


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
КОЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
Институт проблем промышленной экологии Севера

На правах рукописи



Перминова Елена Владимировна

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЗАЩИТЫ ГЕНОМА ПРИ  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НИКЕЛЯ  
С ПОМОЩЬЮ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

*03.00.16 - экология*

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Апатиты  
2003

Работа выполнена в Институте проблем промышленной экологии Севера  
Кольского научного центра РАН

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук, профессор  
Г.Д.Засухина

**Официальные оппоненты:**  
доктор биологических наук, профессор  
Н.А.Бебякова  
доктор медицинских наук, академик РАЕН  
В.В.Худолей

**Ведущая организация:**  
Санкт-Петербургская Академия постдипломного образования

Защита диссертации состоится « 21 » марта 2003 г. в \_\_\_\_ часов на заседании  
Диссертационного Совета КР 208.004.03. при Северном государственном  
медицинском университете по адресу: 163061, г.Архангельск, Троицкий  
проспект, 51.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Северного государственного  
медицинского университета.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета  
доктор медицинских наук, доцент



Л.Е.Дерягина

2003-А  
3834

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

В ходе развития научно-технического прогресса преобразование человеком окружающей среды (ОС) обращается негативным воздействием на здоровье и самочувствие. Отдаленные последствия воздействия химических и физических факторов ОС представляются на сегодня наиболее серьезными и сложными вопросами, стоящими перед исследователями. Около 80% онкопатологий связывают с повседневным влиянием на человека огромного количества химических, физических и биологических факторов ОС, для большинства из которых уже доказаны мутагенные и канцерогенные свойства (Худолей В.В., 1999; Smerhovsky Z. et al 2001, и др.).

Большой вклад в решение этих проблем вносит экологическая генетика (Рычков Ю.Г., 1991; Пузырев В.П., 1997; Инге-Вечтомов С.Г., 1998). Среди ее наиболее актуальных и одновременно крайне сложных задач особое значение придается изучению проблемы защиты наследственных структур от хронического воздействия антропогенных мутагенных факторов, являющихся в большинстве также и канцерогенами, на ранних доклинических стадиях (Засухина Г.Д. и др., 1989-2002; Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998; Odin A.P., 1997; Rauscher R. et al., 1998 и др.).

Рабочие горно-металлургических предприятий и население, проживающее вблизи от заводов, представляют многочисленную группу риска, подверженных хроническому воздействию высоких и низких концентраций целого ряда тяжелых металлов и их соединений в сочетании с другими неблагоприятными факторами (Проблемы охраны., 1984; Перминова И.Н., 1995; Domenz H. et al., 1996). В связи с этим в последние десятилетия пристальное внимание ученых сосредоточено на изучении генетических последствий и путей защиты организма человека при воздействии тяжелых металлов (Бигалиев А.Б., 1986; Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., 1989 и др.).

Горно-металлургический комплекс играет главенствующую роль в экономике Мурманской области. Производство никеля представлено двумя крупными предприятиями по пирометаллургической переработке сульфидных медно-никелевых руд – "Печниганикель" и "Североникель". Приоритетными загрязнителями при данном типе производства являются малорастворимые и нерастворимые соединения никеля (Doll R., 1990; Senft V. et al., 1992; Fletcher M. et al., 1994 и др.). В многочисленных работах сотрудников Института проблем промышленной экологии Севера Кольского Научного Центра РАН показан вклад никелевых предприятий в проблему загрязнения ОС и негативного влияния на здоровье населения Кольского региона (Перминова И.Н. и др., 1997; Калабин Г.В., 2000 и др.). Предприятия по производству никеля занимают одно из первых мест в России по уровню профессиональной заболеваемости и показателям загрязненности воздуха рабочих зон вредными веществами и пылью среди промышленных предприятий.

Интерес исследователей во всем мире к никелю вызван полученными доказательствами его способности к формированию множественных повреждений в живых клетках. Имеется ряд эпидемиологических данных, свидетельствующих о повышенной частоте возникновения рака носоглотки и легких (Sunderman F.W. et al., 1986; Grimsrud T.K. et al., 2002 и др.), простаты (Andersen A. et al., 2002), а также желудка (Artunina G.P. et al., 2002) у рабочих, хронически контактирующих с соединениями никеля. Генотоксические эффекты никеля на половые клетки

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ  
БИБЛИОТЕКА  
С.Петербург  
08 2003 г. 15-18

человека представляют потенциальную угрозу формирования нежелательных отдаленных последствий для будущих поколений.

По общепринятой классификации, разработанной Международным агентством по изучению рака (IARC), никель отнесен к канцерогенам группы I, т.е. к безусловным канцерогенам для человека (IARC Monographs., 1990). Исследования, выполненные на сегодняшний день в России и за рубежом, объясняют возможные механизмы генотоксического действия никеля, и, тем не менее, многое в этом вопросе остается неясным (Kawanishi S. et al., 1994; Costa M., 2002; Kasprzak K.S., 2002 и др.). Немало экспериментальных сведений накоплено о разнонаправленных генотоксических эффектах никеля (Nieboer E., 1992; Costa M., 1995; Kasprzak K.S., 2002 и др.). В то же время результаты цитогенетического биомониторинга в группах рабочих никелевой промышленности представлены не так широко (Перминова И.Н. и др., 1997; Nieboer E. et al., 1984; Senft V. et al., 1992; Jelmert O. et al., 1995; Odland J.O. et al., 2000).

Практически неизучен вопрос о возможных путях защиты генома при высокодозовой профессиональной экспозиции никелем и при широкораспространенном низкодозовом воздействии на население. Интересы многих исследователей в последние десятилетия сосредоточены на поиске оптимальных уровней потребления витаминов и других антимуагенов для повышения генетической стабильности ДНК (Ames B.N., 2001; Fenech M., Ferguson L.R., 2001 и др.). Изучение этих вопросов особенно актуально в районах Крайнего Севера с экстремальными природными условиями, для жителей которых, в частности, характерно более интенсивное протекание процессов свободно-радикального окисления. Одним из основных механизмов генотоксического действия никеля, как и многих других металлов с переменной валентностью, является образование свободных радикалов (Costa M. et al., 1994; Huang X. et al., 1994; Kasprzak K.S., 2002 и др.). Поэтому для снижения неблагоприятных последствий действия никеля на ДНК рабочих нами был использован аналог природного антиоксиданта — аскорбиновая кислота (АК).

При изучении мутагенеза и канцерогенеза, обусловленных конкретным физическим или химическим агентом, и подборе адекватного антимуагена подчеркивается необходимость учета индивидуальной чувствительности в группах людей как по отношению к мутагенному фактору, так и к антимуагену (Спицын В.А., 1991; Kelsey K.T. et al., 1995; Landi S. et al., 1996 и др.). В этом направлении, опирающемся на достижения в области изучения популяционного генетического полиморфизма, существует много актуальных проблем, решение которых позволит осуществлять более эффективную профилактику негативных эффектов здоровья, в частности, обусловленных воздействием соединений никеля.

Настоящая работа посвялена проблеме изучения эффективных средств защиты генома при воздействии соединений никеля у рабочих плавильного производства черного никеля и населения, проживающего вблизи от предприятия.

### Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования явилась оценка уровней повреждения клосток человека соединениями никеля *in vitro* и *in vivo* и антимуагенной активности АК в группе рабочих плавильного производства черного никеля с учетом факторов, модифицирующих уровни цитогенетического показателя индивидуальной чувствительности к генотоксическому действию соединений никеля и к защитным эффектам АК.

В связи с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Определение уровней структурных изменений хромосом и репарации ДНК в лимфоцитах рабочих, контактирующих с соединениями никеля, до и после приема АК.
2. Изучение распределения цитогенетического показателя индивидуальной чувствительности к соединениям никеля и АК и его взаимосвязи с уровнем содержания никеля в организме, со стажем работы и стилем жизни.
3. Экспериментальная оценка способности соединений никеля к формированию адаптивного ответа (АО) в соматических клетках человека *in vitro*.

#### Научная новизна исследования

- Впервые проведены комплексные исследования по изучению генетических эффектов соединений никеля на основе параллельного определения структурных изменений хромосом и уровней содержания никеля в организме рабочих плавильного производства черного никеля на Европейском Севере. Установлен достоверно повышенный уровень структурных изменений хромосом ( $p < 0,01$ ), который в целом по группе не зависел ни от содержания никеля в организме, ни от стажа работы. Курение усиливало генотоксические эффекты никеля в лимфоцитах рабочих.
- Выявлена высокая степень вариабельности цитогенетического показателя в лимфоцитах рабочих при хроническом воздействии высоких концентраций соединений никеля как до, так и после курса приема АК, причем в большей степени индивидуальные различия проявлялись в группе плавильщиков в сравнении с рабочими вспомогательных профессий.
- Доказано, что прием АК по 1г в сут. в течение месяца сопровождался достоверным снижением уровня цитогенетических изменений хромосом в лимфоцитах рабочих пирометаллургического производства никеля ( $p < 0,01$ ).
- Впервые установлено, что в условиях *in vitro*  $\text{NiSO}_4$  обладал способностью формировать перекрестный АО по отношению к повреждающему воздействию этого мутагена,  $\gamma$ -радиации и 4-нитрохиолин-1-оксида (4НХО).

#### Научно-практическая значимость работы

- Результаты исследования могут быть использованы при профессиональном отборе и профориентации рабочих по признаку чувствительности к соединениям никеля, а также при ежегодных профилактических обследованиях рабочих, занятых в процессе пирометаллургической переработки сульфидных медно-никельевых руд, для регистрации возможных генетических неблагоприятных изменений.
- Полученные результаты доказали состоятельность представленного в работе методического подхода при выборе и оценке эффективности путей и средств защиты генома в группах риска при профессиональной экспозиции к никелю.
- Показана высокая эффективность АК в снижении уровней цитогенетических повреждений в лимфоцитах рабочих плавильного цеха производства никеля: курс приема АК в дозе 1г/сут. в течение месяца; что может быть использовано для разработки мероприятий по профилактике нежелательных генетических последствий воздействия соединений никеля.
- Наличие АО в клетках человека при низкодозовом воздействии никеля, установленного *in vitro*, дает основание предполагать формирование неспецифически повышенной резистентности

организма к повреждающему действию некоторых химических соединений и радиации на популяционном уровне и требует продолжения исследований в этом направлении.

### Основные положения, выносимые на защиту

1. Соединения никеля обладают выраженной генотоксической активностью, вызывая повышение уровней структурных изменений хромосом и ингибирование репаративных процессов в лимфоцитах периферической крови обследованных рабочих плавильного цеха, более выраженные у курящих в сравнении с некурящими.
2. Прием АК (в дозе 1г/сут. в течение месяца) достоверно снижает уровни цитогенетических повреждений, индуцированных соединениями никеля в лимфоцитах рабочих, т.е. АК обладает антимуtagenным эффектом по отношению к соединениям никеля.
3. В целом показатель структурных изменений хромосом не зависит ни от стажа работы на предприятии, ни от уровня содержания никеля в организме рабочих. По-видимому, высокая вариабельность цитогенетического показателя обусловлена дифференциальной чувствительностью обследованных индивидуумов к соединениям никеля, к курению и антимуtagenной активности АК, в зависимости от индивидуальных наследственных особенностей генотипа, а также значительным влиянием других генотоксических факторов на рабочих вспомогательных профессий.
4. Предобработка клеток человека низкими концентрациями сульфата никеля через определенный период времени формирует повышенную устойчивость клеток к повреждающему действию высоких концентраций этой соли, а также к  $\gamma$ -радиации и стимулирует репаративный синтез ДНК (РС ДНК) по отношению к 4НХО.

### Апробация работы

Основные результаты доложены:

- на Международной Медсестринской Конференции на Кольском полуострове (г.Апатиты, 28-30 сентября 1999г.);
- на Конференции "Проблемы безопасности питьевой воды и продовольствия в арктических и субарктических регионах" (г.Мурманск, 17-19 марта 2000г.);
- на заседании лаборатории мутагенеза и репарации Института общей генетики им.Н.И.Вавилова (г.Москва, 31 октября 2000г.);
- на Всероссийской конференции "Научные аспекты экологических проблем России" (г.Москва, 13-16 июня 2001 г.);
- на VI Международной Конференции по никелю (г.Мурманск, 1-6 сентября 2002г.).
- XXVI Апатитский семинар "Физика авроральных явлений (г.Апатиты, 25-28 февраля, 2003 г.)

### Объем и структура диссертации

Работа изложена на 131 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы, 17 рисунков и 8 приложений. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3-х глав результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов и списка литературы. Библиографический указатель включает 78 отечественных и 187 иностранных источников.

### Объекты исследования

Для изучения цитотоксических и генотоксических эффектов соединений никеля в условиях *in vitro* использовали перевиваемые клетки линии рабдомиосаркомы (RD) и лимфоциты периферической крови человека.

Мутагенный потенциал соединений никеля и антимуtagenную эффективность АК оценивали по цитогенетическим критериям в лимфоцитах периферической крови рабочих (15 человек), занятых в процессе пирометаллургической переработки сульфидных медно-никелевых руд и профессионально контактирующих с соединениями никеля (г.т.Никель, Мурманская область). Основная группа состояла из рабочих основных (I группа - плавильщики, конверторщик) и вспомогательных (II группа - сварщики, мастер, каменщик-печник) профессий. Средний возраст рабочих плавильного цеха для плавильщиков составлял 40,3 года, для рабочих вспомогательных профессий - 33,5 лет. Время постоянного проживания на Севере обследованных рабочих в среднем для группы - более 17 лет. Проведенный опрос не выявил значимых отличий между индивидуумами по рационам питания, по использованию личного и общественного автотранспорта и расположению дома к проезжей части, а также по применяемой для приготовления пищи посуде.

В контрольную группу отбирались практически здоровые индивидуумы по принципу "копи-пары", не подвергавшиеся воздействию вредных химических факторов в профессиональной деятельности и проживающие на территории, расположенной на значительном расстоянии от никелевого производства (г.Апатиты, Мурманская область). Группы для исследования формировались в соответствии с рекомендациями по анализу необходимого объема выборки для оценки уровней цитогенетических повреждений в популяции (Лазутка Ю.С., 1984). Отбор проб крови производился до и после курса приема витамина С, в зимне-весенний период. Кровь отбиралась из локтевой вены в гепаринизированные пробирки. Одновременно с первым отбором проб крови проводился отбор проб волос для анализа на содержание никеля у рабочих и в контрольной группе.

### Использованные реагенты

В экспериментах *in vitro* использовалась водорастворимая соль никеля  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{NiSO}_4$ , Sigma, США) в диапазоне концентраций  $10^{-7}$ -  $10^{-3}$  М. В качестве положительного контроля использовали мутагены, при воздействии которых восстановление повреждений происходит различными путями: 4-нитрохинолин-1-оксид (4НХО, Sigma, США), УФ-миметик в диапазоне концентраций  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  и  $\gamma$ -облучение (источник —  $^{137}\text{Cs}$  с мощностью дозы 486 рад/мин, установка ГУПОС-800, ИОГен РАН).

В качестве антимутагена использована аскорбиновая кислота (АК, витамин С,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ). Рабочие и обследуемые из контрольной группы принимали АК по 1г/сутки в два приема (таблетки по 200мг, Nyscomed Pharma AS, Норвегия) ежедневно в течение 1 месяца.

### Методы исследований

Для определения спонтанного уровня сестринских хроматидных обменов (СХО) и скорости прохождения генерации (СПГ) лимфоциты суточной крови человека культивировали в пенициллиновых флаконах по стандартной методике. Фиксировали

клетки через 90-96 ч после стимуляции клеток фитогемагглютинином (ФГА). Окраску проводили по FPG-технике (ФПГ, флюорохром плюс Гимза), предложенной Пери и Вольфом (Peru P.E., Wolff Sh., 1974), модифицированной Ю.С.Лазуткой и Р.К.Лежачиным (1984). СХО считали в 15-20 клетках со стекла. Кинетику клеточного цикла оценивали по средней продолжительности генерации, которую определяли методом J.L. Ivett, R.R. Tice (Лазутка Ю.С., 1989)

Учет микроядер (МЯ) производили в культуре лимфоцитов суточной крови рабочих, контактирующих с соединениями никеля. Культивирование клеток (без цитохалазина В), фиксации и окрашивание препаратов осуществляли стандартно по методике, описанной ранее для СХО. При анализе МЯ определяли частоту МЯ на 100 клеток. В каждом варианте эксперимента анализировали 2000 клеток. Перерасчет проводили по методике, модифицированной Г.П.Македоновым (2002). Учитывались только МЯ в клетках с хорошо сохраненной цитоплазмой.

РС ДНК, индуцированный 4НХО ( $10^{-7}$ М), исследовали жидкостно-сцинтилляционным методом по включению  $^3\text{H}$ -тимидина. Для этого культуру лимфоцитов суточной крови культивировали в среде роста (в соотношении 1:5) в присутствии ФГА в течение 24 ч в пенициллиновых флаконах при  $37^\circ\text{C}$ . Для подавления репликативного синтеза через 24 ч вносили оксимочевину (ОМ,  $2 \cdot 10^{-3}$ М, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) на 40 мин.  $^3\text{H}$ -тимидин ( $3,7 \times 10^5$  Бк/мл, Sigma, USA) вводили одновременно с мутагенами на 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Об интенсивности РС ДНК судили по индексу стимуляции репаративного синтеза ДНК (ИС РС ДНК) - отношению радиоактивности в мутаген-обработанных клетках к радиоактивности в контрольных образцах.

Для изучения феномена АО использовали следующие критерии: выживаемость клеток, способность соединений никеля влиять на процессы формирования разрывов ДНК и стимуляция РС ДНК.

Выживаемость клеток оценивали в тесте прижизненного окрашивания клеточной суспензии 0,4%-ным раствором трипанового синего (Sigma, USA). Находящиеся в монослое клетки RD, обрабатывали низкой концентрацией соли никеля ( $10^{-6}$ М), которая не вызывала снижения выживаемости клеток, в течение 20 ч или облучали в дозе 10 сГр и затем пересеивали в пенициллиновые флаконы. Через 2 ч клетки промывали свежей средой и обрабатывали  $\text{NiSO}_4$  ( $5 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-4}$ М) в течение 20 ч, затем их промывали и оставляли в свежей среде на 2-3 суток. Раствор трипанового синего смешивали с клеточной суспензией в соотношении 1 : 1. Подсчет живых, неокрашенных клеток проводили в камере Горяева.

Определение элонгитивных разрывов ДНК в опытах по изучению АО проводили методом щелочной элюции по Кону (Kohn K.W. et al., 1974). Клетки, меченные  $^3\text{H}$ -тимидином (1мкКи/мл; удельная активность - 186 ГБк/кл), обрабатывали  $\text{NiSO}_4$  ( $10^{-7}$ М). Через 24 ч постинкубации клетки облучали  $\gamma$ -лучами в дозе 10, 20 и 30 Гр, после чего их собирали на нитроцеллюлозные фильтры (1,2  $\mu\text{m}$ , Sartorius), промывали и лизировали. Элюцию выполняли в темноте в течение 2 ч 0,02М раствором гидроксида тетрапропиламмония с рН=12,45. Относительную радиоактивность каждой элюированной фракции вычисляли по формуле  $K = (P_o - P_\phi)/P_o$ , где  $P_o$  - радиоактивность всех элюированных фракций плюс радиоактивность, оставшаяся на фильтре после элюции;  $P_\phi$  - радиоактивность каждой фракции.



Для определения РС ДНК в опытах по изучению АО при посадке одновременно с ФГА в культуру лимфоцитов вносили  $\text{NiSO}_4$  ( $10^{-7}\text{M}$ ). Через 20 ч вводили ОМ на 40 мин. В остальном посадку и обработку мутагенами проводили стандартно, как описано выше.

Графики, представленные на рис. 5,6 и 7, построены по данным одного из трех независимых экспериментов.

Анализ проб волос на содержание никеля выполнен методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной аргонной плазмой (прибор IСАР-9000 "Thermo Jarrell Ash", USA) в Центре биотической медицины (г.Москва).

Математическая обработка данных и построение диаграмм и графиков осуществлялись при использовании пакета прикладных программ статистической обработки "Excel 95" и "Statistica" на персональной ЭВМ. Для сравнения двух связанных выборок применяли критерий Вилкоксона, для несвязанных – U критерий Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился по коэффициенту корреляции Спирмена. Характеристики распределений представлены в виде А (L, H), где А – медиана, L – нижняя квартиль, H – верхняя квартиль; или средней геометрической.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

---

### 1. Результаты цитогенетического мониторинга в группах рабочих предприятия по пирометаллургической переработке сульфидных медно-никелевых руд

#### *Оценка уровней структурных изменений хромосом в лимфоцитах рабочих*

Для учета влияния мутагенных факторов производственной среды на рабочих плавильного цеха черного никеля использованы два критерия оценки цитогенетических повреждений (СХО и МЯ) в лимфоцитах. Установлено, что средние уровни СХО в лимфоцитах рабочих незначительно отличались от среднепопуляционных фоновых уровней спонтанного образования СХО (6-8 СХО/клетку) и составляли для I-ой и II-ой групп соответственно 7,7 и 8,2 СХО/клетку.

Результаты микроядерного теста выявили в лимфоцитах рабочих значительные превышения среднепопуляционных значений МЯ 9,9 (9,2; 10,7) МЯ/100 клеток (рис. 1), которые составляют по внутрилабораторным данным  $1,5 \pm 0,54$  МЯ/100 клеток (Македонов Г.П., Цховребова Л.В., 2002). Ранее повышенные уровни цитогенетических изменений в лимфоцитах рабочих, контактирующих с никелем на производстве, были зарегистрированы по критериям учета ХА (Deng C. et al., 1988; Senft V. et al., 1992), СХО (Wurfel U. et al., 1998) и др.

В группе рабочих вспомогательных профессий уровень МЯ 10,3 (9,8; 10,7) МЯ/100 клеток превышал таковой в группе плавильщиков 9,5 (8,3; 9,9) МЯ/100 клеток. Подобная тенденция наблюдалась также по критерию СХО.

Курящие плавильщики характеризовались более высокими спонтанными уровнями МЯ (9,7 на 100 клеток) в лимфоцитах, чем некурящие (8,6 на 100 клеток) (рис.1). График демонстрирует высокую степень вариабельности по уровню образования МЯ в лимфоцитах плавильщиков, особенно курящих, в отличие от рабочих вспомогательных профессий.

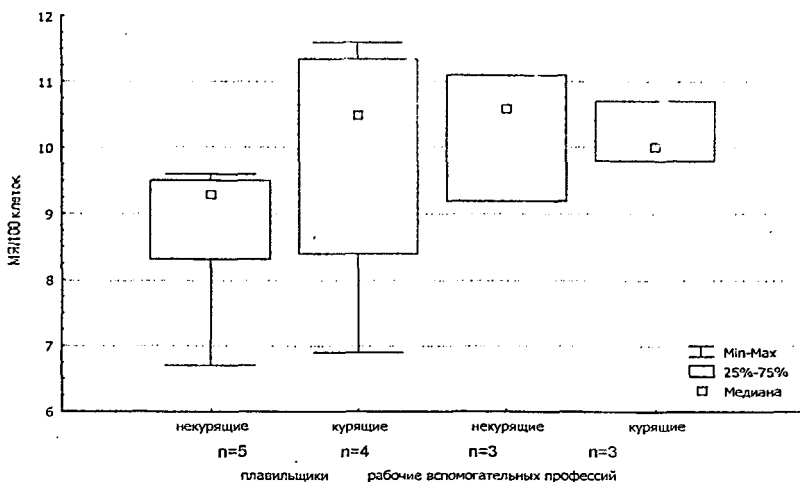


Рис. 1. Средние уровни МЯ на 100 клеток в лимфоцитах рабочих основных и вспомогательных профессий с учетом статуса курения.

#### Характеристика репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах рабочих

Параллельно с оценкой цитогенетических изменений определялся показатель репаративных процессов в лимфоцитах рабочих и контроля. Как известно, РС ДНК, с одной стороны, служит самостоятельной оценкой мутагенности, а, с другой, отражает способность клеток к восстановлению повреждений ДНК.

В группе рабочих плавильного цеха в 87% наблюдалось ингибирование процессов репарации, в то время как в контрольной группе лишь у 37% обследованных. Имеется ряд литературных данных, подтверждающих ингибирование репаративной активности соединениями никеля (Hartwig A. et al., 1994; Snyder R.D., 1994; Перминова И.Н. и др., 1997 и др.). Медианные значения ИС РС ДНК в группах рабочих основных и вспомогательных профессий находились на одном уровне (0,8), но при этом в группе рабочих вспомогательных профессий наблюдалась более высокая вариабельность показателя от 0,46 до 1,37, в сравнении с плавильщиками (от 0,66 до 1,01).

У курящих рабочих исходный уровень РС ДНК составлял 0,78 (0,71; 0,90), что на 17% ниже в сравнении с некурящими, у которых индекс стимуляции достигал в среднем 0,82 (0,71; 0,98). Достоверные различия ( $p=0,05$ ) между курящими и некурящими наблюдались только во II-ой группе, причем только среди некурящих рабочих вспомогательных профессий, наблюдалась тенденция к стимуляции РС ДНК в лимфоцитах по отношению к 4НХО (0,97).

#### Индивидуальный ответ на воздействие соединений никеля в зависимости от концентрации никеля в волосах

Показатель формирования МЯ служил также основным биомаркером оценки индивидуальной чувствительности к никелю, содержание которого определили в волосах

рабочих и контроля. В контрольной группе уровни накопления никеля в волосах были достоверно ниже (в 30 раз) таковых у рабочих и варьировали от 0,07 до 0,90 мкг/г, в то время как в группе рабочих плавильного цеха – от 3,29 до 30,86 мкг/г, что соответствует различию внешней дозы экспозиции никелем. Как и следовало ожидать, в группе плавильщиков уровни содержания никеля в волосах были достоверно выше в 2,3 раза ( $p=0,01$ ), чем в группе рабочих вспомогательных профессий: 15,1 (7,0; 30,9) мкг/г и 6,3 (3,3; 13,5) мкг/г соответственно.

В целом взаимосвязи между уровнями образования МЯ и содержанием никеля в волосах ни в одной из обследованных групп обнаружено не было (рис. 2). Тем не менее, анализ индивидуальных различий позволил выявить важные тенденции модифицирующего влияния на индивидуальную чувствительность к соединениям никеля таких факторов, как содержание никеля в организме, стаж работы и курение, с учетом профессиональных особенностей.

Во-первых, следует отметить, что, если во II-ой группе значения находились приблизительно на одном уровне 9,2-11,1 МЯ/100 клеток (рис. 2Б), то в группе плавильщиков показатель варьировал в широких пределах от 6,7 до 11,6 МЯ/100 клеток (рис. 2А). Это, вероятно, свидетельствует о существенных различиях в индивидуальной чувствительности к никелю, обусловленной генотипом, среди рабочих основных профессий, хронически экспонированных высокими концентрациями малорастворимых и нерастворимых соединений никеля. Так, например, имеются доказательства высокой чувствительности носителей генотипа GSTM1 по отношению к монооксиду углерода (Sasiadek M. et al., 1997; Sram R.J., Binkova B., 2000 и др.). Можно предполагать, что семейство генов GST также могут детерминировать чувствительность к никелю.

Во-вторых, можно выделить некоторые особенности индивидуальной реакции на влияние производственных факторов. Так, некоторые индивидуумы из основной группы (доноры №№ 8 и 9) с повышенными уровнями повреждений при низком содержании никеля в волосах, по-видимому, обладают повышенной чувствительностью к соединениям никеля (рис. 2А). Донор под № 1 характеризовался наиболее высоким уровнем Ni в волосах (30,9 мкг/г) при высоком уровне формирования структурных перестроек хромосом, что может указывать на недостаточную активность ферментов, принимающих участие в детоксикации ксенобиотиков, в том числе, компонентов антиоксидантной системы. Кроме того, в вышеперечисленных случаях, возможно, происходило усиление генотоксических эффектов курением. У индивидуумов под №№ 2 и 3 при высоких уровнях содержания никеля в организме (29,6 и 27,3 мкг/г) наблюдались относительно невысокие для данной группы уровни образования МЯ в лимфоцитах (8,3 и 9,3 МЯ/100 клеток), оба относились к некурящим. Можно предположить, что подобный эффект обусловлен включением адаптивных механизмов.

В-третьих, при том, что в целом по группе плавильщиков корреляции между количеством МЯ и стажем не наблюдалось, у рабочих основных профессий со стажем более 10 лет коэффициент корреляции по Спирмену был равен  $R_s=-0,93$  ( $p=0,008$ ). Значительная отрицательная связь между уровнями формирования МЯ и стажем, наблюдалась также в группе рабочих вспомогательных профессий  $R_s=-0,84$  при  $p=0,04$ . Можно предположить, что для некоторых рабочих имеет место повышение устойчивости клеток к генотоксическим производственным факторам с увеличением стажа работы.

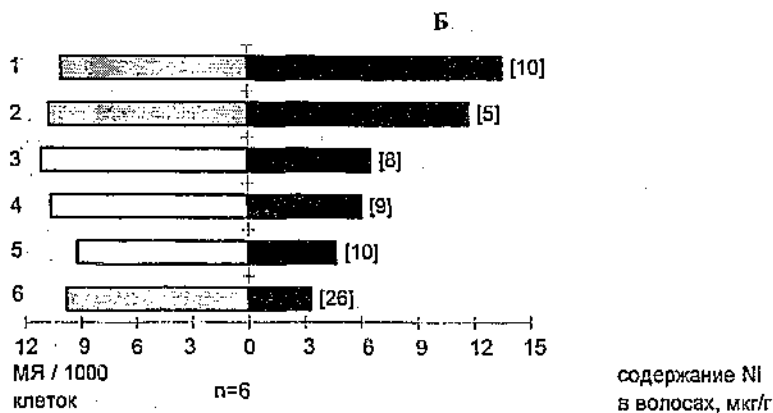
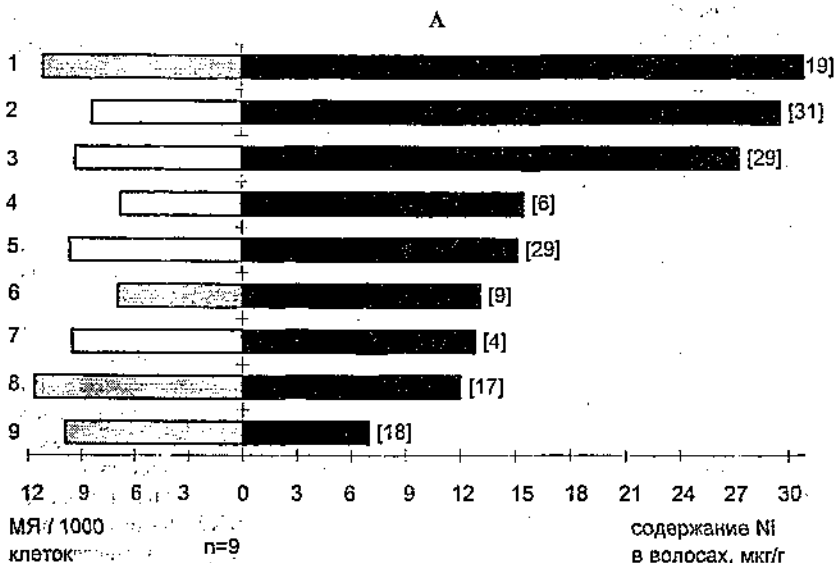


Рис. 2. Зависимость показателя количества МЯ в лимфоцитах рабочих от уровней содержания никеля в волосах с учетом стажа работы на предприятии (светлые столбики в вариационном ряду по числу МЯ/100 клеток - некурящие, темные - курящие): А - в группе рабочих основных профессий; Б - в группе рабочих вспомогательных профессий; (19) - стаж работы на предприятии.

Что касается оценки индивидуальной чувствительности в группе рабочих вспомогательных профессий (рис. 2Б), то выраженных отличий по критерию формирования МЯ

в лимфоцитах выявлено не было. У сварщиков, работающих в плавильном цехе, зарегистрированы уровни цитогенетических повреждений хромосом, значительно превышающие среднegrупповой показатель (10,7, 10,6 и 10,0 МЯ/100 клеток). что согласуется с литературными данными (Jelmert O. et al., 1994; Jelmert O. et al., 1995; Werfel U. et al., 1998).

Таким образом, генотоксическое влияние соединений никеля выражалось в значительном превышении (в 6,5 раз) среднепопуляционных уровней формирования МЯ (1,5±0,5 МЯ/100 клеток) в лимфоцитах рабочих, подверженных воздействию высоких концентраций никеля на производстве, при одновременном ингибировании репаративной активности на 87%. Наблюдалась взаимосвязь между уровнями структурных изменений хромосом и профессиональными особенностями индивидуумов, а также привычкой к курению. Так, содержание Ni в организме и курение существенно модифицировали индивидуальную чувствительность к никелю в лимфоцитах рабочих, занятых в основных профессиях плавильного цеха. Курение усиливало генотоксическое действие соединений никеля в группе плавильщиков, но не оказывало влияния на уровень содержания никеля в волосах.

## 2. Оценка эффективности аскорбиновой кислоты в снижении неблагоприятных генетических эффектов в лимфоцитах рабочих производства никеля

### *Оценка изменений уровня структурных перестроек хромосом после курса приема аскорбиновой кислоты*

После курса приема АК в контрольной группе наблюдалась тенденция к снижению уровней структурных изменений хромосом в лимфоцитах ( $p=0,08$ ), которое по критерию СХО составило 8%. У некурящих антимуутагенная эффективность АК была выражена в большей степени, чем у курящих (13% и 3% соответственно).

У рабочих прием АК привел к достоверному снижению числа МЯ в лимфоцитах на 30% с 9,5 МЯ/100 клеток по средней геометрической до уровня 6,7 МЯ/100 клеток ( $p=0,002$ ). Это, возможно, свидетельствует о свободнорадикальных механизмах генетических повреждений в клетках работающих в плавильном цехе.

После приема АК достоверно понизились уровни формирования МЯ как в лимфоцитах плавильщиков, так и рабочих вспомогательных профессий: во II-ой группе на 33% до уровня 6,6 (6,5; 7,0) МЯ/100 клеток, а в I-ой на 27% до уровня 6,8 (6,1; 8,2) МЯ/100 клеток. В группе плавильщиков зарегистрирована высокая вариабельность показателя (рис.3), что, вероятно, указывает на значительные индивидуальные различия по чувствительности к АК и никелю. На показатель индивидуальной чувствительности к никелю и АК в лимфоцитах рабочих основных профессий существенное влияние оказывали содержание никеля в волосах, стаж работы на предприятии и привычка к курению. Наибольший эффект АК проявлялся у курящих, при низком содержании никеля в волосах и повышенном уровне цитогенетических повреждений, т.е. у индивидуумов, обладающих, по-видимому, наибольшей чувствительностью к соединениям никеля. Во II-ой группе подобной зависимости обнаружено не было.

У 3-х человек из 14-ти отмечалось отсутствие антимуутагенного эффекта. По всей видимости, отсутствие эффекта АК согласуется с полученными ранее Ю.Г.Рычковым с соавторами данными о том, что 15-18% здоровых людей не способны к ассимиляции АК (1985).

Интересно отметить, что у лиц старше 45 лет АК в меньшей степени проявляла защитный эффект, чем у более молодых индивидуумов.

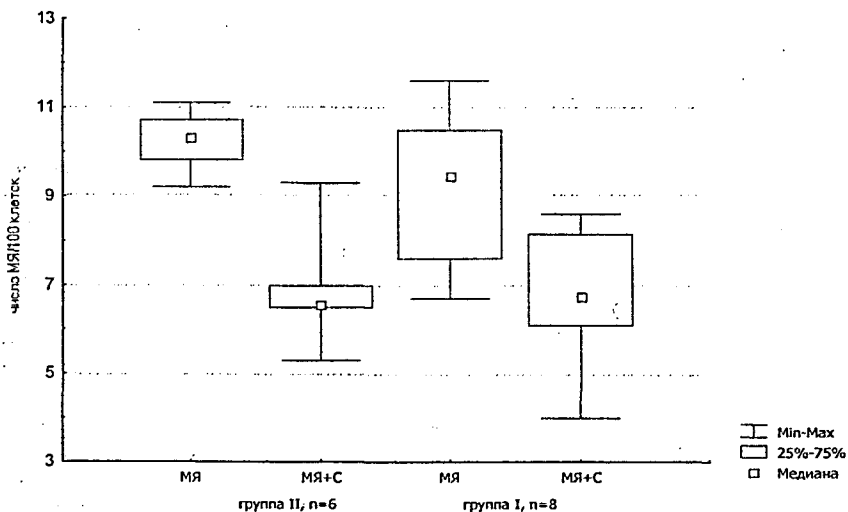


Рис. 3. Уровни МЯ в лимфоцитах рабочих основных и вспомогательных профессий до и после курса приема АК.

**Характеристика динамики показателей репаративного синтеза ДНК при воздействии аскорбиновой кислоты**

Существенных отличий средних уровней РС ДНК в контрольной группе от таковых в основной группе как до, так и после приема АК выявлено не было. До приема витамина показатель в контроле был равен 0,68, то после – 1,07.

В таблице 1 представлены результаты по стимуляции РС ДНК 4НХО в лимфоцитах рабочих плавильного цеха до и после курса приема АК. Достоверного изменения ИС РС ДНК в группе рабочих не наблюдалось, можно лишь отметить, что этот показатель имел тенденцию к незначительному повышению с 0,79 до 0,96. При этом доля лиц, у которых не наблюдалось стимуляции РС ДНК, после приема АК снизилась на 23% и составила 64%.

Таблица 1.

Индекс стимуляции РС ДНК, индуцированного 4НХО, до начала и после курса приема аскорбиновой кислоты в группе рабочих основных и вспомогательных профессий плавильного цеха с учетом статуса курения

Группа	курящие, ср. геом.			некурящие, ср. геом.		
	ИС	ИС+С	п	ИС	ИС+С	п
Группа I	0,83	0,83	4	0,76	1,21	4
Группа II	0,64	0,88	3	0,97	0,93	3

п – количество человек

Эффекты влияния АК на систему репарации ДНК в клетках рабочих характеризовались высокой степенью вариабельности: от выраженной стимуляции в диапазоне от 10% до 74% у 6 человек до ее отсутствия у 8 человек из 14 обследованных. В среднем в группе курящих рабочих как исходный уровень репаративной активности (0,74), так и после курса приема витамина (0,86) были существенно ниже в сравнении с некурящими, у которых индекс стимуляции достигал в среднем 0,85 и 1,08 соответственно до и после приема АК.

В целом для группы рабочих влияния профессиональных особенностей на уровень РС ДНК выявлено не было. Вместе с тем, следует отметить, что в группе рабочих основных профессий в лимфоцитах некурящих индивидуумов АК проявляла высокую эффективность, ИС РС ДНК достигал 1,21, в то время как у курящих не наблюдалось изменения среднего уровня показателя. Некурящие индивидуумы из II-ой группы характеризовались относительно высоким уровнем репарации до приема АК, после курса приема витамина этот уровень не изменился. У курящих, также как и в I-ой группе, существенной стимуляции репаративного синтеза обнаружено не было.

Таким образом, установлена выраженная антимутагенная активность АК: прием АК привел к достоверному снижению числа МЯ в лимфоцитах рабочих ( $p=0,002$ ). У плавилищиков наблюдался значительный разброс значений цитогенетического показателя после приема витамина С в зависимости от стажа работы, содержания никеля в волосах и привычки к курению. У рабочих вспомогательных профессий наибольшая активность АК проявлялась при наиболее высоких уровнях повреждений в лимфоцитах. Известно, что АК способна к прямому перехвату свободных радикалов, что выражается в снижении количества первичных повреждений. Это может объяснить отсутствие выраженной стимуляции РС ДНК. В то же время значительное снижение числа МЯ после приема АК может говорить об активизации других этапов репарации, а также о возможности стабилизации структуры ДНК при участии АК или за счет снижения проницаемости клеточных мембран.

**3. Экспериментальное изучение *in vitro* адаптивного ответа в клетках человека, преобработанных сульфатом никеля или  $\gamma$ -радиацией, при воздействии высоких доз этих же мутагенов**

Формирование адаптивного ответа (АО), как одного из механизмов защиты клетки от генотоксического действия мутагенов и канцерогенов – *in vitro* на клетках человека впервые установлено для соединений никеля. Механизмы формирования АО на уровне клеточных структур до сих пор остаются до конца нераскрытыми.

Мы предположили, что поскольку мутагенное действие тяжелых металлов и, в частности, соединений никеля, также как и при воздействии  $\gamma$ -радиации, опосредовано образованием свободных радикалов в клетках (Saplakoglu U. et al., 1997; Hamdan S. et al., 1999; Kasprzak K.S., 2002), то можно ожидать, что феномен адаптации при воздействии  $\gamma$ -радиации и никеля может иметь общие пути.

**Кинетика выживаемости клеток человека, преобработанных сульфатом никеля или  $\gamma$ -радиацией, к повреждающим дозам этих же мутагенов**

На рис. 4 показано, что выживаемость клеток RD линейно снижалась при увеличении концентрации  $\text{NiSO}_4$  от  $5 \times 10^{-6} \text{M}$  до  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  (кривая 1).  $\text{LD}_{50}$

соответствовала концентрации соли никеля  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ . Предобработка клеток низкой концентрацией сульфата никеля ( $10^{-6} \text{M}$ , 24 ч) привела к повышению их выживаемости при всех повреждающих концентрациях соли никеля ( $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{M}$ , 24 ч) (кривая 2). При воздействии  $\text{NiSO}_4$  в концентрации  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  предобработка клеток низкой дозой этого мутагена привела к повышению выживаемости в 3 раза в сравнении с необработанными предварительно клетками. Предварительное облучение клеток RD  $\gamma$ -лучами в дозе 10-14 сГр при последующем воздействии повреждающей дозы  $\text{NiSO}_4$   $5 \times 10^{-6} \text{M}$  сопровождалось выраженным повышением выживаемости клеток RD (кривая 3). При дальнейшем увеличении концентрации сульфата никеля было отмечено снижение показателя цитотоксичности соли. При концентрации  $\text{NiSO}_4$   $5 \times 10^{-4} \text{M}$  наблюдалась одинаковая эффективность как при использовании в качестве адаптирующего фактора сульфата никеля, так и  $\gamma$ -радиации.

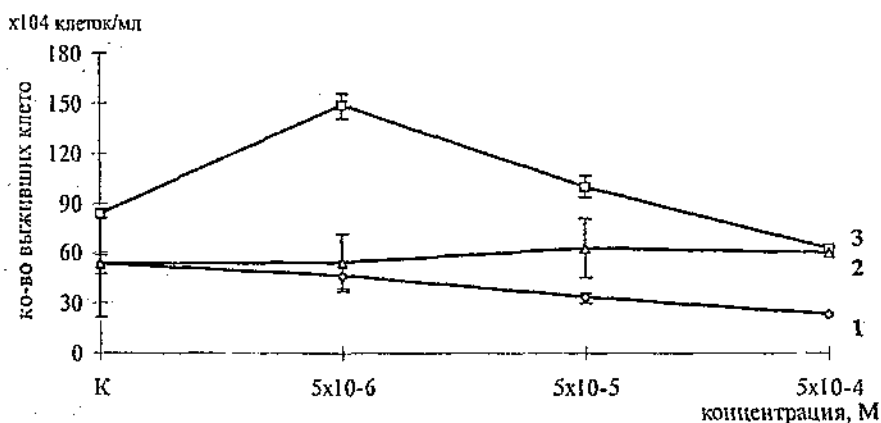


Рис. 4. Выживаемость при АО клеток RD человека, обработанных  $\text{NiSO}_4$  в концентрациях  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{M}$ . 1 — без предварительной обработки; 2 — с предобработкой  $\text{NiSO}_4$  в концентрации  $10^{-6} \text{M}$ , 24ч; 3 — с предварительным облучением в дозе 10-14 сГр.

#### Изучение способности низких концентраций $\text{NiSO}_4$ к повышению устойчивости клеток человека к $\gamma$ -радиации по критерию формирования разрывов ДНК

На рис.5 представлены результаты серии экспериментов по изучению формирования АО в клетках RD, предобработанных низкими концентрациями  $\text{NiSO}_4$  к последующему воздействию высоких доз  $\gamma$ -радиации (10-30 Гр).

На рисунке кривая графика, отражающая показатель  $\gamma$ -индуцированных разрывов ДНК в предварительно обработанных адаптирующей концентрацией  $\text{NiSO}_4$  ( $10^{-7} \text{M}$ ) клетках, расположена выше кривой индукции разрывов ДНК  $\gamma$ -лучами в клетках, необработанных  $\text{NiSO}_4$ , что свидетельствует о протекторном действии сульфата никеля. В опытах без предварительной обработки клеток  $\text{NiSO}_4$  наблюдалось лицевое снижение доли цельной ДНК, оставшейся на



фильтре после элюции. В предобработанных клетках, увеличение дозы  $\gamma$ -излучения до 20 Гр сопровождалось сначала снижением целостности нити ДНК, а затем при дальнейшем повышении дозы до 30 Гр отмечалась стабилизация показателя, что, возможно, объясняется индукцией РС ДНК адаптирующей дозой  $\text{NiSO}_4$  или формированием сшивок.

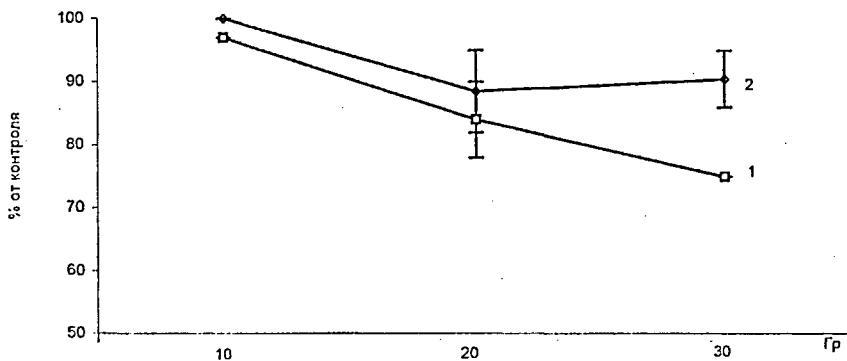


Рис. 5. Индукция  $\gamma$ -лучами разрывов ДНК в клетках RD человека. 1 – без предварительной обработки; 2 – с предварительной обработкой  $\text{NiSO}_4$  ( $10^{-7}\text{M}$ ), 24 ч.

### Репаративный синтез ДНК

Концентрация сульфата никеля ( $10^{-7}\text{M}$ ), использованная в качестве адаптирующей, не вызывала изменений включения  $\text{H}^3$ -тимидина (ИС РС ДНК=1,00) в ДНК лимфоцитов здорового донора. При использовании концентрации  $\text{NiSO}_4$   $10^{-3}\text{M}$  наблюдалась существенная стимуляция репарации (1,55). Сравнивая уровни репаративного синтеза при АО в опытах с 4НХО и  $\text{NiSO}_4$ , мы обнаружили, что в первом случае имеет место стимуляция РС ДНК с 1,60 до 2,23. В опытах с  $\text{NiSO}_4$  уровень РС ДНК практически не отличался в клетках, предобработанных низкими концентрациями никеля (1,61), и в клетках без предварительной обработки (1,55). Полученные данные свидетельствуют о неспецифичности процессов, лежащих в основе стимуляции репарации ДНК в предобработанных солью никеля клетках при использовании разных повреждающих факторов. В основе объяснения стимуляции РС ДНК по отношению к 4НХО может лежать предположение о стимуляции процессов индуцибельной репарации, как основного механизма при АО (Львова Г.Н., Засухина Г.Д., 2002; Шмакова Н.Л. и др., 2002 и др.).

Таким образом, можно предположить, что низкие концентрации никеля формируют АО по отношению к повреждающим концентрациям как самого никеля, так и некоторых других мутагенов, т.е. в наших опытах воспроизведен феномен кросс-адаптации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

Анализ полученных данных позволяет заключить, что рабочие, контактирующие с соединениями никеля, характеризовались высокой индивидуальной чувствительностью к генотоксическому действию никеля и антимутагенной активности АК. По-видимому, индивидуальные отличия, помимо генотипической обусловленности, определялись также влиянием таких факторов, как уровни экспозиции к никелю, привычка к курению и, вероятно, различиями адаптивных резервов организма. Вместе с тем вполне возможно, что при обследовании большего контингента рабочих с учетом генотипа, определяющего индивидуальную чувствительность, будут выявлены и другие связи и закономерности взаимосвязи уровней накопления никеля в организме рабочих и исследуемыми цитогенетическими биомаркерами. Из группы обследованных рабочих можно выделить людей, характеризующихся повышенной чувствительностью генома к мутагенному воздействию никеля и нуждающихся в защитных и реабилитационных мероприятиях.

Явление кросс-адаптации при воздействии малых доз  $Ni^{2+}$  и  $\gamma$ -радиации, установленное в опытах *in vitro*, может являться теоретической основой последующих эпидемиологических исследований, ориентированных на оценку эффектов здоровья групп риска среди населения, экспонированного никелем из многочисленных источников ОС.

## ВЫВОДЫ

---

1. На основании эколого-генетической оценки последствий воздействия соединений никеля показана их генотоксическая активность для рабочих в условиях производства черногого никеля: обнаружены повышенные уровни микроядер и ингибирование репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах.
2. Установлено достоверное превышение содержания никеля в волосах рабочих основных профессий плавильного цеха в сравнении с рабочими вспомогательных профессий в 2,3 раза ( $p=0,01$ ).
3. Оценка индивидуальной чувствительности к соединениям никеля выявила высокую степень варибельности цитогенетического показателя в лимфоцитах плавильщиков в зависимости от содержания никеля в волосах и курения, усиливавшего генотоксическое действие никеля.
4. Прием аскорбиновой кислоты (1г/сут в течение месяца) сопровождался достоверным снижением числа микроядер на 30% ( $p<0,01$ ) и тенденцией к стимуляции репаративного синтеза ДНК (на 18%) в лимфоцитах, что может быть использовано медицинскими учреждениями для разработки профилактических мероприятий с применением аскорбиновой кислоты, как эффективного антимутагена в различных группах риска, экспонированных соединениями никеля.
5. Индивидуальная чувствительность к витамину С проявлялась в разнонаправленных эффектах: от выраженного снижения числа микроядер в лимфоцитах рабочих (на 60%) до отсутствия сдвигов после курса приема аскорбиновой кислоты.

6. Впервые в условиях *in vitro* доказано, что предобработка низкими концентрациями сульфата никеля формировала перекрестный адаптивный ответ в соматических клетках человека к последующему воздействию повреждающих концентраций  $\text{NiSO}_4$  и  $\gamma$ -радиации.

7. При разработке и проведении защитных и реабилитационных мероприятий в группах высокого профессионального риска производства черного никеля необходим цитогенетический мониторинг, позволяющий диагностировать повышенную чувствительность генома рабочих к генотоксическому действию соединений никеля.

#### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Перминова Е.В., Синельщикова Т.А., Перминова И.Н., Засухина Г.Д. Сравнение адаптивного ответа в клетках человека при воздействии  $\gamma$ -радиации и сульфата никеля//Радиационная биология. Радиозология. - 2000. - Т. 40. - №2. - С 173-176.
2. Перминова И.Н., Синельщикова Т.А., Алехина Н.И., Перминова Е.В., Засухина Г.Д. Биомониторинг в лимфоцитах рабочих, контактирующих с соединениями никеля, и подход к снижению генетических эффектов//Цитология и генетика. - 2001. - № 3. - С. 59-65.
3. Перминова И.Н., Синельщикова Т.А., Алехина Н.И., Перминова Е.В., Засухина Г.Д. Индивидуальная чувствительность к генотоксическому действию никеля и антимуtagenной активности аскорбиновой кислоты//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2001. - Т. 131. - № 4. - С. 437-441.
4. Перминова Е.В., Синельщикова Т.А. Перминова И.Н.. Сравнение уровней адаптивного ответа при  $\gamma$ -облучении и воздействии тяжелых металлов в клетках человека//Тезисы докл. Международного симпозиума "Хроническое радиационное воздействие: возможности биологической индикации", 14-16 марта. - Челябинск, 2000. - С. 170-171.
5. Яковлева М.Н., Перминова И.Н., Перминова Е.В., Синельщикова Т.А. Сравнительное действие ингибитора антиоксидантного фермента - СОД при  $\gamma$ -облучении и воздействии сульфата никеля//Тезисы докл. Международной Конференции "Проблемы радиационной генетики на рубеже веков", 20-24 ноября. - Москва, 2000. - С. 64-65.
6. Перминова И.Н., Перминова Е.В., Алехина Н.И. Роль аскорбиновой кислоты в снижении генотоксических эффектов соединений никеля у курящих и некурящих рабочих никелевого производства//Тезисы докл. Всероссийской Конференции "Научные аспекты экологических проблем России", 13-16 июня. - Москва, 2001. - С. 278.
7. Perminova E., Sinelshchikova T., Perminova I. Nickel-induced adaptive response in human cells//The abstracts of Sixth Intern. Nickel Conference, September 1-6. - Murmansk, 2002. - P. 91.
8. Perminova I., Yakovleva M., Perminova E. Approaches to DNA damage protection from exposure to nickel in high risk population groups//The abstracts of Sixth Intern. Nickel Conference, September 1-6. - Murmansk, 2002. - P. 92.
9. Perminova E.V., Yakovleva M.N., Perminova I.N., Zasukhina G.D. Experimental study of  $\gamma$ -radiation effects on human cells//The abstracts of XXVI Annual Seminar "Physics of Auroral Phenomena", February, 25-28. - Apatity, 2003. - P. 22.

2003 - А  
3834

№ - 3854

Автореферат

ПЕРМИНОВА Елена Владимировна

ЭКОЛОГО-ГИНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЗАЩИТЫ  
ГЕНОМА ПРИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ  
НИКЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Технический редактор В.А.Ганичев

Лицензия ПД 00801 от 06 октября 2000 г.

Подписано к печати 25.12.2002

Формат бумаги 60x84 1/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Гарнитура Times/Syrrilic

Уч.-изд.л. 1.0. Заказ № 11. Тираж 100 экз.

---

*Российская Академия Наук*

Ордена Ленина Кольский научный центр им.С.М.Кирова  
184209, Апатиты, Мурманская область, ул.Ферсмана, 14