

УДК 575.57.033

ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК У ШАХТЕРОВ (обзор литературы)*Ю. Е. Кулемин, В. И. Минина, Р. А. Титов***DNA DAMAGE IN MINERS (literature review)***Yu. E. Kulemin, V. I. Minina, R. A. Titov*

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-06-98014 р-Сибирь-а, соглашения № 19 с АКО, программы «УМНИК» по Кемеровской области и государственного задания Минобрнауки РФ № 2014/64.

В процессе добычи угля рабочие (как в шахтах, так и разрезах) подвержены воздействию целого комплекса факторов. Тем не менее исследования, направленные на детальный анализ повреждений ДНК у шахтеров, пока немногочисленны. В данном обзоре анализируются результаты цитогенетических исследований, проводившихся на различных угледобывающих предприятиях мира. Результаты работ свидетельствуют о значительном накоплении в клетках крови шахтеров хромосомных aberrаций, сестринских хроматидных обменов, микроядер и разрывов ДНК, выявляемых методом ДНК-комет. Это свидетельствует о необходимости проведения подобных исследований в Кузбассе и о целесообразности разработки и внедрения защитных мер и профилактических программ для шахтеров, направленных именно на защиту их генома.

In the process of coal mining, workers (both in mines and open pits) are exposed to a whole range of factors. However, studies aimed at in-depth analysis of DNA damage in miners, are still few. In this review, we analyze the results of cytogenetic studies conducted in various coal mining companies in the world. Results of studies show a significant accumulation of chromosomal aberrations in miners' blood cells, sister chromatid exchanges, micronuclei and DNA strand breaks, detected by DNA comets. This illustrates the need for similar studies in Kuzbass and the feasibility of developing and implementing protective measures and prevention programmes for miners, aimed at protecting their genomes.

Ключевые слова: шахтеры, повреждения ДНК, хромосомные aberrации.

Keywords: chromosome aberrations, sister chromatic exchanges, micronuclei, comet assay.

Шахтеры в процессе своей деятельности подвергаются многочисленным вредным воздействиям: радиация; контакт с угольно-породной пылью; изменение газового состава воздуха (снижение содержания кислорода, увеличение концентрации углекислого газа, поступление в атмосферу шахты метана, оксида углерода, сероводорода, сернистого газа, оксидов азота, взрывных газов и т. д.); шум и вибрация; нерациональное освещение и вентиляция; вынужденное положение тела; нервно-психическое, зрительное, слуховое перенапряжение; тяжелый физический труд, а также повышенная опасность травматизма. И чем больше подземный стаж, тем выше вероятность нарушения здоровья в результате заболевания или травмы [8].

Известно, что вышеперечисленные неблагоприятные факторы могут выступать в качестве генотоксикантов, т. е. вызывать повреждения ДНК. В настоящее время разработаны точные методы оценки мутагенной чувствительности и обнаружения изменений в геноме, происходящих под воздействием мутагенных агентов [16]. Одной из надежных и часто используемых систем для этих целей является изучение хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови человека [2]. Уровень ХА в данных клетках является важной количественной характеристикой мутагенеза в организме в целом. Повышение частоты ХА является реакцией организма в ответ на действие целого ряда факторов различной природы, что позволяет использовать этот показатель для оценки эффектов различ-

ных комплексов генотоксикантов [3]. Классификации aberrаций хромосом, регистрируемых в метафазе митоза, приведены в ряде работ [9; 5; 1]. По наблюдаемым типам aberrаций можно достаточно определенно идентифицировать тип мутагенного воздействия. Так, например, наличие в спектре наблюдаемых aberrаций повышенного уровня дицентрических хромосом и центрических колец однозначно свидетельствуют о радиационной природе мутагена [14; 15; 20; 18]. В то же время повышение частоты aberrаций хроматидного типа свидетельствует о химической природе мутагена.

Особенно наглядно хромосомные перестройки обменного типа выявляются методом учета сестринских хроматидных обменов (СХО). Этот метод является высокочувствительным для всех химических мутагенов и позволяет выявлять их действие в очень малых дозах, а число индуцированных СХО растет линейно с увеличением концентрации химического вещества независимо от типа мутагена в лимфоцитах человека [4]. В то же время анализ данных литературы показывает, что не только химические вещества, но и воздействие α -частиц и в малых дозах может также повышать частоту СХО в клетках. Находясь внутри организма, α -частицы сильно разрушают молекулы, расположенные рядом с ними, образуя при этом большое количество свободных радикалов, которые и выступают как химические мутагены.

Помимо классических методов учета aberrаций и СХО широко используется метод анализа микроядер

(МЯ). Микроядерный тест в клетках периферической крови является одним из лучших существующих цитогенетических методов *in vitro* в генетической токсикологии [6]. МЯ являются удобным маркером обоих типов хромосомных повреждений. Так как они отмечаются в клетках, которые прошли полный цикл клеточного деления, идеальными для учета являются двуядерные клетки (прошедшие только одно деление митоза) [12]. Иногда в двуядерных клетках можно наблюдать нуклеоплазменные мосты между ядрами. Они, вероятно, являются следствием того, что дисцентрические хромосомы начинают одновременно расходиться к разным полюсам клетки. Таким образом, мосты в двуядерных клетках являются дополнительным показателем хромосомных нарушений, которые можно учитывать вместе с МЯ [13].

Еще одним широко используемым методом оценки генетических повреждений является метод ДНК-комет («DNA-cometassay»), впервые описанный Ostling и Johansson в 1984 г. [23]. Этот метод является быстрым и весьма чувствительным методом регистрации повреждений ДНК и изучения репарации ДНК на уровне одиночных клеток. Усовершенствования и модификации метода ДНК-комет позволили значительно повысить его чувствительность и расширить сферу применения, однако практически не затронули основные принципы, положенные в его основу [22]. Важной особенностью метода является его способность исследовать поврежденность генома на ранних стадиях нарушения биологической целостности. Он основан на электрофорезе ДНК единичных клеток в постоянном электрическом поле. Наблюдаемый геном представлен в виде электрофоретического следа, длина которого и доля ДНК в нем пропорциональны повреждению ДНК в клетке [7].

Таким образом, на сегодняшний день существует четыре основных, широко используемых подхода при анализе повреждений хромосом у человека: учет ХА, СХО, МЯ и ДНК-комет. Эти методы активно используются при изучении генетических эффектов воздействия окружающей и производственной среды, в том числе и при обследовании рабочих угледобывающей отрасли.

Целью данного обзора стало обобщение наиболее значимых комплексных исследований по повреждению ДНК (с использованием данных методов) у шахтеров.

Методы поиска исследований

Поиск исследований проводился в базах данных PubMed <http://www.sciencedirect.com> с использованием стратегии поиска, принятой в организации Кокрановского Сотрудничества с использованием запросов по темам: chromosomalaberrations, chromosomalaberrations, sisterchromatidexchangesandaberrations, micronucleustestandaberrations и cometassayandaberrations. Кроме того, проводился поиск с использованием данных научной электронной библиотеки <http://elibrary.ru>.

Анализ данных литературы

В результате поиска было найдено 9 статей, написанных на основе результатов цитогенетических исследований шахтеров, работающих в шахтах разных

стран мира (Турция, Германия, Бразилия, Чехия, Венгрия, Колумбия и Чили), и посвященных изучению данной темы. Следует отметить, что наибольшее количество рассматриваемых ниже работ были написаны в Турции. В целом было найдено 4 статьи, посвященные ХА, в 7 работах изучались МЯ, в трех работах рассматривали СХО и в двух исследовали ДНК-кометы. Кроме того, большинство исследований использовали более чем один метод учета повреждений ДНК.

О. Ulker с соавторами (2008) рассматривали профессиональный контакт рабочих с угольной пылью как фактор, существенно влияющий на состояние здоровья человека. Авторы указывают, что при длительном воздействии пыли на организм развивается заболевание пневмокониоз (ПК), представляющий собой хронический воспалительный процесс, сопровождаемый фиброзом легких. Хроническое воспаление создает условия для окислительного стресса и образования свободных радикалов. Взаимодействие активных форм кислорода с ДНК увеличивает вероятность структурных и транскрипционных ошибок. Целью исследования Ulker было изучение генотоксического риска у больных ПК. В качестве маркеров генотоксического риска использовались сестринские хроматидные обмены (СХО) и микроядра (МЯ). Испытания проводились в трех группах: у пациентов с выявленным диагнозом ПК, у работников угольной промышленности (шахтеры) и в контрольной группе. Было выявлено, что частоты СХО и МЯ у больных ПК были значительно выше, чем у шахтеров, работающих непосредственно в угледобывающих шахтах, и выше, чем в контрольной группе. С другой стороны, корреляции между частотой СХО и продолжительностью воздействия негативных производственных факторов не наблюдалось. Также не было корреляций между СХО возрастом во всех изученных группах. Не было выявлено влияния курения на частоту СХО и МЯ во всех группах. На основании этих результатов можно предположить, что развитие ПК приводит к значительной индукции цитогенетических повреждений в лимфоцитах периферической крови больных с ПК [26].

В работе, которую проводил Mustafa Celic (2007), были получены сходные результаты, как и у О. Ulker. В этой работе были проанализированы структурные ХА, полиплоидия, СХО и МЯ у 48 рабочих угольной шахты без учета фактора курения или потребления алкоголя. Результаты сравнивались с контрольной группой из 30 здоровых мужчин, которые не подвергались влиянию негативных факторов. Средние частоты ХА, полиплоидии, СХО и МЯ были значительно выше у работников угольной отрасли, чем в контрольной группе. Корреляционный анализ (по критерию Спирмена) показал значительное увеличение частоты ХА и МЯ в зависимости от стажа работы. Однако, не было выявлено существенного влияния возраста обследованных в обеих группах ($p > 0,05$). Полученные данные показали, что у рабочих, контактирующих с продуктами сжигания угля в течение нескольких лет, в периферических лимфоцитах крови накапливаются абберации хромосом. Эти цитогенетические повреждения могут быть связаны с совокуп-

ным влиянием ряда веществ за счет химической сложности угольной золы и газообразных выбросов, а не конкретного вещества [10].

В работе, представленной Мюллером и другими авторами (2004), изучались МЯ у рабочих урановых шахт Германии. Была проанализирована группа шахтеров с фиброзом легких, в качестве контроля использовалась выборка условно здоровых доноров. Было показано, что частоты МЯ не отличались в этих группах. Однако наблюдались различия при сравнении частот центромер-положительных и центромер-негативных МЯ. Один из результатов заслуживает особого внимания: люди с низким процентом двуядерных лимфоцитов после воздействия *in vitro* цитохалазином демонстрировали более высокую частоту МЯ, чем лица с высоким процентом двуядерных клеток [21].

В работе, которую представил Rohg вместе с другими авторами (2013), рассматривается уголь как важный продукт ископаемого топлива, используемый для получения энергии. Целью исследования было оценить потенциальные генотоксические последствия воздействия угля и окислительного стресса у лиц, которые подверглись воздействию угольной пыли в результате своей работы. Для оценки этих последствий использовались микроядерный тест и анализ ДНК-комет. В исследование было включено 128 мужчин, из которых 71 человек подвергался воздействию угля и 57 использовались в качестве контроля. Группа, подверженная воздействию угольной пыли, имела увеличенный индекс повреждения хромосом и увеличение МЯ по сравнению с контрольной группой. Наблюдались значительные положительные корреляции между частотами МЯ в лимфоцитах крови, как в клетках контрольной группы, так и в клетках рабочей группы. У шахтеров наблюдались более низкие средние уровни тиобарбитуровой кислоты и активности каталазы, в то время как средняя активность супероксиддисмутазы была выше в этой группе. Доказательства того, что воздействие угля и его производных представляет генетическую опасность для организма, свидетельствует о необходимости специальных защитных мер для угольщиков [24].

Zölzer вместе с соавторами (2012) изучали МЯ в лимфоцитах крови у лиц, работающих в урановом руднике Чехии (последний, функционирующий в Европейском Союзе). Модифицированный микроядерный тест (с учетом центромера) был применен для оценки возникновения МЯ в стимулированных лимфоцитах, а также их содержание в пересчете на хромосомы или их фрагменты. По сравнению с группой сравнения, шахтеры имели более высокие частоты МЯ и более высокий процент МЯ без центромера, различия были существенными для обоих параметров ($0,74 \pm 0,60$ для шахтеров, $0,50 \pm 0,42$ для контрольной группы, $p = 0,017$). В целом полученные данные показывают, что микроядерный тест является ценным инструментом для оценки воздействия излучения у шахтеров урановых рудников [27].

В работе, которую представил Donbak с соавторами (2005) изучались СХО, ХА и МЯ в группе рабочих битумной угольной шахты в провинции Зонгулдак (Турция), для исследования генотоксического риска профессионального заболевания в результате

влияния шахтной пыли использовали цитогенетический анализ, а именно СХО, ХА и МЯ. В исследовании принимали участие группы, состоящие из 39 работников, которые подвергались воздействию пыли, и 34 донора, которые не подвергались негативному влиянию пыли (контрольная группа), схожие по возрасту. Курение и возраст считались модулирующими факторами. Частоты СХО и ХА у угольщиков были значительно выше, чем в контрольной группе. Также наблюдалось увеличение частоты МЯ в облученной группе, по сравнению с контрольной группой. Влияние курения на СХО и МЯ было значительным в контрольной группе, но не в экспонированной. Положительная корреляция между возрастом и СХО была найдена в контрольной группе. Частоты СХО и ХА были существенно повышены в результате продолжительного воздействия пыли. Результаты этого исследования показали, что профессиональный контакт с угольной пылью приводит к значительному количеству цитогенетических повреждений в лимфоцитах периферической крови работников, занятых в подземной отрасли добычи угля [11].

Mészáros G совместно с другими авторами (2004) изучали ХА у шахтеров уранового рудника через несколько лет после его закрытия. Частота всех типов хромосомных aberrаций у шахтеров была значительно выше контрольного уровня (у не работавших на шахте лиц). В группе, которая подвергалась воздействию радиации, количество дицентриков было в 7–12 раз выше, чем в контроле. При этом в группе шахтеров, у которых прошло от 8 до 25 лет после прекращения работы на шахте, наблюдалось небольшое снижение частоты дицентриков по сравнению от полученных значений у шахтеров, работающих в настоящее время. Аналогично уменьшилась частота ацентриков, но все равно их частота оставалась в 2–3 раза выше, чем в контрольной группе [19].

León-Mejía G с другими авторами (2011) провели исследование генотоксических эффектов у шахтеров, подвергающихся воздействию угольных отходов в открытых шахтах. Результаты, полученные с помощью МЯ теста, показали, что значения у группы, подверженной воздействию угля ($8,6 \pm 4,8$), были выше, чем в контрольной группе ($2,9 \pm 4,0$). Различия были статистически значимыми по U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,001$). Разницы не было выявлено между группами различных профессий. Не было найдено корреляций между цитогенетическими параметрами и возрастом, потреблением алкоголя и продолжительностью работы. Эти результаты показывают, что воздействие угля горнодобывающих отходов может привести к увеличению генотоксического эффекта у шахтеров угольной отрасли [17].

В работе, представленной Sergio R. Santa Maria с соавторами (2007), была проанализирована частота ХА в лимфоцитах периферической крови подземных горнорабочих шахт Чили: Casapalca ($N = 8$, средний возраст – 45 лет, диапазон – от 36 лет до 55 лет, среднее время работы – 234 месяца) и Bellavista ($n = 8$, средний возраст – 28 лет, диапазон: 23 – 34 лет, среднее время работы – 31,5 месяцев). Эта выборка была подвержена профессиональному облучению тяжелыми металлами, такими как свинец и цинк, а также вы-

бросов органических растворителей и шахтной пыли. Контрольные группы состояли из 8 человек, проживающих в высокогорных районах (средний возраст – 37 лет, диапазон – от 25 до 52 лет) и жителей, проживающих на уровне моря ($n = 14$, средний возраст – 26 лет, диапазон – от 20 до 35 лет). Увеличенное число ХА (1,88 %, $p < 0,05$) было обнаружено в лимфоцитах крови у лиц, работающих в шахте Casaralca, по сравнению с шахтерами из Bellavista (0,5 %, $p < 0,05$), и у группы, использованной в качестве контроля, проживающей на уровне моря (0,07 %, $p < 0,05$). У группы контроля, проживающей в высокогорных районах, аберраций выявлено не было. Эти результаты показывают, что лица, работающие в горнодобывающей промышленности, имеют увеличенные частоты ХА, которые могут быть зависимы как от возраста, так и от времени действия [25].

Заключение

Проведенный анализ данных литературы показал, что профессиональный контакт с пылью и другими факторами в результате горнодобывающей деятельности приводит к значительному увеличению количества цитогенетических повреждений в лимфоцитах

крови шахтеров. Они выявляются разными методами: учетом ХА, СХО, МЯ и ДНК-комет, что свидетельствует о сложной природе возникающих повреждений. Даже после прекращения трудовой деятельности в течение продолжительного времени сохраняется высокий уровень хромосомных нарушений, по сравнению с теми лицами, которые не были подвержены воздействию внешних факторов от добычи полезных ископаемых. В свою очередь это доказывает, что воздействие негативных факторов в результате горных выработок приводит к долговременным генетическим нарушениям, тем самым создавая опасность для организма человека. Это в свою очередь свидетельствует о необходимости разработки защитных мер и профилактических программ для шахтеров, направленных именно на защиту их генома. Это может быть терапия витаминами, антиоксидантами, использование природных и синтетических антимутогенов. В плане профилактики – это выявление особо чувствительных лиц на основе анализа комплекса молекулярно-генетических и цитогенетических характеристик генома и дальнейшая детальная работа с ними специалистов-онкологов, гигиенистов, генетиков.

Литература

1. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб: Н-Л., 2007. 640 с.
2. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н., Катосова Л. Д., Платонова В. И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных аберраций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. 2001. Т. 37. № 4. С. 549 – 557.
3. Бочков Н. П., Шрам Р. Я., Кулешов Н. П., Журков В. С. Система оценки химических веществ на мутагенность для человека: общие принципы, практические рекомендации и дальнейшие разработки // Генетика. 1975. Т. II. № 10. С. 156 – 169.
4. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина, 1989. 170 с.
5. Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. Хромосомы человека. М.: Медицина, 1982. 264 с.
6. Синицкий М. Ю. Использование микроядерного теста для оценки генотоксического воздействия радона на организм человека // Радиэкология XXI века: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Красноярск, 2012. С. 428 – 432.
7. Тронов В. А., Пелевина И. И. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применение метода // Цитология. 1996. Т. 38. № 4/5. С. 71 – 75.
8. Хорошилова Л. С., Табакаева Л. М., Харин Д. В. О профессиональной заболеваемости работников угольной отрасли промышленности Кузбасса // Безопасность труда в промышленности. 2008. № 10.
9. Buckton K. E., Evans H. J. Methods for the Analysis of Human Chromosome Aberrations. 66 Seiten, 25 Abb. und 9 Tab. World Health Organization. Geneva 1973. Preis: 3,60\$, 1,50 £, 12, Sw. fr.
10. Celic M., Donbak L., Unal F., Yuzbasioglu D., Aksoy H., Yilmaz S. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant // Mutation Research 627 (2007). P. 158 – 163.
11. Donbak L., Rencuzogullar E., Yavuz A., Topaktas M. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey // Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2005. 588, 82 – 7.
12. Fenech M., Morley A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay // Cytobios, 1985. № 43. P. 233 – 246.
13. Fenech M. The in vitro micronucleus technique // Mutation Research, 2000. № 455. P. 81 – 95.
14. Finkelman R. B., Orem W., Castranova V., Tatu C. A., Beklin H. E., Zheng B., Lerch H. E., Maharaj S. V. Health impacts of coal and coal use: possible solutions A. L. Bates Int J Coal Geol, 2002. 50. P. 425 – 430.
15. Hamza V. Z., Mohankumar M. N. Cytogenetic damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to radon Mutat. Res. 2009. 661 (1-2): 1-9.
16. Hsu T. C. Genetic instability in the human population: a working hypothesis // Hereditas, 1998. № 4. P. 1 – 9.
17. León-Mejía G., Espitia-Pérez L., Hoyos-Giraldo L. S. Assessment of DNA Damage in Coal Open-Cast Mining Workers Using the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Test and the Comet Assay // Science of the Total Environment, 2011. 409. P. 686 – 691.
18. Liu J., Hutchison K., Perrone-Bizzozero N., Morgan M., Sui J. Identification of Genetic and Epigenetic Marks Involved in Population Structure. 2010.

19. Mészáros G., Bognár G., Köteles G. J. Long-Term Persistence of Chromosome Aberrations in Uranium Miners // *Journal of Occupational Health*, 2004. 46. P. 310 – 315.
20. Mukherjee A. K., Bhattacharya S. K., Saiyed H. N. Assessment of respirable dust and its free silica contents in Different Indian coalmines // *Ind Health*, 2005. 43. P. 277 – 84.
21. Müller W. U., Kryscio A., Streffer C. Micronuclei in lymphocytes of uranium miners of the former Wismut SDAG // *Cytogenet Genome Res*. 2004. 104(1-4): 295 – 8.
22. Olive P. L., Banáth J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006; 1 (1): 23 – 9.
23. Ostling O., Johanson K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 123: 291 – 8.
24. Rohr P., Kvitko K., Silva F. R., Menezes A. P., Porto C., Sarmiento M., Decker N., Reyes J. M., Allgayer Mda C., Furtado T. C., Salvador M., Branco C. J. da Silva Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal // *Mutat Res*. 2013 Dec 12; 758(1-2): 23-8. doi: 10.1016 / j.mrgentox. 2013.08.006. Epub 2013 Sep 1.
25. Sergio R., Maria S., Arana M., Ramirez O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes // *Genetics and Molecular Biology*. 2007. 30. 4. P. 1135 – 1138.
26. Ulker O. C., Ustundag A., Duydu Y., Yucesoy B., Karakaya A. Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey // *Environ Mol Mutagen*. 2008. Apr; 49(3): 232-7 doi: 10.1002/em.20377.
27. Zölzer F., Hon Z., Skalická Z. F., Havránková R., Navrátil L., Rosina J., Škopek J. Micronuclei in lymphocytes from currently active uranium miners // *Radiat Environ Biophys*. 2012 Aug; 51(3): 277-82. doi: 10.1007/s00411-012-0422-0. Epub 2012 May 24.

Информация об авторах:

Кулемин Юрий Евгеньевич – аспирант КемГУ, инженер-технолог ИЭЧ СО РАН, jura.kulemin@gmail.com.

Yuriy E. Kulemin – post-graduate student at the Department of Genetics, Kemerovo State University, engineer at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

Минина Варвара Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики КемГУ, заведующая лабораторией цитогенетики ИЭЧ СО РАН, vminina@mail.ru.

Varvara I. Minina – Candidate of Biology, Assistant Professor at the Department of Genetics, Kemerovo State University; Head of Cytogenetics Laboratory at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

Титов Руслан Александрович – аспирант, инженер-технолог ИЭЧ СО РАН, Ruslan-Tito00@Rambler.ru.

Ruslan A. Titov – post-graduate student, engineer at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

Статья поступила в редколлегию 28 июля 2014 г.