

УДК 615.015.13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК У РАБОТНИКОВ ХИМИЧЕСКОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

Каримов Д.Д., Кудояров Э.Р., Галимова Р.Р., Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Кутлина Т.Г.

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

В работе проведена оценка состояния систем репарации ДНК у работников нефтехимического предприятия путем измерения коэффициента репарации ДНК методом ДНК-комет. Была проведена оценка зависимости определяемого показателя от стажа и пола работника, статуса курения, подразделения и химических веществ, с которыми контактируют работники. В результате работы был выявлен высокий потенциал применения данного метода в исследовании воздействия химических факторов на здоровье населения.

Ключевые слова: генотоксичность, репарация, ДНК-кометы, вредные факторы рабочей среды, работники нефтехимических производств.

Для цитирования: Каримов Д.Д., Кудояров Э.Р., Галимова Р.Р., Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Кутлина Т.Г. Определение коэффициента репарации ДНК у работников химического предприятия. Медицина труда и экологии человека. 2019; 3: 51-58.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10037>

DNA REPARATION COEFFICIENT ESTIMATION IN CHEMICAL PLANT WORKERS

Karimov D.D., Kudoyarov E.R., Galimova R.R., Karimov D.O., Mukhammadieva G.F., Kutlina T.G.

Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

The paper deals with state estimation of systems of DNA repair in workers of the petrochemical industries by measurement of DNA repair by the method of DNA-comets. The dependence of the defined indicator on an length of employment and a sex of the worker, the status of smoking, division and chemicals to which workers contact was assessed. As a result of the work, a high potential of this method application in the study of the impact of chemical factors on the health of the population was revealed.

Keywords: Genotoxicity, reparation, DNA comets, harmful factors of the working environment, petrochemical workers.

For quotation: Karimov D.D., Kudoyarov E.R., Galimova R.R., Karimov D.O., Mukhammadieva G.F., Kutlina T.G. Dna reparation coefficient estimation in chemical plant workers. Occupational health and human ecology. 2019; 3: 51-58

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10037>

Введение. Работники нефтехимических производств в процессе осуществления трудовой деятельности подвергаются широкому спектру неблагоприятных воздействий. Многие из этих веществ являются токсикантами, в том числе генотоксикантами, способными вызывать предмутационные изменения в ДНК [1]. Ответом на это становится активация репарационных систем, осуществляющих исправление возникших повреждений или изменений. Известно, что постоянная высокая нагрузка на системы репарации ускоряет

угнетение работы этой системы и приводит к снижению репаративного потенциала клеток [2].

Метод электрофореза ДНК отдельных клеток (CSGE), более известный как метод ДНК-комет (Comet Assay), является одним из наиболее распространенных методов в генотоксикологии. Метод позволяет определить степень повреждения ДНК на основе данных о разрывах цепей. Наиболее распространенная модификация метода – щелочной метод ДНК-комет – позволяет выявлять также одноцепочечные разрывы и щелочелабильные сайты [3].

Особенностью метода ДНК-комет является возможность напрямую измерить способность клеток репарировать возникшие повреждения ДНК. Одним из способов является определение коэффициента репарации ДНК (КР). Данный показатель основан на оценке количества повреждений ДНК, вызванных пероксидом водорода, после двухчасовой восстановительной инкубации в питательной среде и сравнения их с количеством повреждений до инкубации [4-6]. Таким образом, показатель КР показывает степень восстановления повреждений, что позволяет напрямую количественно оценить состояние систем репарации ДНК [4, 7].

Материалы и методы.

Выборка состояла из 44 человек, проживающих в Нижнекамске, и работающих на предприятии ПАО «Нижнекамскнефтехим». При этом не были получены сведения о контактах с промышленными токсикантами у 3 человек и не были получены данные о коэффициенте репарации у 2 человек. Таким образом, были проанализированы данные о состоянии репаративной системы у 39 человек (табл. 1).

Таблица 1

Количество работающих в различных подразделениях

Пол	Статус курения	Подразделения			Всего
		БК и ЗП	УВКиС	УТК и ЦА	
Женский	Не курит	0	3	6	9
Мужской	Не курит	4	9	1	14
	Курит	5	6	5	16
Всего		9	18	12	39

Стаж работников на предприятии составлял 1–37 лет, из них 8 человек имеют стаж 5 лет и менее, 15 человек имеют стаж 5–20 лет включительно, 16 человек имеют стаж более 15 лет.

Анализ генотоксичности проводился методом ДНК-комет, согласно методическим рекомендациям МР 4.2.0014-10 [3]. В качестве материала использовалась фракция лейкоцитов крови. Для оценки состояния репаративной системы исследуемых работников был использован показатель коэффициента эффективности репарации (КР). Для определения коэффициента репарации лейкоциты участников исследования инкубировали в 20мкМ растворе перекиси водорода в течение 10 минут, после чего провели отмывку от перекиси и половину биоматериала отобрали для проведения анализа ДНК-комет. Для репарации полученных повреждений оставшиеся лейкоциты после инкубации в растворе перекиси водорода инкубировали в питательной среде RPMI при 37 градусах в течение двух часов, после чего провели оценку количества повреждений ДНК методом ДНК-комет. Микропрепараты исследовали под 10-кратным увеличением на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Imager.D2 с камерой Axio Cam MRc5, подключенной к компьютеру для сохранения изображений. Оценку процентной доли (среднего содержания) ДНК в хвосте

кометы проводили с использованием программы ImageJ 1.48 (Wayne Rasband). Статистическая обработка выполнялась в ПО SPSS v.21.0. Для проверки нормальности распределения показателей в каждой группе использовался одновыборочный критерий Колмогорова-Смирнова. Для оценки равенства дисперсий применялся F-критерий Ливина, для оценки различий между группами – t-тест Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ. При проведении дисперсионного анализа в качестве апостериорной поправки на множественность сравнений был использован критерий Тьюки.

Коэффициент эффективности репарации ДНК рассчитывался по следующей формуле:

$$RE=(TD_{120}/TD_0)\times 100\%,$$

где TD_{120} представляет собой процент ДНК в хвосте кометы после 120-минутной восстановительной инкубации, а TD_0 представляет собой процент ДНК в хвосте кометы после воздействия перекиси водорода [4-7]. Итоговый показатель характеризует эффективность системы репарации ДНК.

Результаты.

При определении критерия Колмогорова-Смирнова для выборки была установлена нормальность распределения показателя коэффициента репарации ($Z=0,918$, $p=0,368$).

Проведена оценка различий коэффициента репарации работников предприятия в группах разного пола и курящих/не курящих мужчин (табл. 2). Т-тест не показал значимых различий между группами разного пола и с различным статусом курения.

Таблица 2

Описательные статистики и результаты теста Стьюдента КР работников разного пола и статуса курения

		N	Среднее	Стд. ошибка среднего	t-критерий равенства средних	
					t	P
Пол	Мужской	33	99,884	11,392	-1,306	0,199
	Женский	9	129,775	12,469		
Статус курения	Курит	16	104,168	13,935	0,360	0,721
	Не курит	17	95,851	18,176		

При сравнении КР работников различных подразделений были выявлены значимые различия между работниками УТК и работниками остальных подразделений. Различия между лицами, работающими в производственных подразделениях, УВКиСе и ЦА незначимы (табл. 3).

Таблица 3

Описательные статистики и результаты однофакторного дисперсионного анализа КР работников разных подразделений

Подразделения	N	Среднее	Стд. Ошибка	ANOVA		ДЗР Тьюки	
				F	p	Подразделения сравнения	P
БК и ЗП	9	87,2399	17,947	6,016	0,002	УВКиС	1,000
						УТК	0,011
						ЦА	0,931

УВКиС	18	88,456	9,570			БК и ЗП	1,000
						УТК	0,003
						ЦА	0,903
УТК	9	167,118	23,4597			БК и ЗП	0,011
						УВКиС	0,003
						ЦА	0,027
ЦА	3	66,768	3,237			БК и ЗП	0,931
						УВКиС	0,903
						УТК	0,027

Был проведен анализ КР в зависимости от контакта работников с некоторыми наиболее распространенными химическими агентами. Было выявлено 3 наиболее распространенных химических соединения, с которыми взаимодействовали работники не менее трех подразделений. Таких веществ было выявлено три: серная кислота, этилбензол и стирол. Серная кислота относится ко второму классу опасности, поражает дыхательные пути, кожу, слизистые оболочки, вызывает затруднение дыхания, кашель, нередко – заболевания бронхолегочной системы. Этилбензол и стирол являются ароматическими соединениями, являются иммунотоксическими веществами. Проведенный анализ не показал значимых различий по показателю КР между работниками, контактирующими и не контактирующими с данными веществами (табл. 4).

Таблица 4

Описательные статистики и результаты теста Стьюдента КР работников, контактирующих/не контактирующих с различными веществами

Вещества веществ	Статус	N	Среднее	Стд. ошибка среднего	t-критерий равенства средних	
					t	P
Серная кислота	Контактирует	35	104,587	10,830	-0,398	0,693
	Не контактирует	7	114,799	18,492		
Этилбензол	Не контактирует	32	105,217	9,107	-0,200	0,842
	Контактирует	10	109,7196	28,309		
Стирол	Не контактирует	34	105,041	8,872	-0,268	0,790
	Контактирует	8	111,591	34,319		

При анализе КР в зависимости от наличия контакта с опасными производственными факторами химической природы не было выявлено значимых различий между лицами, контактирующими и не контактирующими с данными факторами (табл. 5).

Таблица 5

Описательные статистики и результаты теста Стьюдента КР работников, контактирующих/не контактирующих с различными группами веществ

Группы веществ	Статус	N	Среднее	Стд. ошибка среднего	t-критерий равенства средних	
					t	P
Неорганические	Контактирует	12	97,650	13,188	-0,572	0,571
	Не контактирует	30	109,744	12,2398		
Циклические УВ	Не контактирует	30	105,469	9,639	-0,135	0,893
	Контактирует	12	108,339	23,6199		
Алифатические УВ	Не контактирует	18	99,017	12,984	-0,660	0,513
	Контактирует	24	111,743	13,547		
Ациклические радикал-замещенные органические	Не контактирует	34	99,433	10,269	-1,515	0,138
	Контактирует	8	135,427	22,302		

При анализе корреляции КР со стажем работника коэффициент корреляции Пирсона составил -0,008 при $p=0,959$. Таким образом, в ходе анализа не было выявлено взаимосвязи между стажем работы и КР.

Работники также были разделены на группы в зависимости от стажа работы: работники, работающие на предприятии 5 лет и менее, работающие 6–20 лет включительно и работающие на предприятии более 20 лет. Анализ различий КР в группах работников, имеющих различный стаж, также не показал значимых различий.

Таблица 6

Описательные статистики и результаты однофакторного дисперсионного анализа КР работников, имеющих различный стаж работы

Стажевые группы	N	Среднее	Стд. ошибка среднего	Однофакторный дисперсионный анализ		ДЗР Тьюки	
				F	p	Стажевые группы сравнения	p
5 лет и менее	8	93,629	15,398	0,714	0,497	6 - 20 лет	0,603
						более 20 лет	0,994
6 - 20 лет	15	119,282	20,674	0,714	0,497	5 лет и менее	0,603
						более 20 лет	0,553
более 20 лет	16	96,467	11,085	0,714	0,497	5 лет и менее	0,994
						6 - 20 лет	0,553

Также был проведен анализ КР работников различных подразделений, разделенных по признаку пола и статусу курения. Анализ позволил выявить значимые различия среди

курящих мужчин, работающих в различных подразделениях. При парном сравнении были выявлены различия между работниками УТК и других подразделений.

Таблица 7

Описательные статистики и результаты однофакторного дисперсионного анализа КР работников различных подразделений, разделенных по признаку пола и статусу курения

Пол	Курение	Подразделение	N	Среднее	Стд. Ошибка	Однофакторный дисперсионный анализ		Множественные сравнения		
						F	p	Подразделение	p	
Женский	Не курит	УВКиС	3	121,438	25,645	0,201	0,667	-	-	
		УТК	6	133,944	15,204					
Мужской	Не курит	БК и ЗП	4	109,808	34,796	0,338	0,721	-	-	
		УВКиС	9	96,492	13,519					
		ЦА	1	64,517	-					
	Курит	БК и ЗП		5	69,185	15,801	13,854	p<0.001	УВКиС	0,981
									УТК	0,001
						ЦА			1,000	
		УВКиС		6	59,912	8,5395			БК и ЗП	0,981
									УТК	p<0.001
									ЦА	0,995
		УТК	3	233,466	46,336	БК и ЗП			0,001	
				УВКиС	p<0.001					
				ЦА	0,004					
ЦА		2	67,893	5,258	БК и ЗП	1,000				
					УВКиС	0,995				
					УТК	0,004				

Обсуждение.

Метод оценки коэффициента репарации позволяет оценить работу систем репарации в клетках и их способность исправлять возникающие в клетке повреждения ДНК. Полученный результат позволяет говорить о том, что у работников управления технического контроля снижена активность систем репарации по сравнению с работниками центра автоматизации, управления водоснабжения и производственных подразделений. Данный факт можно объяснить более высокой химической нагрузкой на работников, занимающихся ремонтом оборудования. Подтверждается данный факт отсутствием различий между женщинами-лаборантами химического анализа УТК и женщинами-машинистами и аппаратчиками УВКиС. Дополнительным фактором, снижающим активность репаративной системы, является

курение. В ходе анализа данных было замечено, что работники УТК, имеющие наибольший показатель КР являются курильщиками, в группе некурящих мужчин работники данного подразделения отсутствуют.

В целом метод показал хороший результат. Из отмеченных недостатков наиболее серьезным является значение КР более 100%. Из исследований, проведенных другими группами, известно, что полное восстановление повреждений ДНК происходит в течение 2 часов инкубации в питательной среде (Даливеля, 2008), однако в этом исследовании были взяты лейкоциты здоровых доноров. Вполне возможно, что процесс репарации у работников, имеющих высокую химическую нагрузку, замедлен. Таким образом, высокий индекс ДНК в хвосте кометы, возможно, показывает не только большое количество нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК, но и большое количество разрывов, образовавшихся в процессе незаконченной эксцизионной репарации.

Ограничением этого исследования, не позволяющим сделать окончательные выводы, стоит считать малый размер выборки. Был получен биоматериал небольшого количества человек, поступивших в стационар УфНИИ медицины труда и экологии человека, к тому же пациенты очень неравномерно распределены по полу, статусу курения, химическим факторам, подразделениям и профессиональной принадлежности. Это не позволило с достаточной степенью достоверности выявить влияние исследуемых факторов на состояние системы репарации у работников предприятия.

Заключение. В работе было оценено состояние репаративной системы работников химического предприятия методом ДНК-комет. Результаты анализа позволяют говорить о высоком потенциале применения данного метода в исследовании воздействия химических факторов на здоровье населения и в экспериментальной оценке генотоксичности при аттестации рабочих мест.

Список литературы:

1. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Рипол Классик; 1989.
2. Шапошников М.В., Прошкина Е.Н., Шилова Л.А., Москалев, А.А. Роль репарации повреждений ДНК в долголетию. Товарищество научных изданий КМК; 2015.
3. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. МР 4.2.0014-10. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. М; 2010.
4. О. В. Даливеля, Н.В. Савина, Т.Д. Кужир, Р.И. Гончарова. Гено- и цитотоксичность перекиси водорода в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro*// Вести Национальной академии наук Беларуси. Серия Биологические науки 2008 2 49-52.
5. Czarny, P., Kwiatkowski, D., Toma, M., Kubiak, J., Sliwinska, A., Talarowska, M. et al. Impact of single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes on DNA damage and efficiency of DNA repair in recurrent depression disorder. *Mol Neurobiol.* 2017 Aug;54(6):4150-4159.
6. Czarny P, Kwiatkowski D, Galecki P, Talarowska M, Orzechowska A, Bobinska K et al. Association between single nucleotide polymorphisms of MUTYH, hOGG1 and NEIL1 genes, and depression disorder. *J Affect Disord.* 2015 Sep 15;184:90-6.
7. Полуботко, Е.А., Шатрова, А.Н., Плескач, Н.М., Михельсон, В.М., Спивак, И.М. Клеточный репаративный потенциал в семьях больных атаксией-телеангиэктазией/ Цитология 2009 51(12) 978-85.

References:

1. Inge-Vechtsov SG. Genetics with the basics of selection. 1st ed. Ripol Classic; 1989

2. Shaposhnikov M., Proshkina E., Shilova L., Moskalev A. The role of DNA repair in longevity. Fellowship of scientific publications KMK; 2015.
3. Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor. MR 4.2.0014-10. Evaluation of genotoxic properties by the method of DNA comets in vitro. Methodic recommendations. 2010.
4. Dalivelya O.V., Savina N.V., Kuzhir T.D., Goncharova R.I. Geno-and cytotoxicity of hydrogen peroxide in human peripheral blood lymphocytes in vitro. Vestsi Nats akad navuk Belar Ser biial navuk.2008 2: 49-52.
5. Czarny, P., Kwiatkowski, D., Toma, M., Kubiak, J., Sliwinska, A., Talarowska, M. et al. Impact of single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes on DNA damage and efficiency of DNA repair in recurrent depression disorder. Mol Neurobiol. 2017 Aug;54(6):4150-4159.
6. Czarny P, Kwiatkowski D, Galecki P, Talarowska M, Orzechowska A, Bobinska K et al. Association between single nucleotide polymorphisms of MUTYH, hOGG1 and NEIL1 genes, and depression disorder. J Affect Disord. 2015 Sep 15;184:90-6.
7. Polubotko EA, Shatrova AN, Pleskach NM, Mikhel'son VM, Spivak IM. Cellular repair potential in families of ataxia-telangiectasia patients. Tsitologiya. 2009; 51(12):978-85.

Поступила/Received: 2.04.2019

Принята в печать/Accepted: 7.06.2019