

УДК 613.64: 616.717 – 057

О. В. Долгих^{a,b,c}, А. В. Кривцов^a, К. Г. Старкова^a, Д. В. Ланин^{a,b},
О. А. Бубнова^a, Д. Г. Дианова^a, Е. А. Отавина^a, И. Н. Аликина^{a,b}

^a ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^c Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У РАБОТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ЦИКЛА

Анализ частоты однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) участков кандидатных генов проведен с использованием ПЦР в режиме реального времени с оценкой результатов методом аллельной дискриминации. Установлены SNP-изменения по критерию частоты вариантных аллелей генов 1-й фазы детоксикации, иммунной регуляции, оксидативного стресса и онкогенеза (превышение показателей группы сравнения по каждой группе генов более чем в 2 раза). Оценка иммунного статуса показала, что условия режима труда с ночными сменами способствуют угнетению экспрессии CD16⁺, CD127⁺ (в 1.2–1.5 раза по отношению к группе сравнения), а также активации внутриклеточных транскрипционных белков Bcl-2 и bax (в 1.8 раза по отношению к группе сравнения). Показатели иммунной регуляции (CD127⁺, Bcl-2, bax), а также вариантные аллели кандидатных генов *CYP1A1* (1506C/T), *TP53* (rs17884159), *PPARG* (rs2016520) рекомендуется использовать в качестве маркерных показателей эффекта для принятия решений по снижению воздействия на здоровье вредных условий труда с ночными сменами.

Ключевые слова: непрерывный производственный цикл; полиморфизм гена оксидативного стресса.

O. V. Dolgikh^{a,b,c}, A. V. Krivtsov^a, K. G. Starkova^a, D. V. Lanin^{a,b},
O. A. Bubnova^a, D. G. Dianova^a, E. A. Otavina^a, I. N. Alikina^{a,b}

^a FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

^c Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

FEATURES OF GENETIC AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN THE WORKERS OF CONTINUOUS PRODUCTION CYCLE

The aim of the research was to study the polymorphism of candidate genes in non-ferrous metallurgy workers, operating in night shifts regime. Genetic analysis is carried out using the polymerase chain reaction in real time with the evaluation results by the allelic discrimination. SNP-established violations according to the criterion of occurrence of variant alleles of genes of phase 1 detoxification, neuro-endocrine regulation and oncogenesis (excess performance comparison group for each group of genes in 1.5 times), the functions of carbohydrate and energy metabolism (in excess of the comparison group index of 2.0 times). Evaluation of immune status showed that the mode of work night shifts with conditions promote inhibition of the expression CD16⁺, CD127⁺ (1.2–1.5 times relative to the control group) and transcriptional activation of intracellular proteins Bcl-2 and bax (1.8-fold relative to the control group). Indicators of immune regulation (CD127⁺, Bcl-2, bax), as well as the Candidate alleles of genes *CYP1A1* (1506C/T), *TP53* (rs17884159), *PPARG* (rs2016520) recommended for use as a marker of early indicators of health problems when working night shifts.

Key words: continuous production cycle; gene polymorphism of carbohydrate and energy metabolism.

Идентификация иммунных и иммуногенетических маркеров шумовой и химической производственной факторной нагрузки особенно актуальна для работающих в условиях непрерывного произ-

водственного цикла, условия которого затрудняют формирование физиологических адаптационных процессов.

Восприимчивость организма к воздействию

вредных производственных факторов в значительной мере зависит от особенностей генетических ассоциаций, определяющих активность ферментов системы детоксикации ксенобиотиков и состояния компонентов иммунного ответа [Gleichmann et. al., 1989; Falchetti et. al., 2001; Измеров, 2006; Зайцева, Долгих, Дианова, 2011; Dolgikh et. al., 2013]. Актуальным на сегодняшний день является выделение маркерных иммунологических и генетических показателей, которые могут быть использованы в качестве ранних маркеров нарушений здоровья работающих [Зайцева, Долгих, Дианова, 2011; Долгих и др., 2012; Долгих, Предеина, Дианова, 2014; Горшкова и др., 2014].

Цель работы – оценка особенностей маркерных иммунологических и генетических показателей, характеризующих эффекты со стороны здоровья у работников в условиях режима труда с ночными сменами.

Материалы и методы

В основную группу были включены работники предприятия цветной металлургии, режим труда которых – с ночными сменами (группа наблюдения), группу сравнения составили те, кто работают без ночных смен (группа сравнения). Профессиональный состав работников группы наблюдения (21 человек, все мужчины) представлен следующими основными специальностями: плавильщик, прокальщик, разлищик цветных металлов и сплавов, хлораторщик, электролизник расплавленных солей. Средний возраст работников группы наблюдения составил 35.29 ± 4.1 года, средний стаж 10.24 ± 3.12 . Группа сравнения (28 человек, все мужчины): разлищик цветных металлов и сплавов, электромонтёр по ремонту и обслуживанию электрооборудования. Средний возраст работников группы сравнения составил 37.86 ± 3.34 года, средний стаж: 13.82 ± 3.19 . Группы были сопоставимы по этническому составу и значимо не отличались по возрасту и стажу работы.

С целью идентификации опасности в производственном процессе были использованы результаты проводимого производственного контроля на рабочих местах, результаты специальной оценки условий труда (аттестации рабочих мест). Изучение состояния здоровья осуществлялось в рамках углубленного медицинского осмотра.

Обследование выполнено в соответствии с соблюдением этических норм, изложенных в пересмотренной версии Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 2008 г. Все участники были информированы о возможных изменениях состояния здоровья, связанных с работой и подписали информированное согласие.

Изучение маркеров клеточной дифференцировки методом проточной цитометрии – определение

популяций и субпопуляций лимфоцитов ($CD16^+56^+$, $CD127^-$, bax, bcl2, TNFR) на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuestPro.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Office и программы «Statistica 6.0» и включала в себя описательную статистику и двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента. Различия между группами считались значимыми при $p < 0.05$.

Забор материала для ПЦР проводился методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Затем проводили выделение ДНК с помощью сорбентного метода, в основе которого лежит разрушение клеток с дальнейшей сорбцией нуклеиновых кислот на сорбент.

Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику ПЦР, в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени с помощью флуоресцентных меток, которыми предварительно помечают используемые для реакции амплификации праймеры. Для одновременной детекции нескольких продуктов реакции используют разные флуоресцентные метки и зонды (мультиплексная ПЦР). Проведено изучение полиморфизма генов *CYP1A1* (*1506C/T*), системы генов пироксисом *PPARG* (*rs2016520*), транскрипционного фактора *TP53* (*rs17884159*). Для определения генотипа человека использовали метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров. Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт». Данная программа служит для расчета статистических параметров исследований "случай-контроль", использующих SNP (однонуклеотидные полиморфизмы).

Результаты и их анализ

По результатам проведенной на предприятии аттестации рабочих мест, условия труда на рабочих местах группы наблюдения, согласно Руководству Р 2.2.2006-05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда», оценены как вредные: класс условий труда 3.1–3.3 (химический фактор, шум). При анализе результатов аттестации рабочих мест установлено, что условия труда работников группы наблюдения и группы сравнения схожи, отличие заключается лишь в различных режимах труда. У работников группы наблюдения режим труда с ночными сме-

нами, а у работников группы сравнения – отсутствие ночных смен.

У обследованных работающих установлены

изменения клеточного звена иммунного ответа (табл. 1).

Таблица 1

Результаты сравнительного анализа показателей иммунной регуляции у работников предприятия цветной металлургии в условиях непрерывного производственного цикла

Показатель	Среднее значение (M±m)	
	группа наблюдения	группа сравнения
Vax, %	9.555±1.211*	5.462±2.178
Bcl-2, %	5.33±1.11*	3.057±1.083
TNFR, %	0.888±0.057	0.96±0.05
p53, %	0.865±0.129	0.978±0.102
CD127 ⁻ – лимфоциты, абс., 10 ⁹ /дм ³	0.002±0.001*	0,006±0.001
CD127 ⁻ – лимфоциты, отн., %	1.016±0.203*	1.584±0.101
CD16 ⁺ 56 ⁺ – лимфоциты, абс., 10 ⁹ /дм ³	0.37±0.068	0.471±0.158
CD16 ⁺ 56 ⁺ – лимфоциты, отн., %	18.625±2.26	22.0±1.269

Примечание. * – разница достоверна относительно группы сравнения ($p < 0.05$).

Наблюдаются достоверные отклонения показателей CD-иммунограммы в сравнении с референтным уровнем в виде сниженного абсолютного и относительного количества регуляторных T-лимфоцитов CD127⁻ (у 100% работающих).

Установлены достоверные различия в величине апоптогенных факторов, внутриклеточно контролирующей процедуру клеточной гибели. Так, в сравнении с контрольной группой в 1.7 раза повышены значения антиапоптотического фактора Bcl-2, и одновременно наблюдается повышенная экспрессия митохондриально ассоциированного белка bax в 1.8 раза по отношению к группе контроля ($p < 0.05$).

Данные, полученные в условиях непрерывного производственного цикла при режиме труда с ночными сменами, свидетельствуют о существовании хронической антигенной супрессии у лиц группы

наблюдения, которая способствует перестройке рецепторов иммунокомпетентных клеток, повышая их уязвимость. Причем, данный процесс протекает с признаками угнетения T-клеточных фенотипов CD16⁺ CD56⁺, CD127⁻.

Таким образом, для исследуемых условий режима труда с ночными сменами характерны нарушения иммунного статуса (снижение клеточного звена иммунитета), сопровождающиеся дисбалансом, ассоциированным с угнетением клеточной регуляции (достоверное снижение количества регуляторных клеток) и замедлением апоптоза (снижение количества транскрипционного онкосупрессорного фактора и повышении антиапоптотического внутриклеточного белка).

В табл. 2 представлены результаты генетического анализа полиморфизма генов детоксикации, оксидативного стресса и онкогенеза.

Таблица 2

Особенности генетического полиморфизма у работников предприятия цветной металлургии в условиях непрерывного производственного цикла

Ген	Генотип/аллель	Группа наблюдения, %	Группа сравнения, %
CYP1A1 (1506C/T)	AA	81	92
	GA	19	8
	GG	0	0
	A	90	96
	G	10*	4
TP53 (rs17884159)	CC	86	98
	CT	14	2
	TT	0	0
	C	93	99
	T	7*	1
PPARG (rs2016520)	CC	43	75
	GC	47	25
	GG	10	0
	C	67	88
	G	33*	12

Примечание. * – разница достоверна относительно группы сравнения ($p < 0.05$).

Генотипы работников группы наблюдения характеризовались достоверным преобладанием вариантного аллеля по отношению к показателям ра-

ботников группы сравнения ($p < 0.05$; OR=1.5–3.7) по следующим полиморфизмам генов: цитохрома CYP1A1 (1506C/T), транскрипционного фактора

TP53 (rs17884159), гена рецептора пролифератора пироксисом *PPARG (rs2016520)*, отвечающих за детоксикацию, оксидативный стресс, а также карциногенез, как за счет гетерозиготного, так и за счет гомозиготного вариантного генотипов.

Наблюдаемые особенности полиморфных изменений генов создают неблагоприятный фон для развития нарушений адаптационных процессов, реализующихся в условиях режима труда с ночными сменами.

Заключение

По результатам проведенного иммунологического и генетического исследования у работников предприятия цветной металлургии в условиях непрерывного производственного цикла при режиме труда с ночными сменами выявлены существенные нарушения клеточного звена иммунитета, которые характеризовались достоверным угнетением Т-клеточных фенотипов CD127⁻, CD16⁺, повышением уровня апоптогенных факторов (Bcl-2 и bax). Результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения по критерию частоты вариантного аллеля генов 1 фазы детоксикации, оксидативного стресса, онкогенеза. Показатели иммунной регуляции (CD127⁻, Bcl-2, bax), а также аллели кандидатных генов *CYP1A1 (1506C/T)*, *TP53 (rs17884159)*, *PPARG (rs2016520)* рекомендуется использовать в качестве маркерных показателей ранних нарушений здоровья в условиях непрерывного производственного цикла.

Библиографический список

- Горшкова К.Г. и др. Иммунологические и генетические маркеры внешнесредовой экспозиции стронцием // Санитарный врач. 2014. № 3. С. 72–74.
- Долгих О.В. и др. Иммунологические и генетические маркеры воздействия ароматических углеводородов на работающих // Медицина труда и промышленная экология. 2012. № 12. С. 30–33.
- Долгих О.В., Предеина Р.А., Дианова Д.Г. Экспериментальная оценка влияния фенолов на иммунорегуляцию *ex vivo* // Анализ риска здоровья. 2014. № 1. С. 73–81.
- Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Маркеры иммунного статуса у аппаратчиков, занятых на производстве активированных углей // Пермский медицинский журнал. 2011. Т. 28, № 5. С. 70–74.
- Зайцева Н.В., Долгих О.В. Особенности клеточного звена иммунитета у детей в условиях внешнесредовой экспозиции толуолом, формальдегидом, фенолом // Известия Самарского научного

центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, № 5(2). С. 341–343.

- Измеров Н.Ф. Профессиональный отбор в медицине труда // Медицина труда и промышленная экология. 2006. № 3. С. 1–5.
- Dolgikh O.V. et. al. State of cell regulation in children exposed to phenols // Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies». 2013. P. 149–152.
- Falchetti R. et. al. Effects of resveratrol on human immune cell function // Life Sci. 2001. Vol. 70, 1. P. 81–96.
- Gleichmann E. et. al. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system // Arch. Toxicology. 1989. № 63. P. 257–273.

References

- Gorshkova K.G., Bubnova O.A., Maerova E.D., Dolgikh O.V. [Immunological and genetic markers of environmental exposure strontium]. *Sanitarnyj vrach*, N 3 (2014): pp. 72–74. (In Russ.).
- Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Gugovich A.M. et al. [Immunologic and genetic markers of exposure to aromatic hydrocarbons in workers]. *Medicina truda i promyshlennaja ekologija*, N 12 (2012): pp. 30–33. (In Russ.).
- Dolgikh O.V., Predeina R.A., Dianova D.G. [Experimental assessment of phenol influence on immunoregulation *ex vivo*]. *Analiz riska zdorov'ju*, N 1 (2014): pp. 73–81. (In Russ.).
- Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. [Immune markers in operator of activated carbon production]. *Permskij medicinskij zhurnal*, V. 28, N 5 (2011): pp. 70–74. (In Russ.).
- Zaitseva N.V., Dolgikh O.V. [Features of children's cellular immunity in conditions of environmental exposure by toluene, formaldehyde, phenol]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra RAN*, V. 14, N 5 (2) (2012): pp. 341–343. (In Russ.).
- Izmerov N.F. [Professional selection in occupational medicine]. *Medicina truda i promyshlennaja ekologija*, N 3 (2006): pp. 1–5. (In Russ.).
- Dolgikh O.V., Kharakhorina R.A., Dianova D.G., Gugovich A.M. State of cell regulation in children exposed to phenols. In: Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies». 2013. P. 149–152.
- Falchetti R. et. al. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci*. V. 70, 1 (2001): pp. 81–96.
- Gleichmann E. et. al. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. *Arch. Toxicology*, N 63 (1989): pp. 257–273.

Об авторах

Долгих Олег Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0003-4860-3145

профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

профессор кафедры охраны окружающей среды
ФГБОУВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Кривцов Александр Владимирович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0001-7986-0326
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82,
krivtsov@fcrisk.ru; (342)2363930

Старкова Ксения Геннадьевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и аллергологии
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0002-5162-9234
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Ланин Дмитрий Владимирович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0002-1557-0589

профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
dlan@mail.ru; (342)2363930

Бубнова Ольга Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики; аспирант
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0002-0114-3930
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Дианова Дина Гумеровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики

About the authors

Dolgikh Oleg Vladimirovich, doctor of medical sciences, head of the Department of immunobiological diagnostic methods
FBFSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0003-4860-3145

professor of the Department of human ecology and life safety
Perm State University

professor of the Department of environmental protection
Perm National Research Polytechnic University
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Krivtsov Aleksandr Vladimirovich, candidate of medical sciences, head of the laboratory of immunogenetics
FBFSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0001-7986-0326
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
krivtsov @fcrisk.ru; (342)2363930

Starkova Ksenia Gennadiyevna, candidate of medical sciences head of the laboratory of immunology and allergology
FBFSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0002-5162-9234
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Lanin Dmitri Vladimirovich, doctor of medical sciences, leading researcher of the Department of immunobiological diagnostic methods
FBFSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0002-1557-0589

professor of the Department of human ecology and life safety
Perm State University
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
dlan@mail.ru; (342)2363930

Bubnova Olga Alekseevna, junior researcher of the laboratory of immunogenetics; graduate student
FBFSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0002-0114-3930
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Dianova Dina Gumerovna, candidate of medical sciences, senior researcher at the Laboratory of cellular diagnostic methods

ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0002-0170-1824
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
dianovadina@rambler.ru; (342)2363930

Отавина Елена Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики; аспирант
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0002-6173-6017
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Аликина Инга Николаевна, лаборант-исследователь лаборатории иммуногенетики
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
ORCID: 0000-0002-2057-9828
магистрант биологического факультета
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

FBSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0002-0170-1824
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
dianovadina@rambler.ru; (342)2363930

Otavina Elena Alekseevna, junior researcher of the laboratory of immunogenetics; graduate student
FBSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0002-6173-6017
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

Alikina Inga Nicolaevna, clinical research assistant of the laboratory of immunogenetics
FBSI «FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»
ORCID: 0000-0002-2057-9828
undergraduate of biological faculty
Perm State University
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045;
oleg@fcrisk.ru; (342)2363930

