

ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ
(ПСИХИЧЕСКОЙ) ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

УДК 575.22

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ СО СНОМ
И КОГНИТИВНЫМИ ФУНКЦИЯМИ, И ИХ АССОЦИАЦИЯ
С АВАРИЙНОСТЬЮ У РАБОТАЮЩИХ ПОСМЕННО
ВОДИТЕЛЕЙ АВТОБУСОВ

© 2017 г. В. Б. Дорохов^{1, *}, А. Н. Пучкова^{1, 2}, А. О. Таранов¹, В. В. Ермолаев³,
Т. В. Тупицына⁴, П. А. Сломинский⁴, В. В. Дементенко⁵

¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО “Государственный институт русского языка им. А.С. Пушкина”, Москва, Россия

³ФГБОУ ВО Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

⁴ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

⁵ФГБУН Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва, Россия

*e-mail: vbdorokhov@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2016 г.

Принята к печати 27.10.2016 г.

Целью настоящей работы являлось исследование ряда однонуклеотидных полиморфизмов генов и их связи с аварийностью у водителей автобусов. В исследовании участвовали 299 работающих по скользящему графику профессиональных водителей, для которых имелась статистика аварийности. Оценивались полиморфизмы в генах, связанных с ритмом сна–бодрствования, когнитивными и эмоциональными функциями: *CLOCK* (rs12649507), *RORA* (rs1159814), *NPAS2* (rs4851377), *NPSR1* (rs324981), *PER3* (rs2640909), *DRD3* (rs6280), *SLC6A3* (rs6347), *DBH* (rs1611125). В исследовании получены значимые ассоциации параметров аварийности с полиморфизмами в генах *CLOCK*, *NPSR1* и *SLC6A3*. Мы предполагаем, что они обусловлены различиями в хронотипе и устойчивости к нарушению режима сна для гена *CLOCK* и в когнитивном и эмоциональном контроле для генов *NPSR1* и *SLC6A3*.

Ключевые слова: генетические полиморфизмы, однонуклеотидные полиморфизмы, аварийность, вождение, сменная работа.

DOI: 10.7868/S004446771701004X

Вождение общественного транспорта — ответственная и напряженная профессия, требующая постоянного контроля дорожной ситуации и высоких навыков управления транспортным средством. Для обеспечения безопасного вождения необходима постоянная активность внимания, вовлечение памяти, готовность к быстрой реакции и эффективное определение возможной опасности. Общественный транспорт курсирует по маршрутам с раннего утра и до позднего вечера, а значит, профессиональные водители должны работать посменно. Они не могут избежать работы в неоптимальное для себя время суток. Замедление скорости реакции, когнитивные затруднения, снижение уровня бодрствования и сонливость могут повлиять на качество вождения и сделать вклад в повыше-

ние риска совершения дорожно-транспортного происшествия (ДТП) [Wagstaff, Sigstad Lie, 2011].

Качество вождения и риск попадания в ДТП зависят от множества внутренних и внешних факторов. Среди них можно выделить стабильные психофизиологические характеристики, важные практически для любой профессиональной деятельности: хронотип (предпочтительный ритм сна и бодрствования), контроль внимания, сенсорной и эмоциональной сферы [Barrash et al., 2010; Johnson et al., 2014]. В условиях неизменной дорожной ситуации появляется риск развития монотонии, при которой качество выполняемой работы становится нестабильным [Кирой, Асланян, 2005].

Работа после ночных смен является фактором риска для аварийно-опасных ситуаций [Lee et al., 2016]. В силу индивидуальных различий функционирования внутренних биологических часов человек может быть хуже или лучше приспособлен к нестандартному рабочему расписанию и недостаток сна может быть выражен в разной степени [Goel et al., 2013]. Выраженность реакции на депривацию сна индивидуальна и достаточно стабильна для каждого конкретного человека [Chua et al., 2014; Spaeth et al., 2012].

В настоящее время для многих важных для профессиональной деятельности индивидуальных психофизиологических и нейроповеденческих параметров показано наличие наследственного вклада [Пучкова, Дорохов, 2015]. В контексте этих исследований возникает вопрос — можно ли отследить эффекты генетических различий на более высоком поведенческом уровне, например, в безопасности вождения? В связи с этим в нашей работе была поставлена цель поиска ассоциаций между генетическими полиморфизмами-кандидатами и таким параметром безопасности вождения, как статистика ДТП. Также проводился анализ корреляций генетической вариабельности по выбранным однонуклеотидные полиморфизмы генов (ОНП) и параметрами хронотипа водителей. Его предварительные результаты опубликованы [Dorokhov et al., 2015].

В настоящем исследовании рассматриваются ОНП, связанные с работой биологических часов и режимом сна—бодрствования: *CLOCK* [Allebrandt et al., 2010], *NPSR1* [Гафаров и др., 2015]; когнитивным и аффективным контролем, импульсивностью и вниманием: *NPSR1* [Laas et al., 2015; Neufang et al., 2015; Ruland et al., 2015]; контролем работы дофаминергической системы: *SLC6A3* [Tiwari et al., 2013; Sullivan et al., 2013; Pinsonneault et al., 2011], *DRD3* [Nemoda et al., 2011], *DBH* [Ziermans et al., 2012]. Также были выбраны ОНП в области генов, связанных с работой биологических часов, для которых прямая связь со сном показана еще не была: *RORA* (rs1159814), *NPAS2* (rs4851377), *PER3* (rs2640909) [Hu et al., 2016]. Проводится анализ ассоциаций данных ОНП с аварийностью у посменно работающих водителей автобусов.

МЕТОДИКА

В исследовании участвовали работающие по скользящему графику профессиональные

водители рейсовых автобусов подмосковных автобаз, для которых имелась статистика аварийности за все время их работы на автобазе. Они выходили на маршрут в 6 смен длительностью 8–10 часов, начало смен: 3:30, 6:30, 9:30, 12:30, 15:30, 17:30.

Статистика аварийности включала количество ДТП за время работы на автобазе, виновность или невиновность согласно составленным протоколам ДТП. В группу были включены все работники с наибольшим количеством ДТП, а также часть — с наилучшей статистикой ДТП. Для части участников исследования был известен стаж работы на автобазе, тогда определялось отношение количество ДТП/стаж работы (дни). Испытуемые, подтвердившие свое согласие, также предоставляли биологический материал для генотипирования. Для генетического исследования оценивались ОНП в генах: *CLOCK* (rs12649507), *RORA* (rs1159814), *NPAS2* (rs4851377), *NPSR1* (rs324981), *PER3* (rs2640909), *DRD3* (rs6280), *SLC6A3* (rs6347), *DBH* (rs1611125). Геномную ДНК выделяли из проб клеток слизистой оболочки щеки.

Генотипирование ОНП проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, в технологии TaqMan. ПЦР проводили на амплификаторе Step One Plus. Смесь для амплификации, объемом 25 мкл, содержала 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера; 2.5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2.5 мкл 2.5 мМ раствора dNTP; 10 пМ каждого праймера (праймеры TaqMan); 4 пМ каждого зонда; 1.25 ед. термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимераза; Fermentas); 0.1–0.2 мкг геномной ДНК и деионизированной воды до 25 мкл. Генотипирование было проведено в лаборатории молекулярной генетики наследственных заболеваний Института молекулярной генетики РАН.

Исследование было проведено с соблюдением норм Хельсинкской декларации и одобрено этическим комитетом ИВНД и НФ РАН, все участники предоставили информированное согласие на участие.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в программе Statistica 7.0. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 299 водителей мужского пола в возрасте от 21 до 68 лет (средний возраст 45.8 ± 11.8 лет). По результатам статистики аварийности 35.4% водите-

Таблица 1. Статистика участия в ДТП исследуемой выборки водителей (количество водителей $N = 299$)
Table 1. Road accident statistics for the participants of the study (Number of subjects $N = 299$)

Количество и доля водителей	Количество ДТП			
	0	1	2	3
Участвовал в ДТП	193	68	30	8
Доля (%)	64.6	22.7	10	2.7
Виновен в ДТП	248	35	14	2
Доля (%)	82.9	11.7	4.7	0.7
Невиновен в ДТП	229	58	11	1
Доля (%)	76.6	19.4	3.7	0.3

лей в ходе работы хотя бы 1 раз становились участниками ДТП, а максимальное количество ДТП для одного водителя – 3 (8 человек, 2.7%). Суммарно было зарегистрировано 152 ДТП, из них 69 (45.4%) – по вине водителей. 82.9% водителей данной выборки ни разу не становились виновниками ДТП (табл. 1).

Аварии не по вине водителя не всегда можно рассматривать аналогично авариям по его вине, и для анализа мы использовали как суммарное количество аварий, так и показатели числа аварий, разбитые по параметру виновен/невиновен.

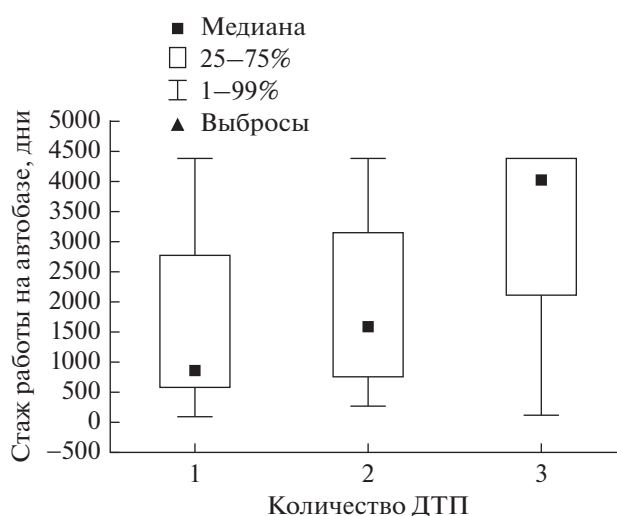
Для 162 водителей был известен стаж работы на автобазе на момент получения статистики аварийности. Он составил от 20 до 4382 дней (средний срок 1512 ± 1424 дня, медиана 839 дней). Для них был вычислен коэффициент аварийности – отношение количества ДТП к стажу работы в днях. В среднем этот коэффициент составил 0.00098 ± 0.00248 (медиана 0, нижняя и верхняя квантили – 0 и 0.001). В целом это характеризует профессиональных водителей как достаточно безопасных – большинство из них даже при длительных сроках работы попадает в малое количество ДТП.

При анализе связи количества ДТП с возрастом обнаружилась небольшая значимая корреляция ($r = 0.30$, $p < 0.001$). Однако мы предполагаем, что это обусловлено большим стажем работы у старших водителей: в исследуемой группе только водители старше 42 лет имели стаж работы более 2500 дней, у водителей до 30 лет стаж был не более 1100 дней.

В целом в данной группе наблюдается плавный рост числа аварий с увеличением стажа работы. Хотя обнаруживаются как водители с малым стажем, участвовавшие в трех ДТП, так и 4 водителя со стажем более 3000 дней без ДТП,

общая тенденция указывает на значимое нарастание числа ДТП (по критерию Краскелла–Уоллеса $H(3;160) = 13.9935$; $p < 0.01$), независимо от виновности (рисунок). При разделении статистики по параметру виновности в ДТП однозначная тенденция утрачивается, в том числе из-за малого числа водителей, совершивших два и более ДТП в каждой из категорий.

По результатам генотипирования равновесие Харди–Вайнберга соблюдалось для полиморфизмов во всех генах, кроме *RORA* и *DRD3*, что может быть связано с небольшим размером выборки или ее профессиональной спецификой (табл. 2). Для поиска ассоциаций между генотипом и параметрами аварий-



Взаимосвязь статистики ДТП, в которых участвовал водитель, и его стажа работы на автобазе (количество водителей $N = 162$, общее количество ДТП = 152).

The interaction between road accident history and length of service in the motor pool (Number of subjects $N = 162$, number of accidents = 152).

Таблица 2. Частота минорных вариантов исследуемых полиморфизмов в группе водителей. Звездочкой отмечены аллели, для которых соблюдалось равновесие Харди–Вайнберга

Table 2. Minor alleles in the studied polymorphisms and their frequencies. The alleles for which Hardy–Weinberg equilibrium is not disrupted are marked with an asterisk

ОНП	Варианты аллеля	Минорный аллель	% минор. гомозигот	Частота минорного аллеля (%)	N проб
<i>CLOCK</i> (rs12649507)	A/G	A*	14.1	34.5	213
<i>RORA</i> (rs1159814)	C/T	C	25.9	45.0	212
<i>NPSR1</i> (rs324981)	A/T	A*	21.0	47.9	214
<i>PER3</i> (rs2640909)	C/T	C*	3.3	22.2	212
<i>DRD3</i> (rs6280)	C/T	C	10.0	26.3	150
<i>SLC6A3</i> (rs6347)	A/G	G*	7.8	28.4	153
<i>DBH</i> (rs1611125)	C/T	C*	23.8	48.3	151
<i>NPAS2</i> (rs4851377)	C/T	C*	19.2	45.7	151

ности был проведен корреляционный анализ (гамма корреляция) между количеством минорных аллелей (0, 1 или 2) и количеством аварий и коэффициентом аварийности. Также проведен анализ распределения генотипов в группах, попадавших и не попадавших в аварии, а также бывших или не бывших виновниками аварии (2×2 и 2×3 тест хи-квадрат и точный критерий Фишера–Фримана–Холтона).

Значимые при $p < 0.05$ корреляции обнаружены для полиморфизмов генов *CLOCK*, *RORA*, *NPSR1*, *SLC6A3*, *DRD3*. При введении поправки Бонферрони на множественные сравнения значимыми остались следующие ассоциации: для количества ДТП, в которых виновен водитель и минорного аллеля ОНП гена *CLOCK* $r = -0.32$; для количества ДТП, в которых невиновен водитель и минорного

аллеля ОНП гена *NPSR1* $r = 0.30$, ОНП гена *SLC6A3* $r = 0.45$. Для всех ОНП сходные коэффициенты корреляции были получены и для коэффициента аварийности: -0.37 для гена *CLOCK*, 0.31 для *NPSR1* и 0.52 *SLC6A3*.

При анализе таблиц (табл. 3, 4) сопряженности риск попадания в ДТП значимо выше для носителей минорного аллеля гена *NPSR1* – отношение шансов $OR = 2.42$ ($df = 1$, критерий хи квадрат 7.65 , $p < 0.01$). Для полиморфизма гена *CLOCK* также подтвердилась значимое снижение риска стать виновником ДТП у носителей минорного аллеля – $OR = 0.46$ ($df = 1$ критерий хи квадрат 5.14 , $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате носители минорного аллеля в гене *CLOCK* меньше становились причиной ДТП, а носители минорных аллелей в генах *NPSR1* и *SLC6A3* чаще попадали в ДТП, в которых не были виновны.

Проведенное исследование впервые обнаруживает ассоциации между параметром безопасности вождения – аварийностью, и рядом однонуклеотидных полиморфизмов. Для данных полиморфизмов уже была показана ассоциация с поведенческими и когнитивными параметрами. Для аллеля А ОНП гена

Таблица 3. Частота аллельных вариантов ОНП гена *NPSR1* среди попадавших и не попадавших в ДТП водителей

Table 3. Allele frequency of *NPSR1* SNP in the subgroups of drivers who had or didn't have traffic accidents

	Генотип AA	Генотип AT	Генотип TT
Были в ДТП	23	44	20
Не были в ДТП	22	71	34

Таблица 4. Частота аллельных вариантов ОНП гена *CLOCK* среди бывших и не бывших виновными в ДТП водителей**Table 4.** Allele frequency of *CLOCK* SNP in the subgroups of drivers who have and have not caused traffic accidents

	Генотип AA	Генотип AG	Генотип GG
Был виновен в ДТП	4	14	27
Не был виновен в ДТП	26	73	69

CLOCK – параметрами ритма сна–бодрствования, меньшей средней длительностью сна [Allebrandt et al., 2010; Dorokhov et al., 2015], для минорного аллеля А ОНП *NPSR1* – с более низкой тревожностью, импульсивностью, контролем эмоций и внимания, а также нарушениями сна [Гафаров и др., 2015; Neufang et al., 2015; Laas et al., 2015; Ruland et al., 2015]. Для исследуемого полиморфизма *SLC6A3* показано функциональное влияние на работу дофаминергической системы [Tiwari et al., 2013; Sullivan et al., 2013; Pinsonneault et al., 2011].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Носители минорного варианта полиморфизма в гене *CLOCK* реже становятся виновниками ДТП, а носители минорных аллелей генов *NPSR1* и *SLC6A3* чаще попадали в ДТП, в которых не были виновны, что, видимо, обусловлено меньшей способностью к отслеживанию и избеганию опасных ситуаций, формирующихся на дороге.

Поскольку в исследуемой нами группе все водители работали по скользящему графику, а значит, не имели регулярного режима сна и бодрствования, представляется логичным, что обнаруженная связь аварийности с полиморфизмом гена *CLOCK* обусловлена разными предпочтениями в данном режиме и устойчивостью к его нарушению. Для ОНП генов *SLC6A3* и *NPSR1* эта ассоциация, вероятно, обуславливается различиями в эффективности систем эмоционального и когнитивного контроля, что важно для адаптации к дорожной ситуации.

Выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда, проект № 14-06-00963.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гафаров В.В., Громова Е.А., Гагулин И.В., Панов Д.О., Максимов В.Н., Гафарова А.В. Полиморфизм гена рецептора нейропептида S (*NPSR1*) и его ассоциации с нарушением сна в открытой по-

пуляции мужчин. Мир науки, культуры, образования. 2015. 5 (54): 275–277.

Кирой В.Н., Асланян Е.В. Общие закономерности формирования состояния монотонии. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2005. 55 (6): 768–776.

Пучкова А.Н., Дорохов В.Б. Молекулярно-генетические исследования индивидуальных отличий и профессиональная деятельность. Журн. Высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2015. 65 (2): 188–202.

Allebrandt K.V., Teder-Laving M., Akyol M., Pichler I., Muller-Myhsok B., Pramstaller P., Merrow M., Meitinger T., Metspalu A., Roenneberg T. *CLOCK* gene variants associate with sleep duration in two independent populations. *Biol. Psychiatry*. 2010. 67 (11): 1040–1047.

Barrash J., Stillman A., Anderson S.W., Uc E.Y., Dawson J.D., Rizzo M. Prediction of driving ability with neuropsychological tests: demographic adjustments diminish accuracy. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2010. 16 (4): 679–686.

Chua E.C.-P., Yeo S.-C., Lee I.T.-G., Tan L.-C., Lau P., Tan S.S., Ho Mien I., Gooley J.J. Individual differences in physiologic measures are stable across repeated exposures to total sleep deprivation. *Physiol. Rep.* 2014. 2 (9): e12129.

Dorokhov V.B., Puchkova A.N., Taranov A.O., Tupitsyna T.V., Slominsky, P.A. Dementienko V.V. Circadian and sleep-related gene polymorphisms are associated with chronotypes and road accident history in professional bus drivers. *Neurosci. Meet. Plan. Society for Neuroscience, Washington, DC, 2015. Program № 167.30/V21.*

Goel N., Basner M., Rao H., Dinges D.F. Circadian rhythms, sleep deprivation, and human performance. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2013. 119: 155–190.

Hu Y., Shmygelska A., Tran D., Eriksson N., Tung J.Y., Hinds, D.A. GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. *Nature Communications*. 2016. 7:10448.

Johnson K., Patel S., Baur D., Edens E., Sherry P., Malhotra A., Kales S. Association of sleep habits with accidents and near misses in United States transportation operators. *Occup J. Environ. Med.* 2014. 56 (5): 510–515.

Laas K., Eensoo D., Paaver M., Lesch K.-P., Reif A., Harro J. Further evidence for the association of

- the NPSR1 gene A/T polymorphism (Asn107Ile) with impulsivity and hyperactivity. *J. Psychopharmacol.* 2015. 29 (8): 878–883.
- Lee M.L., Howard M.E., Horrey W.J., Liang Y., Anderson C., Shreeve M.S., O'Brien C.S., Czeisler C.A. High risk of near-crash driving events following night-shift work. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2016. 113 (1): 176–181.
- Nemoda Z., Szekely A., Sasvari-Szekely M. Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2011. 35 (8): 1665–1686.
- Neufang S., Geiger M.J., Homola G.A., Mahr M., Akhrif A., Nowak J., Reif A., Romanos M., Deckert J., Solymosi L., Domschke K. Modulation of prefrontal functioning in attention systems by NPSR1 gene variation. *Neuroimage* 2015. 114: 199–206.
- Pinsonneault J.K., Han D.D., Burdick K.E., Kataki M., Bertolino A., Malhotra A.K., Gu H.H., Sadee W. Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2011. 36 (8): 1644–1655.
- Ruland T., Domschke K., Schütte V., Zavorotnyy M., Kugel H., Notzon S., Vennwald N., Ohrmann P., Arolt V., Pfleiderer B., Zwanzger P. Neuropeptide S receptor gene variation modulates anterior cingulate cortex Glx levels during CCK-4 induced panic. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015. 25 (10): 1677–1682.
- Spaeth A.M., Goel N., Dinges D.F. Managing neurobehavioral capability when social expediency trumps biological imperatives. *Prog. Brain. Res.* 2012. 199: 377–398.
- Sullivan D., Pinsonneault J.K., Papp A.C., Zhu H., Lemeshow S., Mash D.C., Sadee W. Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene-gene-environment interaction. *Transl. Psychiatry* 2013. 3: e222.
- Tiwari A.K., Zai C.C., Sajeev G., Arenovich T., Müller D.J., Kennedy J.L. Analysis of 34 candidate genes in bupropion and placebo remission. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013. 16 (4): 771–781.
- Wagstaff A.S., Sigstad Lie J.A. Shift and night work and long working hours – a systematic review of safety implications. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 2011. 37 (3): 173–185.
- Ziermans T., Dumontheil I., Roggeman C., Peyrard-Janvid M., Matsson H., Kere J., Klingberg T. Working memory brain activity and capacity link MAOA polymorphism to aggressive behavior during development. *Translational psychiatry.* 2012. 2(2): e85.

Polymorphisms in Sleep and Cognitive Function Related Genes are Associated with Vehicle Crash History in Shift Working Bus Drivers

V. B. Dorokhov^{a, #}, A. N. Puchkova^{a, b}, A. O. Taranov^a, V. V. Ermolayev^c,
T. V. Tupitsyna, P. A. Slominsky^d, and V. V. Dementiyenko^e

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow

^bPushkin State Russian Language Institute; Moscow

^cMoscow State Pedagogical University, Moscow

^dInstitute of Molecular Genetics of RAS, Moscow

^eKotel'nikov institute of radio engineering and electronics of RAS, Moscow

[#]e-mail: vbdorokhov@mail.ru

Bus driving is a highly responsible profession. It requires constant engagement of attention and cognitive resources as well as vigilance and resistance to disruption of sleep rhythms. There is ongoing research of genetic correlates of these individual characteristics. The aim of this study is to search for possible connections between single nucleotide polymorphisms and the history of road traffic accidents in professional bus driving. 299 professional drivers working on rolling shifts with recorded history of traffic accidents took part in the study. Polymorphisms in circadian rhythm-, cognitive and emotional function-related genes were genotyped: *CLOCK* (rs12649507), *RORA* (rs1159814), *NPAS2* (rs4851377), *NPSR1* (rs324981), *PER3* (rs2640909), *DRD3* (rs6280), *SLC6A3* (rs6347), *DBH* (rs1611125). Significant associations for polymorphisms in *CLOCK*, *NPSR1* and *SLC6A3* with traffic crash parameters were found. We suppose that they are mediated by the difference in chronotype and sleep deprivation resistance for *CLOCK* and cognitive and emotional control for *NPSR1* and *SLC6A3* polymorphisms.

Keywords: genetic polymorphisms, single nucleotide polymorphisms, driving, shift work, road accidents, driving safety.