

УДК 613.64: 616.717 – 057

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ЭФФЕКТА У РАБОТНИКОВ КАЛИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РИСКА

О.В. Долгих^{1,2}, А.В. Кривцов¹, К.Г. Горшкова¹, Д.В. Ланин^{1,2},
О.А. Бубнова^{1,2}, Д.Г. Дианова¹, Т.С. Лыхина¹, Н.А. Вдовина¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Россия, 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Проведена оценка иммунологических и генетических маркеров у работников калийного производства. Показано, что в условиях комбинированного воздействия вредных производственных факторов (пыль сильвинита, шум) наблюдалась повышенная продукция маркеров иммунной цитокиновой регуляции: фактора некроза опухоли (TNF α) и васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), а также измененный полиморфизм кодирующих их участков генов в виде повышенной распространенности вариантных аллелей генов за счет минорного гомозиготного (VEGF) и гетерозиготного (TNF α) генотипов. Полиморфизм генов детоксикации CYP1A1, CYP2D6 характеризует специфические различия с группой сравнения. Рекомендованы гены TNF α , VEGF, CYP1A1, CYP2D6 в качестве маркеров чувствительности, а кодируемые ими цитокины (фактор некроза опухоли и эндотелиальный фактор роста) – в качестве маркеров эффекта при оценке риска здоровью работников калийного производства.

Ключевые слова: пыль сильвинита, шум, полиморфизм генов, маркеры.

К числу важнейших направлений в исследовании адаптационных процессов при воздействии негативных производственных факторов относят изучение показателей состояния иммунологических и генетически опосредованных механизмов защиты организма работающих [1, 2, 4–8, 10]. Поскольку отклонения в общей иммунологической реактивности могут проявиться даже при относительно низких уровнях воздействия

© Долгих О.В., Кривцов А.В., Горшкова К.Г., Ланин Д.В., Бубнова О.А., Дианова Д.Г., Лыхина Т.С., Вдовина Н.А., 2014

Долгих Олег Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

Кривцов Александр Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики (e-mail: krivtsov@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

Горшкова Ксения Геннадьевна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

Ланин Дмитрий Владимирович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики, доцент кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

Бубнова Ольга Алексеевна – младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики, студентка магистратуры биологического факультета (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

Дианова Дина Гумеровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики (e-mail: dianovadina@gambler.ru; тел. (342) 236-39-30).

Лыхина Татьяна Станиславовна – заведующий лабораторией иммунологии и аллергологии (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

Вдовина Надежда Алексеевна – младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел. (342) 236-39-30).

комбинации физических (шум) и химических (аэрозоли) вредных производственных факторов, особенно актуальной является задача своевременного выявления ранних маркеров возникающих патологических изменений [3, 9].

Цель работы – определить маркерные показатели нарушений иммунной и иммуногенетической регуляции у работников калийного производства.

Материалы и методы. Группу наблюдения в условиях комбинированного воздействия вредных производственных факторов (пыль сильвинита, шум) составили 184 работника калийной горнорудной промышленности – мужчины, машинисты горных выемочных машин, средний возраст $36,6 \pm 1,0$ г., средний стаж $7,3 \pm 0,9$ г. На работников основной группы воздействует целый ряд опасных и вредных производственных факторов (как физических, прежде всего, шум, так и химических – запыленность воздуха сильвинитовой пылью). Условия труда отнесены к вредным с отклонением от гигиенических нормативов 3-й степени 3-го класса (3.3 согласно Р 2.2.2006 – 05). Группу сравнения составили 55 работников – мужчины, занятые профессиональной деятельностью на поверхности при отсутствии изучаемых вредных факторов, средний возраст – $40,2 \pm 2,7$ г., средний стаж – $5,8 \pm 1,9$ г. Группы были сопоставимы по возрасту, полу и стажу.

Исследовали следующие параметры иммунной системы: содержание сывороточных иммуноглобулинов методом радикальной иммунодиффузии по Манчини, показатели фагоцитарной активности при использовании в качестве объектов фагоцитоза формализированных эритроцитов барана, маркеры межклеточной иммунной регуляции (фактор некроза опухоли и эритропоэтин), а также маркер эндотелиальной дисфункции – васкулярный эндотелиальный фактор роста методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем. Статистический анализ проводили с помощью описательной статистики и двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента.

Достоверность различий между группами считали значимой при $p < 0,05$.

Забор материала для ПЦР осуществлялся 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 флюоресцентных меток, которыми предварительно помечают используемые для реакции амплификации праймеры. Амплификацию и детекцию осуществляли с помощью термоциклера CFX96, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанные в литературе.

Для одновременной детекции нескольких продуктов реакции используют разные флюоресцентные метки и зонды (мультиплексная ПЦР). В качестве праймеров применяли участок ДНК генов цитохрома P-450 CYP1A1, копропорфириногенаксидазы (CPOX), фактора некроза опухоли (TNF α), васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), eNOS(G894T), APOE согласно методическим рекомендациям «Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов» (МР 4.2.0075-13 от 20.08.2013).

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 для исследований «случай–контроль», использующих SNP (диагностику однонуклеотидных полимор-

физмов). Применялись статистические методы для описания равновесия частот генотипов и аллелей генов по равновесию Харди-Вайнберга.

Результаты и их обсуждение. По клинико-лабораторным исследованиям состояния здоровья работающих выявлены функциональные нарушения со стороны иммунной системы (табл. 1). В группе обследованных наблюдались достоверные изменения со стороны врожденного звена клеточного иммунного ответа по сравнению с показателями физиологической нормы. В 27,3 % слу-

чаев выявлено угнетение фагоцитарных показателей иммунитета по критерию «абсолютный фагоцитоз», у 62,9 % – по критерию «процент фагоцитоза», у 76,5 % – по критерию «фагоцитарное число» ($p < 0,05$).

Сравнительная характеристика фагоцитарного звена с аналогичными показателями группы контроля также обнаружила достоверное снижение показателей фагоцитоза – абсолютного и относительного количества фагоцитов и фагоцитарного числа у 72,7; 70,5 и 67,4 % обследованных соответственно ($p < 0,05$).

Таблица 1

Показатели иммунного статуса работников калийного производства и маркеры эффекта

Показатель	Группа сравнения ($n = 53$)	Группа наблюдения ($n = 132$)
Абсолютный фагоцитоз, $10^9/\text{дм}^3$	$1,892 \pm 0,296$	$1,417 \pm 0,122^*$
Процент фагоцитоза, %	$43,189 \pm 4,359$	$33,114 \pm 2,001^*$
Фагоцитарное число, усл. ед.	$0,733 \pm 0,088$	$0,605 \pm 0,052^*$
Фагоцитарный индекс, усл. ед.	$1,668 \pm 0,062$	$1,773 \pm 0,046$
IgG, г/дм ³	$11,016 \pm 0,519$	$11,365 \pm 0,332$
IgM, г/дм ³	$1,392 \pm 0,086$	$1,258 \pm 0,061^*$
IgA, г/дм ³	$2,327 \pm 0,173$	$2,296 \pm 0,104$
<i>Маркеры эффекта</i>		
Васкулярный эндотелиальный фактор роста, пг/см ³	$298,464 \pm 65,881$	$308,909 \pm 40,309$
Фактор некроза опухолей, пг/см ³	$0,783 \pm 0,18$	$1,773 \pm 0,161^*$
Эритропоэтин, мМЕ/см ³	–	$19,891 \pm 5,429$

Примечание: * – разница достоверна по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$).

Одновременно установлены достоверные разнонаправленные изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G с преимущественным дефицитом IgM и IgG (у 88,5 и 51,1 % проб) и гиперпродукцией IgA (у 87 % проб) по сравнению с референтным диапазоном. В то же время показано достоверное снижение уровня IgM относительно показателей в группе сравнения ($p < 0,05$).

Уровень проапоптотического цитокина фактора некроза опухоли находился в пределах физиологической нормы, но был достоверно выше в 1,9 раза значений в группе сравнения ($p < 0,05$). Содержание эритропоэтина соответствовало референтным показателям, хотя превышение отмечено у 13,3 % работающих, достоверных отличий выявить не удалось. Маркер состояния эндотелия – васкулярный эндотелиальный фактор роста достоверно отклонялся от

возрастной нормы по критерию кратности превышения при отсутствии значимых различий с группой сравнения.

Анализ результатов изучения полиморфизма генов цитохром-450 (CYP1A1), CPOX, VEGF, eNO-синтаза, TNF α , eNOS, APO позволил установить, что аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ и апоптоз (TNF α), характеризуется повышенной распространенностью минорного аллеля (в 2 раза) по сравнению с уровнем группы сравнения, прежде всего за счет гетерозиготного генотипа (табл. 2).

Полиморфизм гена VEGF отличался от такового в группе сравнения преимущественной распространенностью гена в мутантном гомозиготном состоянии. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции (eNO-синтаза) был сопоставим в анализируемых группах.

Таблица 2
Распределение частот генов – маркеров чувствительности у работающих на калийном производстве

Генотип/аллель/маркер чувствительности	Группа наблюдения, n = 184	Группа сравнения, n = 55
VEGF	GG	52
	GC	37
	CC	11
	G	70
	C	30
cyp1A1(2) (A4889G)	AA	88
	AG	10
	GG	2
	A	93
	G	7
TNF α	GG	78
	GA	21
	AA	1
	G	89
	A	11
eNOS(G894T)	GG	57
	GT	35
	TT	8
	G	75
	T	25
CPOX	AA	64
	AC	32
	CC	4
	A	80
	C	20
APOE (Cys130Arg)	TT	75
	TC	24
	CC	1
	T	87
	C	13

Полиморфизм генов детоксикации CYP1A1, CPOX характеризует специфиче-

ские различия между анализируемыми группами. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1-ю фазу детоксикации органических токсикантов превышает показатель группы сравнения за счет гомо- и гетерозиготного генотипа.

Выводы:

1. У работников калийного производства установлены достоверные по отношению к физиологической норме и показателям группы сравнения существенные изменения в иммунной системе, характеризующиеся снижением активности фагоцитоза и гиперпродукцией маркеров цитокиновой регуляции: фактора некроза опухоли (TNF α) и васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), а также измененный полиморфизм кодирующих их участков генов в виде повышенной распространенности вариантных аллелей генов за счет минорного гомозиготного (VEGF) и гетерозиготного (TNF α) генотипов. Установленный измененный полиморфизм генов детоксикации CYP1A1, CPOX характеризует специфические различия с группой сравнения.

2. Полученные данные позволяют рекомендовать выявленные негативные генетические ассоциации (гены TNF α , VEGF, CYP1A1, CPOX) в качестве маркеров чувствительности, а кодируемые ими цитокины (фактор некроза опухоли и эндотелиальный фактор роста) – в качестве маркеров эффекта при оценке риска здоровью работающих на калийном производстве.

Список литературы

1. Долгих О.В., Предеина Р.А., Дианова Д.Г. Экспериментальная оценка влияния фенолов на иммунорегуляцию *ex vivo* // Анализ риска здоровью. – 2014. – № 1. – С. 73–81.
2. 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.
3. Измеров Н.Ф. Профессиональный отбор в медицине // Медицина труда и промышленная экология. – 2006. – № 3. – С. 1–5.
4. Иммунологические и генетические маркеры воздействия ароматических углеводородов на работающих / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, А.М. Гугович, Р.А. Харахорина, Д.В. Ланин, Т.С. Лыхина, М.А. Сафонова // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – № 12. – С. 30–33.
5. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity / K. Krzystyniak [et. al.] // Environ Health Perspect. – 1995. – Vol. 103, suppl 9. – P. 17–22.
6. Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate / C.S. Newby [et. al.] // Journal of Investigative Dermatology. – 2000. – Vol. 115. – P. 292–298.

7. Effects of resveratrol on human immune cell function / R. Falchetti [et. al.] // *Life Sci.* – 2001. – Vol. 70, № 1. – P. 81–96.
8. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system / E. Gleichmann [et. al.] // *Arch. Toxicology.* – 1989. – № 63. – P. 257–273.
9. Influence of air pollution on humoral immune response / R. Stiller-Winkler [et. al.] // *J. Clin. Epidemiol.* – 1996. – Vol. 49(5). – P. 527–534.
10. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa / P.G. Gervasi, V. Longo, F. Naldi, G. Panattoni, F. Ursino // *Biochem Pharmacol.* – 1991. – Vol. 41. – P. 177–184.

References

1. Dolgih O.V., Predeina R.A., Dianova D.G. Jeksperimental'naja ocenka vlijanija fenolov na immunoreguljaciju ex vivo [Experimental evaluation of phenols' impact on immunoregulation ex vivo]. *Analiz riska zdorov'ju*, 2014, no. 1, pp. 73–81.
2. Zajceva N.V., Dolgih O.V., Dianova D.G. Markery immunnogo statusa u apparatchikov, zanjatyh na proizvodstve aktivirovannyh uglej [Immune status markers in operators engaged in the activated carbons' production]. *Permskij medicinskij zhurnal*, 2011, no. 5, vol. 28, pp. 70–74.
3. Izmerov N.F. Professional'nyj otbor v medicine truda [Professional selection in occupational medicine]. *Medicina truda i promyshlennaja jekologija*, 2006, no. 3, pp. 1–5.
4. Dolgih O.V., Krivcov A.V., Gugovich A.M., Harahorina R.A., Lanin D.V., Lyhina T.S., Safonova M.A. Immunologicheskie i geneticheskie markery vozdejstvija aromaticeskikh uglevodorodov na rabotajushhih [Immunological and genetic markers of exposure to aromatic hydrocarbons on workers]. *Medicina truda i promyshlennaja jekologija*, 2012, no. 12, pp. 30–33.
5. Krzystyniak K. et al. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environ Health Perspect*, 1995, vol. 103, suppl. 9, pp. 17–22.
6. Newby C.S. et al. Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Investigative Dermatology*, 2000, vol. 115, pp. 292–298.
7. Falchetti R. et al. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci.*, 2001, vol. 70, no. 1, pp. 81–96.
8. Gleichmann E. et al. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. *Arch. Toxicology*, 1989, no. 63, pp. 257–273.
9. Stiller-Winkler R. Influence of air pollution on humoral immune response. *J Clin Epidemiol*, 1996, vol. 49(5), pp. 527–534.
10. Gervasi P.G., Longo V., Naldi F., Panattoni G., Ursino F. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. *Biochem Pharmacol.*, 1991, vol. 41, pp. 177–184.

GENETIC AND IMMUNOLOGICAL MARKERS OF SENSITIVITY AND EFFECT IN POTASH PRODUCTION WORKERS IN THE TERMS OF COMBINED RISK FACTORS' IMPACT

**O.V. Dolgikh^{1,2}, A.V. Kryvtsov¹, K.G. Gorshkova¹, D.V. Lanin^{1,2},
O.A. Bubnova^{1,2}, D.G. Dianova¹, T.S. Lykhina¹, N.A. Vdovina¹**

¹FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk

Management Technologies", Russian Federation, Perm, 82, Monastyrskaya St., 614045

²FSBEI HPE "Perm State National Research University", Russian Federation, Perm, 15, Bukireva St., 614990

The evaluation of immunological and genetic markers in potash production workers has been performed. It was shown that under the combined impact of harmful factors (sylvite dust, noise) increased production of immune cytokine regulation markers was observed: tumor necrosis factor (TNF α) and vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as a modified coding polymorphism of gene regions in the form of increased prevalence of variant alleles at the expense of minor homozygous (VEGF) and heterozygous (TNF α) genotypes. Detoxification genes' polymorphism CYP1A1, CPOX characterizes the specific differences with the comparison group. Genes TNF α , VEGF, CYP1A1, CPOX are recommended as markers for susceptibility testing, and their encoded cytokines (tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor) as markers of effect in assessing health risk in potash production workers.

Key words: sylvite dust, noise, gene polymorphism, markers.

© Dolgikh O.V., Kryvtsov A.V., Gorshkova K.G., Lanin D.V., Bubnova O.A., Dianova D.G.,

Lykhina T.S., Vdovina N.A., 2014

Dolgikh Oleg Vladimirovich – Doctor of Medicine, Professor, Head of Immunobiological Diagnostic Methods Department, Professor of Human Ecology and Life Safety Department (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel. (342) 236-39-30).

Kryvtsov Aleksandr – Candidate of Medicine, Head of Immunogenetics Laboratory (e-mail: krivtsov@fcrisk.ru; tel. (342) 236-39-30).

Gorshkova Ksenia Gennadievna – Candidate of Medicine, Research Fellow, Immunobiological Diagnostic Methods Department (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel. 8 (342) 236-39-30).

Lanin Dmitry Vladimirovich – Candidate of Medicine, Senior Research Fellow, Immunobiological Diagnostic Methods Department, Associate Professor, Department of Human Ecology and Life (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel. 8 (342) 236-39-30).

Bubnova Olga Alekseevna – Junior Researcher, Immunobiological Diagnostic Methods Department, Master Student of Biological Faculty (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel. 8 (342) 236-39-30).

Dianova Dina Gumerovna – Candidate of Medicine, Senior Researcher in the Laboratory of Cellular Diagnostic Methods (e-mail: dianovadina@rambler.ru; tel. (342) 236-39-30).

Lykhina Tatyana Stanislavovna – Head of the Immunology and Allergology Laboratory (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel. 8 (342) 236-39-30).

Vdovina Nadezhda Alekseevna – Junior Researcher, Immunobiological Diagnostic Methods Department (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel. (342) 236-39-30).