалось *XRCC3 rs861539*: частота аллеля Т (Met) составила 34,8% у рабочих против 23,6% в контроле (p=0,00001), а генотип ТТ встречался в 13% против 6%. Однако это различие, вероятнее всего, связано с тем, что контрольная группа по данному локусу отличалась от среднероссийской популяции (p<0,00001), тогда как частоты у работников ТЭС соответствовали европейским и российским данным (<http://gnomad-sg.org>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, <https://gdbpop.nir.cspfmiba.ru>). Частоты аллелей остальных генов в общей кузбасской выборке были схожи с европеоидной популяцией: минорный аллель А *XRCC1 rs25489* – 7,6%, А *XRCC2 rs3218536* – 6,0%, G *ERCC2 rs13181* – 31,9%, С *ERCC5 rs17655* – 22,1%, Т *GSTP1 rs1138272* – 10,7%, делеция *GSTT1* – 18,7%, С *CYP1A1 rs4646903* – 6,0%.

В группе работников ТЭС с помощью логистической регрессии, скорректированной на возраст, пол, стаж и курение, выявлен ряд достоверных ассоциаций (табл. 2):

носительство генотипа GA *XRCC1 rs25489* ассоциировалось с повышением частоты протрузий (ОШ=2,096; 95% ДИ 1,792-2,452; p=0,000001), гомозиготы AA – мостов (ОШ=1,477; 1,238-1,762; p=0,000001); гетерозиготы *XRCC2 rs3218536* GA демонстрировали повышение частоты микроядер (ОШ=1,311; 1,120-1,532; p=0,0026); минорный аллель C *CYP1A1 rs4646903* был связан с увеличением как мостов (ОШ=1,477; 1,238-1,762; p=0,000001), так и протрузий (ОШ=2,000; 1,704-2,332; p=0,000001); делеция *GSTT1* (генотип del) повышала риск протрузий (ОШ=1,930; 1,654-2,263; p=0,000001); напротив, генотип GG *ERCC5 rs17655* демонстрировал протективный эффект, проявляясь в снижении частоты нуклеоплазменных мостов (ОШ=0,675; 0,546-0,840; p=0,0012).

Обнаружена связь полиморфных вариантов с метилированием собственных промоторов (табл. 3): носители аллеля A *XRCC1 rs25489* имели повышенную вероятность гиперметилирования промотора *XRCC1* (ОШ=1,976; 1,283-3,038; p=0,0018), а носители аллеля C *ERCC5 rs17655* – гиперметилирования промотора *ERCC5* (ОШ=1,761; 1,127-2,775; p=0,0256).

Таблица 2. Ассоциация генетических вариантов генов репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков с цитогенетическими повреждениями у работников ТЭС

SNP	Генотип	b ± SE	ОШ	95 % ДИ	p	Исход
<i>XRCC1 rs25489</i>	AA	0,39 ± 0,09	1,477	1,238-1,762	0,000004	Повышение частоты клеток с мостами
<i>XRCC1 rs25489</i>	GA	0,74 ± 0,08	2,096	1,792-2,452	0,000001	Повышение частоты клеток с протрузиями
<i>XRCC2 rs3218536</i>	GA	0,27 ± 0,08	1,311	1,120-1,532	0,00258	Повышение частоты клеток с микроядрами
<i>ERCC5 rs17655</i>	GG	-0,39 ± 0,11	0,675	0,546-0,840	0,0012	Понижение частоты клеток с мостами
<i>GSTT1 +/-</i>	del	0,66 ± 0,08	1,930	1,654-2,263	0,000001	Повышение частоты клеток с протрузиями
<i>CYP1A1 rs4646903</i>	CC	0,39 ± 0,09	1,477	1,238-1,762	0,000003	Повышение частоты клеток с мостами
<i>CYP1A1 rs4646903</i>	CC	0,69 ± 0,08	2,000	1,704-2,332	0,000001	Повышение частоты клеток с протрузиями

Таблица 3. Ассоциация генетических вариантов изученных генов с гиперметилированием промоторов у работников ТЭС

SNP	Сравнение	b ± SE	ОШ	95 % ДИ	p	Исход
<i>XRCC1 rs25489</i>	GA+AA vs GG	0,68 ± 0,22	1,976	1,283-3,038	0,0018	Гиперметилирование <i>XRCC1</i>

<i>ERCC5</i> <i>rs17655</i>	GC+CC vs GG	0,57 ± 0,23	1,761	1,127-2,775	0,0256	Гипермети́лирование <i>ERCC5</i>
--------------------------------	-------------	-------------	-------	-------------	--------	----------------------------------

Вклад изученных генетических вариантов в формирование цитогенетических повреждений у работников угольных производств подтверждается рядом независимых исследований. Cheng et al. (2005, 2009) показали, что вариант *XRCC1 rs25489* ассоциирован с накоплением повреждений ДНК у коксохимиков; аналогичные данные получены Leng et al. (2004) и Zhang et al. (2017). Ассоциация *XRCC2 rs3218536* с микроядрами ранее была описана для работников, экспонированных к винилхлориду (Qiu et al., 2012), а роль *CYP1A1* и делеции *GSTT1* продемонстрирована в когортах шахтеров (Espitia-Pérez, 2016). Протективный эффект *ERCC5* GG, выявленный в настоящей работе, согласуется с данными о том, что высокофункциональные варианты генов эксцизионной репарации могут обеспечивать более эффективное удаление объёмных аддуктов, предотвращая образование двунитевых разрывов (Zuo et al., 2022). Обнаруженная ассоциация *XRCC1* и *ERCC5* с гипермети́лированием собственных промоторов является принципиально новым наблюдением. Она указывает на существование локус-ассоциированных с метилированием количественных признаков (mQTL), когда нуклеотидная замена в CpG-динуклеотиде или сайте связывания транскрипционного фактора (например, CTCF) меняет локальный эпигенетический ландшафт (Bell et al., 2011; Smith et al., 2014; Schulz et al., 2017). Это создаёт петлю положительной обратной связи: генетически обусловленное метилирование ещё сильнее подавляет экспрессию защитного гена, усугубляя генотоксический эффект.

4. Поиск ассоциаций цитогенетических нарушений и изученных эпигенетических характеристик с аллельными вариантами генов, контролирующих системы репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков у работников угольных теплоэлектростанций

Многофакторный регрессионный анализ показал, что сочетанное носительство неблагоприятных аллелей нескольких генов значительно усиливает риск цитогенетических нарушений (табл. 4). Самая сильная ассоциация – повышение частоты микроядер и протрузий – наблюдалась для комбинации пяти рисковых генотипов: *ERCC2* TG+GG × *XRCC1* GA+AA × *CYP1A1* TC+CC × *XRCC2* GA × *GSTT1* del (ОШ=1,783 и 2,062 соответственно, $p<0,000001$). Высокий риск повышения частоты встречаемости клеток с микроядрами также ассоциирован с комбинацией *ERCC2 rs13181* (TG+GG) × *XRCC1 rs25489* (GA+AA) (ОШ =1,733, 95 % ДИ: 1,397-2,150). Повышенная частота встречаемости клеток с протрузиями была ассоциирована с доминантными моделями *XRCC1 rs25489* GA+AA × *CYP1A1 rs4646903* CC+TC, а также гипермети́лированным статусом промотора гена *ERCC2* (ОШ =1,789, 95 % ДИ: 1,412-2,260). Добавление в модель гипермети́лирования промотора *XRCC2* дополнительно увеличивало риск нуклеоплазменных мостов (ОШ=1,768; $p=0,000001$). В то же время идентифицирована протективная комбинация: *XRCC2* GG × *GSTT1*(+) (отсутствие делеции), которая ассоциировалась со снижением частоты протрузий (ОШ=0,506; $p=0,000001$).

Таблица 4. Результаты порядковой регрессии для оценки влияния комбинаций полиморфных вариантов генов репарации и биотрансформации ксенобиотиков и статусов метилирования их промоторов на показатели микроядерного теста у работников угольных ТЭС

Комбинация	b±SE	ОШ	95 % ДИ	p	Исход
1. <i>ERCC2 rs13181</i> TG+GG	0,58±0,08	1,783	1,527-	0,000001	Повышение частоты

Комбинация	b±SE	ОШ	95 % ДИ	p	Исход
x <i>XRCC1 rs25489</i> GA+AA x <i>CYP1A1 rs4646903</i> TC+CC x <i>XRCC2</i> <i>rs3218536</i> GA x <i>GSTT1 del</i>	0,72 ± 0,13	2,062	1,531- 2,591	0,000001	клеток с микроядрами Повышение частоты клеток с протрузиями
2. <i>ERCC2 rs13181</i> TG+GG x <i>XRCC1 rs25489</i> GA+AA	0,55±0,11	1,733	1,397- 2,150	0,000001	Повышение частоты клеток с микроядрами
3. <i>XRCC2 rs3218536</i> GG x <i>GSTT1 (+)</i>	-0,68±0,09	0,506	0,425- 0,604	0,000001	Понижение частоты клеток с протрузиями
4. <i>XRCC1 rs25489</i> GA+AA x <i>CYP1A1 rs4646903</i> CC+TC x <i>XRCC2 MM</i> x <i>ERCC2 MM</i>	0,58±0,12	1,789	1,412- 2,260	0,000001	Повышение частоты клеток с мостами
5. <i>XRCC1 rs25489</i> GA+AA x <i>CYP1A1 rs4646903</i> TC+CC x <i>ERCC2 MM</i>	0,57±0,16	1,768	1,292- 2,420	0,003	Повышение частоты клеток с протрузиями

Примечание: MM – гиперметилированный статус промотора. Полужирным шрифтом выделены протективные ассоциации.

Для системной интерпретации этих результатов была построена сеть белок-белковых взаимодействий (рис. 5, табл. 5). Сеть из 7 узлов (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*, *GSTP1*, *CYP1A1*) включила 16 значимых функциональных ассоциаций при 1 случайно ожидаемой ($p=2,2 \times 10^{-7}$). Средняя степень узла составила 4,57, коэффициент кластеризации – 0,852. Кластерный анализ (k-средних) выделил три функциональных модуля: (1) эксцизионная репарация нуклеотидов (*XRCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*; оценка связи *ERCC2-ERCC5* = 0,898); (2) гомологичная рекомбинация (*XRCC2*, *XRCC3*; оценка 0,984); (3) метаболизм ксенобиотиков (*CYP1A1*, *GSTP1*; оценка 0,489). Ключевым интегратором выступил *XRCC1*, связывающий оба репарационных модуля. Анализ обогащения (KEGG, Reactome, GO) подтвердил, что все гены сети вовлечены в процессы «эксцизионная репарация нуклеотидов» (hsa03420, $p=0,028$), «гомологичная рекомбинация» (hsa03440, $p=0,028$), «метаболизм ксенобиотиков цитохромом P450» (hsa00980, $p=0,030$), а также «химический канцерогенез» (hsa05204, $p=0,030$) и «репарация двунитевых разрывов» (GO:0000724, $p=0,00044$).

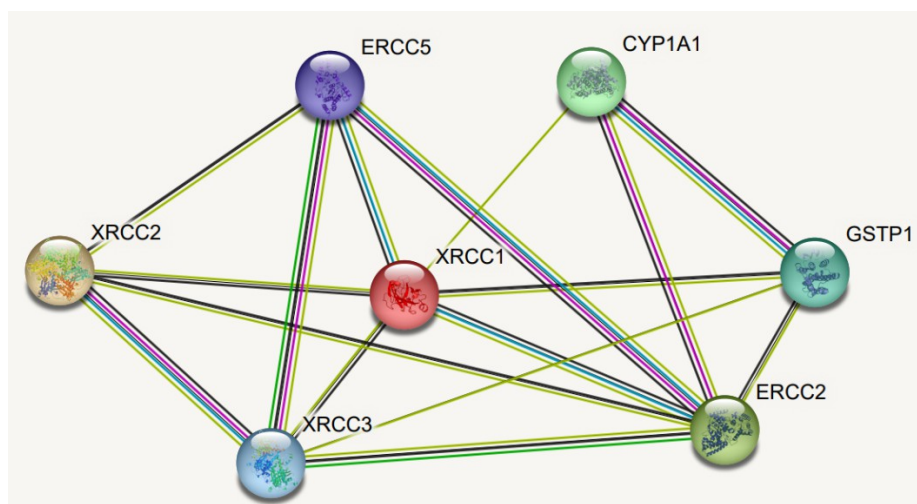


Рисунок 5 – Сеть транскрипционных факторов: Сетевые узлы представляют собой белки с известной или предсказанной трехмерной структурой, продуцируемые конкретным включенным в анализ геном. Линиями отмечены белок-белковые ассоциации, характеристика которых выделена цветом: черный (схожий паттерн экспрессии), зеленый (связанные генетические элементы), синий (сочетание), голубой (из баз данных), сиреневый (определены экспериментально), желтый (анализ литературы)

Таблица 5. Характеристика взаимодействий в сети

Белки	Оценка взаимодействия	Тип связи
<i>XRCC2-XRCC3</i>	0,999	Физический (комплекс)
<i>ERCC2-ERCC5</i>	0,782	Функциональная (ко-экспрессия)
<i>XRCC1-ERCC2</i>	0,875	Физический (комплекс), функциональная (ко-экспрессия)
<i>XRCC1-XRCC2</i>	0,671	Функциональная (ко-экспрессия)
<i>XRCC3-ERCC5</i>	0,645	Функциональная (ко-экспрессия)
<i>CYP1A1-GSTP1</i>	0,489	Установлена по публикациям
<i>GSTP1-GSTT1</i>	-	Структурный гомолог

Комбинаторный анализ демонстрирует синергизм неблагоприятных вариантов генов разных защитных путей: ослабление детоксикации (*CYP1A1*, *GSTT1*) и одновременное снижение эффективности эксцизионной (*ERCC2*) и гомологичной репарации (*XRCC1*, *XRCC2*) резко повышают чувствительность к производственным мутагенам. Подобное взаимодействие ранее было описано для генов *hOGG1*, *ADPRT* и *XRCC4* у шахтёров (Sinitsky et al., 2017) и для комбинаций *EPHX1-ERCC2-XRCC1* у коксохимиков (Qiu et al., 2007). Выявленная нами протективная комбинация подчёркивает важную роль сохранной детоксикации и гомологичной рекомбинации в обеспечении устойчивости генома. Построенная функциональная сеть впервые наглядно демонстрирует, что продукты исследованных генов образуют единый скоординированный модуль защиты от генотоксического стресса, в котором нарушение любого звена может

быть частично компенсировано, но множественные дефекты приводят к критическому накоплению повреждений (Zhovmer et al., 2010; Schärer et al., 2013; Liu et al., 2023).

5. Выявление ассоциаций совокупности генетических и средовых факторов с цитогенетическими и эпигенетическими характеристиками работников угольных теплоэлектростанций

Для анализа связи множества изученных факторов (пол, стаж работы, статус курения, возраст, рабочий цех, полиморфные варианты *CYP1A1 rs4646903*, *GSTP1 rs1138272*, *GSTT1(del)*, *XRCC1 rs25489*, *XRCC2 rs3218536*, *XRCC3 rs861539*, *ERCC2 rs13181*, *ERCC5 rs17655*, а также статус метилирования промоторных областей перечисленных генов с частотами микроядер, нуклеоплазменных мостов и протрузий построена общая линейная модель (GLM). Согласно полученным данным (таблица 6), с увеличением частоты встречаемости цитогенетических нарушений у работников угольных теплоэлектростанций наиболее значимо связаны стаж работы (микроядра, $p=0,015$; мосты, $p=0,000001$, протрузии, $p=0,000001$) и гиперметилование промотора *ERCC2* (микроядра, $p=0,000001$; мосты, $p=0,000001$; протрузии, $p=0,000001$). Помимо этого, рабочий цех также является значимым фактором, ассоциирующимся с повышением частоты микроядер в двуядерных лимфоцитах ($p=0,008$).

Таблица 6. Результаты общей линейной модели

Факторы	$b \pm SE$	ОШ	95 % ДИ	p	Исход
Стаж работы	$0,21 \pm 0,09$	1,240	1,034-1,472	0,015	Повышение частоты микроядер
	$0,43 \pm 0,19$	1,531	1,059-2,231	0,000001	Повышение частоты мостов
	$0,60 \pm 0,23$	1,830	1,161-2,860	0,000001	Повышение частоты протрузий
<i>ERCC2</i> ММ	$1,00 \pm 0,14$	2,726	2,066-3,576	0,000001	Повышение частоты микроядер
	$0,80 \pm 0,53$	2,234	0,788-6,290	0,000001	Повышение частоты мостов
	$1,51 \pm 0,26$	4,540	2,719-7,538	0,000001	Повышение частоты протрузий
ТТЦ	$1,23 \pm 0,42$	3,438	1,502-7,793	0,008	Повышение частоты микроядер

Таким образом, установлены факторы риска, оказывающие влияние на формирование цитогенетических повреждений в лимфоцитах работников угольных теплоэлектростанций: работа в цехе тепловой автоматики и измерений, топливно-транспортном, ремонтном, химических цехах, гиперметилование промоторной области гена *ERCC2*, а также стаж работы.

Кумулятивное действие мутагенных факторов, присутствующих на угольных теплоэлектростанциях в разной специфике и интенсивности воздействия, а также стойкое изменение метилирования ДНК в генах репарации способствует накоплению цитогенетических повреждений у работников.

Выявленные корреляции между стажем работы, спецификой производственного участка, эпигенетическим статусом генов и уровнем цитогенетических повреждений позволяют ранжировать профессиональные риски и лежат в основе предложенной модели биомониторинга для работников угольной энергетики.

Результаты проведённой комплексной оценки свидетельствуют о том, что геномная нестабильность у работников носит многофакторный характер и формируется в результате синергичного действия химических, радиационных компонентов производственной среды и индивидуальных особенностей организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование демонстрирует, что длительное воздействие комплекса мутагенных факторов производственной среды угольных теплоэлектростанций приводит к формированию геномной нестабильности у работников, проявляющейся на трёх уровнях: цитогенетическом (накопление хромосомных повреждений, нарушение пролиферации и апоптоза), эпигенетическом (распространение гиперметилированного статуса промоторов генов репарации и детоксикации) и генетическом (реализация индивидуальной чувствительности через полиморфные варианты генов-кандидатов). Комбинаторный анализ показал, что риск нестабильности резко возрастает при сочетанном действии неблагоприятных генотипов и эпигенетических изменений, при этом существуют и протективные комбинации, обеспечивающие относительную устойчивость. Полученные результаты создают основу для персонализированной оценки профессиональных рисков, выделения групп повышенной уязвимости и разработки профилактических мероприятий, направленных на сохранение здоровья работников угольной энергетики.

В исследовании представлен молекулярно-генетический портрет работников угольных теплоэлектростанций, обуславливающий их восприимчивость к генотоксическим эффектам и профессиональным заболеваниям. Одним из ограничений работы является отсутствие измерений дозовых показателей соединений, присутствующих на угольных теплоэлектростанциях. Для более глубокого понимания выявленных взаимосвязей в будущих исследованиях следует включить биомониторинг внутренней дозы у работников угольных предприятий. Ещё одним ограничением является оценка статуса метилирования промоторных областей изученных генов качественным методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции. Перспективным направлением для получения высокоинформативных данных в дальнейших исследованиях является использование секвенирования или масс-спектрометрии.

Несмотря на существующие ограничения, полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований. Так, детального исследования требует обнаруженная связь между стажем работы и гиперметилированием промоторов генов. Перспективным направлением является исследование динамики этих изменений: являются ли они линейными, существует ли точка "невозврата", и в какой степени эти изменения обратимы после прекращения воздействия. Для окончательного подтверждения причинно-следственной связи между продолжительностью трудового стажа и эпигенетическими изменениями необходимо проведение проспективного исследования, включающего анализ профиля метилирования у одних и тех же работников несколько раз с интервалом в 5-10 лет.

Выполненное исследование выявило ключевые мишени для последующего анализа. В будущем, на основе этих данных, можно разработать высокочувствительные панели биомаркеров (например, мультиплексный анализ метилирования нескольких генов), которые будут использоваться для быстрой и точной оценки генотоксического стресса. Переход от качественных методов к количественным (секвенирование всего эпигенома, масс-спектрометрия) выявит новые мишени для метилирования, а также изучить другие эпигенетические модификации (гистоновые метки, микроРНК и др.).

Проведённое исследование создаёт основу для профилактического управления профессиональными рисками, что в конечном итоге может привести к снижению профессиональной заболеваемости и повышению качества жизни данной категории

населения. Данные учёта генотоксических эффектов позволяют чётко идентифицировать наиболее уязвимые категории работников – это сотрудники топливно-транспортного, химического, ремонтного цехов и цехов тепловой автоматики, а также лица со стажем работы на производстве более 20 лет. Для этих групп должны быть приоритетными углублённые и более частые медицинские осмотры. Обнаруженные эпигенетические изменения (гиперметилирование генов репарации и биотрансформации ксенобиотиков) являются не просто маркерами текущего повреждения, но и потенциальными предикторами долгосрочных последствий, таких как повышенный риск онкологических, сердечно-сосудистых и легочных заболеваний. Это даёт научное обоснование для организации долгосрочного когортного наблюдения за работниками даже после их выхода на пенсию.

Кроме того, полученные данные демонстрируют необходимость совершенствования системы биомониторинга в системе охраны труда. Существующих стандартных методов контроля воздуха явно недостаточно для учета возможных негативных последствий для здоровья работников. Внедрение цитогенетических и, что особенно важно, эпигенетических тестов в программу периодических медицинских осмотров работников ТЭС позволит перейти от контроля среды к контролю за состоянием организма. Это более прямой и чувствительный метод оценки вредного воздействия.

ВЫВОДЫ

1. У работников угольных ТЭС установлен комплексный паттерн геномной нестабильности, характеризующийся значимым повышением частоты микроядер, нуклеоплазменных мостов и протрузий, а также увеличением частоты апоптоза и снижением пролиферативной активности лимфоцитов ($p < 0,000001$).

2. Выраженность цитогенетических нарушений прямо зависит от стажа работы ($p < 0,001$) и производственного участка (наибольшие значения зарегистрированы у сотрудников топливно-транспортного ($p < 0,01$), химического ($p < 0,01$) цехов и цеха тепловой автоматики и измерений ($p < 0,002$)), возраста (микроядра, $p = 0,00001$, нуклеоплазменные мосты, $p = 0,04$) и пола (апоптоз, $p = 0,02$); вклад статуса курения и хронических заболеваний статистически незначим ($p > 0,05$).

3. Впервые показано, что работа на угольных ТЭС ассоциирована с гиперметилированием промоторных регионов генов репарации ДНК (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*) и биотрансформации ксенобиотиков (*GSTP1*, *CYP1A1*, *GSTT1*) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,000001$). Распространённость гиперметилирования нарастает при стаже более 20 лет (*ERCC2*, *XRCC1*, *XRCC3*; $p < 0,02$) и наиболее выражена у работников топливно-транспортного, ремонтного цехов и цеха тепловой автоматики и измерений (*ERCC2*, *ERCC5*, *GSTT1*; $p < 0,005$), а также химического цеха (*ERCC2*, *GSTT1*; $p < 0,003$); возраст, пол, статус курения и хронические заболевания значимого влияния на профиль метилирования не оказывали ($p > 0,05$).

4. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов репарации ДНК и биотрансформации ксенобиотиков не выявил значимых межгрупповых различий между работниками ТЭС и контрольной группой по большинству изученных локусов ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии генетической селекции в профессиональной группе и указывает на экзогенную природу выявленных цитогенетических и эпигенетических изменений.

5. Установлены ассоциации полиморфных локусов *XRCC1 rs25489*, *XRCC2 rs3218536*, *CYP1A1 rs4646903* и делеции *GSTT1* с повышенной частотой микроядер и протрузий; генотип *ERCC5 rs17655 GG* ассоциирован с протективным снижением частоты нуклеоплазменных мостов. Гиперметилирование промоторов *ERCC2* и *XRCC2* ассоциировано с повышенным риском цитогенетических нарушений (ОШ = 1,5-2,7;

$p < 0,05$). Впервые выявлена ассоциация локусов *ERCC5 rs17655* и *XRCC1 rs25489* со статусом метилирования их промоторов, свидетельствующая о генотип-зависимом характере эпигенетических изменений при профессиональной экспозиции.

6. Идентифицированы маркерные комбинации, ассоциированные с повышенным риском геномной нестабильности: *ERCC2 rs13181 TG+GG* × *XRCC1 rs25489 GA+AA* (микроядра, ОШ = 1,7); *CYP1A1 rs4646903 TC+CC* × *GSTT1 del* × *ERCC2 rs13181 TG+GG* × *XRCC1 rs25489 GA+AA* (протрузии, ОШ = 2,0); *XRCC1 rs25489 GA+AA* × *CYP1A1 rs4646903 CC+TC* × гиперметилирование *XRCC2* и *ERCC2* (нуклеоплазменные мосты и протрузии, ОШ = 1,7). Протективный эффект выявлен для комбинации *XRCC2 rs3218536 GG* × *GSTT1 non-del* (снижение частоты протрузий, ОШ = 0,5).

7. Построенная функциональная сеть белок-белковых взаимодействий продуктов генов репарации ДНК (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC5*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*) продемонстрировала интеграцию этих процессов в единую молекулярную систему; по топологическим характеристикам сети (степень связности, центральность) ключевыми регуляторными узлами являются *ERCC2* и *XRCC1*.

8. По данным многофакторного регрессионного анализа, геномная нестабильность у работников угольных ТЭС ассоциирована с сочетанным вкладом производственных факторов (стаж работы, $p < 0,003$; производственный участок, $p < 0,04$) и эпигенетических изменений (гиперметилирование промотора *ERCC2*, $p < 0,000001$); вклад индивидуальных факторов (пол, возраст, статус курения, хронические заболевания) в модели оказался статистически незначимым ($p > 0,05$). Прямой независимый вклад генетических полиморфизмов в многофакторной модели статистически незначим ($p > 0,05$), что свидетельствует о преимущественно опосредованном, через эпигенетические механизмы, влиянии генотипа на формирование геномной нестабильности в условиях профессиональной экспозиции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК МИНОБРНАУКИ РФ

1. **Марущак А.В.**, Торгунакова А.В., Титов Р.А., Соболева О.А., Елисейкин А.М., Киселева Е.А., Савченко Я.А., Минина В.И. Оценка величины повреждений ядерной ДНК у работников угольных теплоэлектростанций с помощью микроядерного теста с цитокинетическим блоком в связи с индивидуальными вариантами генов системы репарации ДНК *XRCC1*, *XRCC3*, *XRCC4* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. 71. 217-236. doi:10.17223/19988591/71/13 (Web of Science (Q4), Scopus, Белый список (2), ВАК (K1)). Экспериментальное исследование. Главы 3.1.1., 3.3.2.

2. **Марущак А.В.**, Торгунакова А.В., Титов Р.А., Соболева О.А., Минина В.И. Ассоциации нарушений ядерной ДНК с индивидуальными вариантами генов системы репарации ДНК *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* и *hOGG1* у работников угольных теплоэлектростанций // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2024. 4. 421-432. doi:10.17072/1994-9952-2024-4-421-432 (Белый список (3), ВАК (K2)). Экспериментальное исследование. Главы 3.1.1., 3.3.2.

3. **Марущак А.В.**, Минин А.В. Анализ цитогенетических нарушений у жителей промышленного региона в связи с работой на угольных теплоэлектростанциях // Экологическая генетика. 2024. 22(4). 383-397. doi:10.17816/ecogen636243 (Scopus, Белый список (1), ВАК (K1)). Экспериментальное исследование. Главы 3.1.1., 3.1.2.

4. **Марущак А.В.**, Астафьева М.В., Глушков А.Н., Минина В.И. Цитогенетические повреждения и эпигенетический статус промоторов генов *TP53*, *BRCA1* и *ERCC2* у

работников угольных предприятий //Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025. 11(2). 63-72. doi:10.18699/letvjgb-2025-11-10 (Белый список (4), ВАК (К3)). Экспериментальное исследование. Главы 3.1.1., 3.2.1., 3.2.3.

5. **Марущак А.В.** Изучение статуса метилирования промоторных областей генов *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4* у работников угольных теплоэлектростанций // Медицинская генетика. 2025. 24(9). 73-74. doi:10.25557/2073-7998.2025.09.73-74 (Белый список (2), ВАК (К2)). Экспериментальное исследование. Глава 3.2.1.

СВИДЕТЕЛЬСТВА О РЕГИСТРАЦИИ ПРОГРАММ ДЛЯ ЭВМ

Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2024623901 от 03.09.2024. «Результаты цитогенетического обследования работников угольных теплоэлектростанций Кузбасса. Авторы: Марущак А.В., Баканова М.Л., Минина В.И., Глушков А.Н.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

TP53 – транскрипционный фактор 53

CpG – динуклеотиды CG

CYP1A1 – цитохром P450 A1

XRCC1, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4* – (X-ray repair cross complementing 1) комплементационная группа репарации повреждений ДНК в связи с рентгеновским излучением

ERCC1, *ERCC2*, *ERCC5* – (excision-repair cross-complementing) группа кросс-комплементарной эксцизионной репарации ДНК

GST – семейство генов глутатион-S-трансфераз

GSTP1 – глутатион-S-трансфераза пи1

GSTT1 – глутатион-S-трасфераза тета1

APEX1 – apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1, апуриновая/апиримидиновая эндодезоксирибонуклеаза 1

ТЭС – тепловая электрическая станция

Del – делеция