

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ В ОЦЕНКЕ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ У РАБОЧИХ РАЗЛИЧНЫХ ПРОФЕССИЙ НА НЕФТЕПРОМЫСЛАХ СЕВЕРА СИБИРИ

Сибирский государственный медицинский университет, Томск
Siberian State Medical University, Tomsk



ИЛЬИНСКИХ Николай Николаевич

Заведующий кафедрой биологии и генетики, доктор биологических наук, профессор, e-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

ILYINSKIKH Nikolay

PhD, Biol. Sc.D., Professor, Head of the Department of Biology and Genetics, e-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

ИЛЬИНСКИХ Екатерина Николаевна

Профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, доктор медицинских наук, e-mail: ilyinskikh@yandex.ru

ILYINSKIKH Ekaterina

PhD, Med. Sc.D., Professor of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, e-mail: ilyinskikh@yandex.ru

САУШКИН Станислав Александрович

Аспирант кафедры биологии и генетики, e-mail: stas1402@mail.ru

SAUSKIN Stanislav

Postgraduate student, the Department of Biology and Genetics, e-mail: stas1402@mail.ru

Ключевые слова: микроядерный тест, буккальный эпителий, гены биотрансформации ксенобиотиков, *GSTM1*, *GSTT1*, нефтепромыслы севера Сибири, профессии рабочих-нефтяников.

Аннотация. У рабочих нефтепромыслов (машинистов, операторов и дефектоскопистов) севера Сибири при наличии в генотипе нулевых (делетированных) аллелей *GSTM1(0)* и *GSTT1(0)* значительно возрастает число клеток с микроядрами в буккальном эпителии полости рта. При наличии генотипа *GSTM1(+)/GSTT1(+)* цитогенетических изменений в клетках эпителия не зарегистрировано.

THE USE OF GENETIC CRITERION IN EVALUATING OF ADAPTATION ABILITIES TO THE EXTREME CONDITIONS IN WORKERS OF DIFFERENT PROFESSIONS OF OIL FIELDS OF THE NORTHERN SIBERIA

Keywords: micronucleus test, buccal cells, genes of xenobiotic biotransformation, *GSTM1*, *GSTT1*, oil fields of the northern Siberia, professions of oil-industry workers.

Abstract. Oil-industry workers (machinists, operators and nondestructive testing inspectors) of oil fields in the northern Siberia who had double null genotype (deleted) alleles (*GSTM1(0)* and *GSTT1(0)*) demonstrated significantly increases in the frequency of micronucleated buccal cells in the oral cavity as compared with the control group. Moreover there were no significant increases in the frequency of micronucleated buccal cells in a group of the workers with the *GSTM1(+)/GSTT1(+)* genotype. The increased levels of cytogenetic damages detected among the oil-industry workers were apparently induced by the effects of various factors on the human genome. Thus it was not only the effects of mutagenic oil components, but also a wide range of factors, both natural and anthropogenic origin, which were specific to the northern Siberia.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РГНФ № 15-06-10190 и 13-06-00709

Актуальность исследования. Добыча нефти на севере Сибири, основа благосостояния нашей страны, проходит в крайне неблагоприятных климатических условиях. На нефтепромыслах применяется вахтовый режим труда. Рабочие-вахтовики, прибывающие зачастую из отдаленных регионов страны, не всегда могут адаптироваться к экстремальным условиям работы. Исследования, проведенные нами ранее, показали [7], что у некоторых рабочих-нефтяников, работающих на нефтепромыслах севера Сибири, значительно повышен уровень клеток с цитогенетическими нарушениями. Имеются неоспоримые данные, свидетельствующие о том, что нефть и его дериваты обладает генотоксическим действием [5, 10, 12, 19, 20, 25]. Установлено, что ферменты глутатион-S-трансферазы могут значительно снизить мутагенное влияние ксенобиотиков на генетический аппарат человека [4]. Особое внимание в этой связи обращено на гены GSTM1 и GSTT1 [3, 4, 24]. Отмечен полиморфизм людей по этим генам в мутагенной чувствительности к нефти и нефтепродуктам [4, 20]. Повышение в организме числа цитогенетически измененных клеток – неблагоприятный прогностический признак, и это следует учитывать при профессиональном отборе рабочих в процессе медицинского освидетельствования рабочих-нефтяников.

Цель исследования – изучить у рабочих различных профессий, работающих на нефтепромыслах севера Томской и Тюменской областей, уровень цитогенетически aberrантных клеток в зависимости от принадлежности человека к определенному генотипу по генам глутатион-S-трансферазы GSTM1 и GSTT1.

Организация исследования. Работа проведена в зимние месяцы в медпунктах вахтовых поселков при температурных условиях, близких к комфортным, через 1–2 часа после конца смены вахтового периода.

В настоящем исследовании были обследованы только те лица, которые подписали добровольное информированное согласие относительно взятия у них соскоба в полости рта буккального эпителия с последующим определением содержания уровня цитогенетически аномальных эпителиоцитов и наличия в ядерном материале этих клеток генетических маркеров ферментов биотрансформации ксенобиотиков GSTM1 и GSTT1. У каждого человека анализировали более 1000 эпителиоцитов. При анализе полученных результатов использованы также анкетные данные работников

нефтепромыслов: возраст, национальность, стаж работы на нефтепромыслах, и кроме того были учтены пристрастие к курению, наличие хронических патологий, отсутствие в течение года вирусных инфекций и рентгеновского обследования.

Испытуемые. Обследовано 215 человек мужского пола в возрасте от 24 до 37 лет, занятых выполнением современных видов механизированного физического труда (машинисты буровой установки – 58 человек, операторы добычи нефти – 40 человек, вышкомонтажники – 60 человек и дефектоскописты – 57 человек) на нефтепромыслах севера Западной Сибири. В качестве контроля в тот же период времени в вахтовых поселках проведено обследование 55 человек непосредственно не занятых в процессах нефтедобычи (работники пищеблока, медработники и другой обслуживающий персонал).

Методы исследования. Среди генов, задействованных в системе детоксикации, были изучены два полиморфных варианта генов GSTM1 и GSTT1, относительно которых имеются исследования, подтверждающие их протективную роль в отношении индукции ксенобиотиками цитогенетических аномалий [4]. При анализе генов GSTM1 и GSTT1 на наличие делеций использовали мультиплексную ПЦР. В амплификационную пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты каждого из указанных генов. Разделение продуктов амплификации генов GSTM1 и GSTT1 проводили в горизонтальном 3% агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем УФ-свете. Напряженность электрического поля при разделении фрагментов ДНК составляла 1–8 В/см.

Нормальные аллели генов GSTM1 и GSTT1 характеризуются присутствием ПЦР-продуктов: для GSTM1 (гомозиготы GSTM1 ++ и гетерозиготы GSTM1 +/-) для GSTT1 (гомозиготы GSTT1 ++ и гетерозиготы GSTT1 +/-). Делеционные («нулевые») гомозиготные варианты (GSTM1 0/0 и GSTT1 0/0) выявлялись по отсутствию фрагментов GSTM1 и GSTT1. Для генов GSTM1 и GSTT1 генотип 0/0 означает отсутствие на электрофореграмме фрагмента, соответственно, и данный индивидум гомозиготен по делеции. Значок «+» означает присутствие фрагмента и данный донор либо гетерозиготен, либо гомозиготен по отсутствию делеции в указанных генах. Получение

Таблица

Число клеток буккального эпителия с микроядрами у работников различных профессий, работающих на нефтепромыслах севера Западной Сибири, и в контроле в зависимости от наличия у обследованных лиц сочетания вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков GSTM1 и GSTT1

Обследуемые когорты	Генотипы			
	GSTM1 (0/0) GSTT1 (0/0)	GSTM1 (+) GSTT1 (0/0)	GSTM1 (0/0) GSTT1 (+)	GSTM1 (+) GSTT1 (+)
Административно-хозяйственный персонал нефтепромыслов (контроль) n=55	0,42±0,16 n=10	0,34±0,14 n=13	0,40±0,23 n=14	0,21±0,11 n=18
Вышкомонтажники n=60	0,89±0,34 n=9	0,55±0,29 n=15	0,82±0,22 n=17	0,49±0,21 n=19
Машинисты буровой установки на нефть n=58	2,39±0,29* n=11	1,59±0,28** n=17	1,38±0,24** n=12	0,57±0,36 n=18
Операторы добычи нефти n=40	2,27±0,42* n=7	1,14±0,17** n=10	1,41±0,18** n=9	0,32±0,19* n=14
Дефектоскописты сварных швов труб n=57	6,08±0,64* n=11	2,45±0,48* n=13	3,88±0,63* n=15	0,89±0,41 n=18

Примечание: Значимые отличия от контроля отмечены: ** p<0,05 и * p<0,01.

мазков буккального эпителия из полости рта, фиксация, окраска и анализ числа клеток с микроядрами не отличались от ранее изложенного [8].

Все данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок и корреляционного анализа по Спирмену, используя пакет статистических компьютерных программ [17]. Различия сравнимых результатов ($X \pm m$, где X – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ числа клеток буккального эпителия с микроядрами свидетельствует о том, что за исключением вышкомонтажников у всех других когорт обследованных рабочих-нефтяников зарегистрировано по сравнению с контролем повышение числа цитогенетически аномальных клеток (см. табл.).

Анализ уровня эпителиоцитов с микроядрами в контрольной группе, не выявил каких либо существенных различий в связи с принадлежностью человека к тем или иным вариантам по генам GSTM1 и GSTT1. В то же время полученные данные свидетельствуют, что наблюдаются четко выраженные различия в уровне цитогенетически aberrантных у вахтовых рабочих-нефтяников в зависимости от их генотипа и профессиональной принадлежности. Особенно существенно повышенным был уровень цитогенетических нарушений у рабочих с гомозиготным нулевым

генотипом при совместном сочетании генов GSTM1 и GSTT1. Достоверно повышенное число клеток с микроядрами было также зарегистрировано и для рабочих, у которых в генотипе присутствовали делетированные аллели GSTM1 (0/0) или GSTT1 (0/0). У рабочих с генотипом GSTM1 (+)/GSTT1(+) ни в одном случае значимого повышения числа цитогенетически aberrантных клеток не установлено. Особенно существенное возрастание числа эпителиоцитов с микроядрами было зарегистрировано у дефектоскопистов. Поскольку для обнаружения нарушений в сварных швах труб используются гамма-излучатели, то мы склонны полагать, что существенное увеличение числа цитогенетически аномальных клеток обусловлено у них за счет радиоактивного воздействия.

В научной литературе имеются данные свидетельствующие о том, что нулевые генотипы по глутатион-S-трансферазе (GSTM1 и GSTT1) ассоциированы с более высоким уровнем цитогенетических нарушений [4, 20]. Полученные нами данные подтверждают это заключение в отношении нулевого генотипа как для GSTM1, так и GSTT1.

Поскольку нулевой генотип по генам GSTM1 и GSTT1 значительно увеличивает вероятность возникновения ряда серьезных заболеваний [9, 14, 23], то не исключено наличие на нефтепромыслах «селекции» рабочих с таким генотипом. Так анализ рабочего стажа на нефтепромыслах Сибири показал, что число рабочих-нефтяников с нулевым генотипом GSTM1 в случаях наличия

стажа от 1 до 3 лет особенно велико (48,6%) и этот показатель снижается практически в 5 раз (10,1%) в группе лиц, проработавших на нефтедобыче более 10 лет. Интересно отметить, что нулевой (делетированный) генотип особенно часто встречается среди угро-финской группы народов (удмурты, чуваша, марийцы, коми и др.), достигая по литературным данным 61,3% [1,3]. Если на нефтепромыслах среди новичков угро-финны составляли 38,6%, то среди ветеранов их осталось всего 5,6%.

Имеются исследования, показывающие генотоксическую роль курения [13, 21]. При этом установлено, что особенно существенные цитогенетические изменения наблюдаются у курильщиков именно с нулевым генотипом GSTM1 [24]. В наших исследованиях анализ числа курящих и некурящих свидетельствует, что их частота практически одинакова в обследованных группах доноров и колеблется в пределах 36,5–39,2%. В то же время, действительно, уровень цитогенетических нарушений у лиц с нулевым генотипом GSTM1 у курильщиков был достоверно выше ($p > 0,05$), чем у некурильщиков.

Цитогенетические изменения наблюдаемые у рабочих-нефтяников, возможно объяснить не только мутагенным действием нефти. Доказано, что из скважин вместе с нефтью на поверхность в значительных объемах поступает радиоактивный газ – радон, мутагенное действие которого хорошо доказано [6, 16]. В своей работе Березин и Горбачев [2] подчеркивают, что при добыче нефти с пластовыми водами извлекаются нефтешламы с повышенным содержанием радионуклидов уранового и ториевого ряда, кроме того для контроля целостности трубопроводов на предприятиях нефтегазового комплекса широко применяются методы рентгеновской и радионуклидной дефектоскопии, что может приводить к облучению персонала дозами, превышающими предельно допустимые уровни. Наряду с этим следует отметить, что северные районы Тюменской и Томской областей неоднократно накрывали радиоактивные осадки в результате атомных испытаний на Новоземельском полигоне, и имеются свидетельства радиоактивности ягеля и мяса оленей [6, 22], что также может приводить в клетках человека к возникновению aberrаций хромосомного типа, о чем свидетельствуют результаты цитогенетического обследования коренных народов севера Сибири [22].

Несомненно, что в экстремальных условиях нефтедобычи на севере Западной Сибири имеется множество факторов, которые могут оказывать как мутагенное, так и ко-мутагенное действие на генетический аппарат человека. Помимо антропогенных факторов это и природные факторы: низкие температуры, мощные геомагнитные поля авроральной зоны, геомагнитные аномалии, особенности светового режима (полярные ночь и день) и дефицит некоторых жизненно важных микроэлементов [8, 11].

Выводы

1. У работников нефтепромыслов не занятых непосредственно в добыче нефти, а также у рабочих вышкомонтажников значимых различий в зависимости от генотипа по генам GSTM1 и GSTT1 не установлено.

2. У рабочих с генотипом GSTM1(+)/GSTT1(+) существенного изменения показателя – уровень эпителиоцитов с микроядрами по сравнению с контролем не наблюдалось.

3. Во всех случаях у рабочих нефтепромыслов: машинистов, операторов и дефектоскопистов, при наличии в генотипе нулевых (делетированных) аллелей генов GSTM1 и GSTT1 по сравнению с контролем отмечено достоверное повышение числа эпителиоцитов с микроядрами.

4. Наиболее существенные цитогенетические изменения буккального эпителия зарегистрированы у рабочих-дефектоскопистов стыков труб.

5. В условиях нефтепромыслов севера Сибири помимо нефти возможно наличие других мутагенных и ко-мутагенных факторов как природного, так и антропогенного характера.

6. Генотипирование, как метод, необходимо ввести в практику профессионального отбора персонала работающего на нефтепромыслах севера Сибири.

Литература

1. Баранов, В. С. Генетические факторы предрасположенности и терапии эндометриоза / В. С. Баранов, Т. Э. Иващенко, Н. Ю. Швед и др. // Генетика. – 1999. – Т. 35. – №2. – С. 243-248.
2. Березин, И. И. Радиационно-гигиенические аспекты труда на предприятиях нефтегазового комплекса / И. И. Березин, Д. О. Горбачев // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – Т.1. – №3. – С. 12-15.
3. Вахитова, Ю. В. Анализ полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы в популяциях Волго-уральского региона / Ю. В. Вахитова, З. М. Султанаева, Т. В. Викторова и др. // Генетика. – 2001. – Т.37. – №2. – С. 268-270.

4. Григорьева, С. А. Изучение генетически обусловленной чувствительности к действию мутагенов окружающей среды в индуцированном мутагенезе на клетках человека: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Григорьева С. А. – М., 2007. – 26 с.
5. Журков, В. С. Анализ мутагенной активности водных и буферных экстрактов образцов почв, загрязненных нефтью / В. С. Журков, Л. В. Ахальцева, Е. В. Неякина и др. // Гигиена и санитария. – 2009. – №3. – С. 57-60.
6. Ильинских, Н. Н. Радиационная экогенетика России / Н. Н. Ильинских, В. И. Булатов, А. М. Адам и др. – Томск: «Печатный двор». – 1998, 292 с.
7. Ильинских, Н. Н. Комплексное изучение различных параметров патогенетического и физиологического статуса здоровья у рабочих в нефтедобывающей промышленности / Н. Н. Ильинских, М. А. Медведев, П. М. Потапова и др. // Гиг. и санит. – 1989. – №12. – С. 18-21.
8. Ильинских, Н. Н. Эпидемиологическая генотоксикология тяжелых металлов и здоровье человека / Н. Н. Ильинских, Л. М. Огородова, Л. А. Безруких. – Томск: Издание СибГМУ, 2003. – 300 с.
9. Ляхович, В. В. Активированные кислородные металлиты в монооксигеназных реакциях / В. В. Ляхович, В. А. Вавилин, Н. К. Зенков и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – №4. – С. 118-119.
10. Русаков, Н. В. Кожно-резорптивное действие нефти на некоторые биохимические и иммунологические показатели организма экспериментальных животных / Н. В. Русаков, И. А. Крятов, З. И. Коганова и др. // Гиг. и санит. – 2011. – №1. – С. 86-88.
11. Собакин, А. К. Работоспособность вахтового персонала газовых промыслов в экстремальных условиях Севера: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Собакин А. К. – Новосибирск, 2004. – 25 с.
12. Araújo, A. E., Mezzomo B. P., Ferrari I. Genotoxic effects caused by indoor exposure to petroleum derivatives in a fuel quality control laboratory // Genet Mol Res. – 2010. – Vol 9(2). – P.1069-1073.
13. Bala-Krishna, M. P. Frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers // Human. Genet. – 1979. – Vol. 52. – P. 343-345.
14. Baranov, V. S. In: K. Berg, V. Bulyjenkov, Y. Christen (Eds) «Genetic approaches to Noncommunicable Diseases» // Springer-Verlag. – 1996. – P.105-112.
15. Buckton, K. E., Evans H. I. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. – Geneva: WHO, 1973. – 124 p.
16. Edwards, A. A., Lloid D. C., Prosser J. S. Chromosome aberrations in human lymphocytes – a radiobiological review. – London: Academic Press, 2000. – 432 p.
17. Institute Inc. SAS/STAT TM User's Guide, Version 6. – Cary NC. N.Y.: SAS Institute Inc., 1989. – P. 24.
18. Khalil, A. M. Chromosome aberrations in blood lymphocytes from petroleum refinery workers // Arch Environ Contam Toxicol. – 1995. – Vol. – 28(2). – P.236-239.
19. Kim, Y. J., Choi J. Y., Paek D. Association of the NQO1, MPO, and XRCC1 polymorphisms and chromosome damage among workers at a petroleum refinery // J. Toxicol Environ Health. – 2008. – Vol. – 71(5). – P. 333-341.
20. Kumar, M., Chauhan L. K., Paul B. N. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism in north Indian population and its influence on the hydroquinone-induced in vitro genotoxicity // Toxicol Mech Methods. – 2009. – 19(1). – P.59-65.
21. Larramendy, M. L., Knuutila S. Increased frequency of micronuclei in B and T8 lymphocytes from smokers // Mutat Res. – 1991. – 259(2). – P. 189-195.
22. Osipova, L. P., Posukh O. L., Koutzenogii K. P., Sukhorukov F. V., Matveeva V. G., Grafodatskii A. S., Konovalova N. A., Sukhovey Y. G., Petrov S. A., Lefranc G., Lefranc M.-P. Epidemiological studies for the assessment of risks from environmental radiation on Tundra Nentsi population // NATO Science Series 2: Environmental Security. Fundamentals for the assessment of risks from environmental radiation. – 1999. – Vol. – 1999. – P. 35-42.
23. Peng, D. X., He Y. L., Qiu L. W. // Association between glutathione S-transferase M1 gene deletion and genetic susceptibility to endometriosis // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. – 2003. – Vol.23(5). – P.458-459.
24. Scarpato, R., Hirvonen A., Migliore L. Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers // Mutat Res. – 1997. – Vol. 389(2-3). – P. 227-235.
25. Yang, J. K., Jun Y. C., Yoon H. C. Micronucleus-centromere assay in workers occupationally exposed to low level of benzene // Hum. Exp. Toxicol. – 2010. – Vol. 29(5). – P. 343-350.

