

В.В. Захаренков ¹, Н.И. Гафаров ¹, Н.И. Панев ¹, А.Н. Кучер ², М.Б. Фрейдин ², А.А. Рудко ²,
Т.К. Ядыкина ¹, А.С. Казицкая ¹

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЁРОВ ГЕНОВ У РАБОТНИКОВ УГЛЕДОБЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ КУЗБАССА, БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПЫЛЕВЫМ БРОНХИТОМ

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН (Новокузнецк)

² Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН (Томск)

Изучено распределение генотипов биохимических маркёров генов — HP, GC, EsD, AcP, генотипов по полиморфным вариантам генов, кодирующих ферменты биотрансформации GSTT1 (GST-θ1) и GSTM1 (GST-μ1) и NOS3 (полиморфизм VNTR4) у шахтёров, больных хроническим пылевым бронхитом, и лиц без этой профессиональной патологии. Показано, что обладатели генотипов EsD 1-2, AcP bb наиболее подвержены развитию хронического пылевого бронхита. Эндогенными факторами резистентности к этому заболеванию являются генотипы GC 1-1, EsD 1-1, AcP bc.

Ключевые слова: генетические маркёры, генотип, генетическая предрасположенность, резистентность

DISTRIBUTION OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC MARKERS OF GENES IN WORKERS OF COAL MINING ENTERPRISES OF KUZBASS REGION SUFFERING FROM CHRONIC DUST BRONCHITIS

V.V. Zakharenkov ¹, N.I. Gafarov ¹, N.I. Panev ¹, A.N. Kucher ², M.B. Freydin ², A.A. Rudko ²,
T.K. Yadikina ¹, A.S. Kazitskaya ¹

¹ Scientific Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS, Novokuznetsk

¹ Scientific Research Institute of Medical Genetics of Tomsk Scientific Center SB RAMS, Tomsk

Distribution of genotypes of biochemical markers of HP, GC, EsD, AcP genes, genotypes on polymorphic variants of the genes coding enzymes of biotransformation GSTT1 (GST-θ1) and GSTM1 (GST-μ1) and NOS3 (VNTR4 polymorphism) in the miners with chronic mechanic bronchitis, and in persons without this occupational pathology is investigated. It is shown that the owners of EsD 1-2, AcP bb genotypes are most subject to development of chronic mechanic bronchitis. Endogen factors of resistance to this disease are GC 1-1, EsD 1-1, AcP bc genotypes.

Key words: genetic markers, a genotype, genetic predisposition, resistance

ВВЕДЕНИЕ

Оценка роли экзогенных и эндогенных (генетических) факторов, способствующих развитию профессиональной патологии работающего населения, является актуальной проблемой современной медицины труда [1]. Хронический пылевой бронхит (ХПБ) — это особая форма воспаления бронхов в ответ на воздействие высоких концентраций угольно-породной пыли с развитием диффузных атрофических и склеротических изменений, сопровождающихся нарушением моторики бронхов и формированием дыхательной недостаточности [2]. В патогенезе ХПБ важную роль играет нарушение эвакуаторной и секреторной функции бронхов. При этом на эффективность очищения бронхов существенное влияние оказывают концентрация пыли в воздухе рабочей зоны, ее состав, дисперсность и плотность, общая масса, растворимость в биологических субстратах. Одним из способов снижения частоты этой профессиональной патологии является поиск факторов повышенного риска её развития, что позволяет формировать группы риска и проводить

своевременные и целенаправленные профилактические мероприятия [1].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

Обследовано 718 шахтёров в возрасте 40 — 59 лет, среди которых были выделены две группы: больные ХПБ — 649 человек, лица без этой профессиональной патологии — 69 человек (контроль). Все обследованные были русскими по национальной принадлежности и работали в одних и тех же санитарно-гигиенических условиях.

Материалом для исследования служили образцы венозной крови. Изучен полиморфизм четырех биохимических маркёров генов (гемоглобина — HP, группоспецифического компонента — GC, флуоресцентной эстеразы D — EsD, кислой фосфатазы эритроцитов — AcP) и трех молекулярно-генетических маркёров (полиморфизм по делеционному варианту генов биотрансформации ксенобиотиков — трансфераз GSTT1 (GST-θ1), GSTM1 (GST-μ1)), и VNTR-полиморфизм, локализованный в 4 интроне гена NOS3.

Полиморфизм биохимических маркёров определяли методом электрофореза в полиакриламидном и крахмальном геле [3]. Экстракцию ДНК проводили фенол-хлороформным методом [4]. Генотипирование для генов *GSTT1*, *GSTM1* и *NOS3* проводили с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции [5, 6]. Для кодоминантных генетических систем оценивали соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди – Вайнберга [7]. Статистическую значимость различий в распределении полиморфных вариантов между контрольной группой и больными лицами оценивали по критерию χ^2 с поправкой

Йетса на непрерывность. Об ассоциации разных генотипов с заболеванием судили по величине OR – отношению шансов [8] при уровне значимости $p \leq 0,05$. Вычисления проводили с помощью пакета программ «STATISTICA 6.0», а также по оригинальным программам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе шахтеров, больных ХПБ, и в контрольной группе по большинству изученных маркеров (*HP*, *GC*, *EsD*, *NOS3*) наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому исходя из равновесия Харди – Вайнберга (табл. 1, 2), за исключением локуса *AcP*, по которому показано

Таблица 1
Распределение генотипов и частот аллелей биохимических маркёров генов в группе больных хроническим пылевым бронхитом и у лиц контрольной группы

Локус	Генотипы	Сравниваемая группа		OR	CI	p_2
		Больные	Контроль			
<i>HP</i>	1-1	0,2327	0,1594	1,60	0,79–3,31	0,2178
	1-2	0,4622	0,4493	1,05	0,78–1,35	0,9374
	2-2	0,3051	0,3913	0,68	0,40–1,18	0,1830
	N	649	69			
	Частота аллеля Hr^2	0,5354	0,6159			
	χ^2 (d.f. = 1)	2,98; $p_1 > 0,05$	0,18; $p_1 > 0,05$			
<i>GC</i>	1-1	0,4946	0,6811	0,46	0,26–0,80	0,0048
	1-2	0,4037	0,2754	1,78	1,00–3,21	0,0515
	2-2	0,1017	0,0435	2,49	0,73–10,21	0,1786
	N	649	69			
	Частота аллеля Gc^2	0,3035	0,1812			
	χ^2 (d.f. = 1)	1,33; $p_1 > 0,05$	0,36; $p_1 > 0,05$			
<i>EsD</i>	1-1	0,5470	0,7523	0,39	0,21–0,72	0,0016
	1-2	0,3668	0,2029	2,28	1,20–4,39	0,0100
	2-2	0,0861	0,0435	2,07	0,60–8,55	0,3198
	N	627	69			
	Частота аллеля EsD^1	0,7305	0,8551			
	χ^2 (d.f. = 1)	2,94; $p_1 > 0,05$	2,27; $p_1 > 0,05$			
<i>AcP</i>	AA	0,0864	0,1449	0,56	0,26–1,23	0,1690
	AB	0,3744	0,3044	1,37	0,78–2,43	0,3106
	BB	0,3728	0,1739	2,82	1,43–5,67	0,0016
	AC	0,0528	0,0435	1,23	0,35–5,16	0,9638
	BC	0,0960	0,2754	0,28	0,15–0,53	$0,3 \cdot 10^{-5}$
	CC	0,0176	0,0579	0,29	0,08–1,12	0,0797
	N	625	69			
	Частота аллеля a	0,3000	0,3188			
	Частота аллеля b	0,6080	0,4638			
	χ^2 (d.f. = 3)	7,90; $p_1 < 0,05$	8,37; $p_1 < 0,05$			

Примечания: N – объём выборки; χ^2 -тест использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому исходя из равновесия Харди – Вайнберга; p_1 – уровень значимости; d.f. – число степеней свободы; OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал; p_2 – достигнутый уровень значимости значения χ^2 при сравнении различий в распределении генотипов между больными и здоровыми лицами.

Таблица 2

Распределение генотипов и частот аллелей молекулярно-генетических маркеров в группе больных хроническим пылевым бронхитом и у лиц контрольной группы

Локус	Генотипы	Сравниваемые группы		OR	CI	p_2
		Больные	Контроль			
GSTT1*	GSTT1+	0,8963	0,8929	1,04	0,22–4,28	0,7752
	GSTT1-	0,1037	0,1071	0,96	0,23–4,58	0,7752
	N	135	28			
	Частота аллеля q(-)	0,3220	0,3273			
GSTM1*	GSTM1+	0,4815	0,4286	2,17	0,86–5,49	0,1099
	GSTM1-	0,5185	0,5714	0,81	0,33–1,97	0,7623
	N	135	28			
	Частота аллеля q(-)	0,7201	0,7559			
NOS3	VNTR aa	0,0555	0,1071	0,49	0,10–2,68	0,5809
	VNTR ab	0,3426	0,2857	1,30	0,48–3,59	0,7303
	VNTR bb	0,6019	0,6072	0,98	0,38–2,47	0,8684
	N	108	28			
	Частота аллеля b	0,7731	0,75			
	χ^2 (d.f. = 1)	0,10; $p_1 > 0,05$	1,59; $p_1 > 0,05$			

Примечание: * – для локусов GSTT1 и GSTM1 генотипы, обозначенные «+», включают гомозиготы по нормальному аллелю и гетерозиготы по наличию делеции, «-» – гомозиготы по делеции; N – объём выборки; χ^2 -тест использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому исходя из равновесия Харди – Вайнберга; p_1 – уровень значимости; d.f. – число степеней свободы; OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал; p_2 – достигнутый уровень значимости значения χ^2 при сравнении различий в распределении генотипов между больными и здоровыми лицами.

статистически значимое отклонение от равновесия Харди – Вайнберга в обеих изученных группах (табл. 1). В то же время по всем изученным маркерам в обследованных выборках частоты аллелей и генотипов находились в границах значений, показанных для европеоидного русского населения РФ и Сибири [9, 10].

Статистически значимые различия по частотам генотипов между группой больных ХПБ и контролем зарегистрированы только для трех локусов (табл. 1): GC ($\chi^2 = 9,06$; d.f. = 2; $p = 0,011$), EsD ($\chi^2 = 10,82$; d.f. = 2; $p = 0,004$) и AcP ($\chi^2 = 32,45$; d.f. = 5; $p < 0,001$). По локусу GC у больных ХПБ частота генотипа 1-1 регистрировалась на 18,66 % реже, а генотипа 1-2 – почти в 1,5 раза чаще, чем в контроле. По локусу EsD в контрольной группе частота генотипа 1-1 регистрировалась на 20,53 % чаще, а генотипы 1-2 и 2-2 встречались реже (в 1,8 и 2,0 соответственно), чем в группе больных ХПБ. Что касается локуса AcP, то наиболее выраженные различия между сравниваемыми группами регистрировались по частотам генотипов bb (в 2,1 раза чаще регистрировался у больных) и bc (в 2,9 раза чаще регистрировался у лиц контрольной группы).

Согласно величинам показателя OR (табл. 1), можно заключить, что протективным действием к заболеванию ХПБ обладают генотипы GC 1-1 (OR = 0,46; $p = 0,005$), EsD 1-1 (OR = 0,39; $p = 0,002$) и AcP bc (OR = 0,28; $p = 0,3 \times 10^{-5}$), а к генотипам предрасположенности относятся EsD 1-2

(OR = 2,28; $p = 0,01$), AcP bb (OR = 2,82; $p = 0,002$), а также с некоторой долей условности генотипа GC 1-2, для которого уровень статистической значимости приближается к критическому значению (OR = 1,78; $p = 0,0515$).

Интересным представляется тот факт, что в ряде случаев были зарегистрированы различия по распределению частот генотипов между двумя возрастными группами больных ХПБ – 40 – 49 лет и 50 – 59 лет. В частности, статистически достоверно различались распределения генотипов по локусам EsD ($\chi^2 = 45,45$; d.f. = 2; $p = 0,000$) и Gc ($\chi^2 = 99,02$; d.f. = 2; $p = 0,000$), для которых была показана ассоциация с ХПБ при сравнении групп больных лиц и контроля, а также по локусу HP ($\chi^2 = 24,42$; d.f. = 2; $p = 0,000$). Причем, для первых из указанных локусов в старшей возрастной группе протективный генотип регистрировался чаще, а генотип риска – реже, чем в младшей возрастной группе. Возможно, что генотипы EsD 1-2 и GC 1-2, предрасполагающие к развитию ХПБ, действуют в возраст-зависимой манере, т.е. наличие данного генотипа способствует риску развития патологии у индивидов в более молодом возрасте, либо более тяжелому течению заболевания. Это приводит к изменению генотипической структуры в старшей возрастной группе больных ХПБ вследствие выбывания работников с предприятия по состоянию здоровья. По локусу HP не было зарегистрировано статистически значимых различий в распределении частот генотипов между

лицами контрольной группы и больными ХПБ. В то же время наблюдалось перераспределение генотипов между возрастными группами больных ХПБ: в старшей возрастной группе, по сравнению с младшей, чаще регистрировались лица с генотипом *HP 2-2* и реже — с генотипом *HP 1-1*. Возможно, не влияя существенно на риск развития ХПБ, данный локус может определять характер течения данного заболевания. По локусу *ACP*, несмотря на различия в распределения частот генотипов между больными ХПБ и контролем между возрастными когортами статистически значимых различий зарегистрировано не было ($\chi^2 = 2,99$; d.f. = 2; $p = 0,225$). Это позволяет предположить, что данный локус определяет риск развития заболевания, но не характер его течения.

Биохимические маркеры, по которым установлены статистически значимые различия по распределению генотипов между группой больных ХПБ и контрольной группой, вовлечены в регуляцию различных биохимических процессов. В представленном исследовании неожиданным оказался тот факт, что ни один из проанализированных молекулярно-генетических маркёров не показал ассоциации с ХПБ у шахтеров. У лиц с наличием «нулевых» генотипов по генам *GSTM1* и *GSTT1* отсутствует ферментативная активность соответствующих трансфераз, задействованных во второй фазе детоксикации. Однако с учетом того, что в этой фазе биотрансформации участвует более 200 ферментных систем, которые в определенной степени взаимозаменяют друг друга, можно предположить, что отсутствие ферментов, кодируемых *GSTM1* и *GSTT1*, компенсируется другими системами.

Не было также обнаружено статистически достоверных различий по частотам генотипов *VNTR* между лицами с наличием гипертензии и отсутствием её ни среди больных антракосиликозом, ни по сравнению с контрольной группой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В патогенезе профессиональных заболеваний лёгких у шахтёров-угольщиков большую роль играют условия труда и стаж работы во вредных условиях. Кроме того, определённый вклад в развитие профессиональной патологии вносят и эндогенные факторы, в частности генетический статус организма. Анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы:

1. Эндогенными факторами риска развития ХПБ у шахтёров-угольщиков юга Кузбасса является наличие маркёров *EsD 1-2*, *AcPbb*. Генотип *GC 1-2*

имеет положительную ассоциативную связь с этим заболеванием.

2. Эндогенными факторами резистентности к ХПБ является наличие генотипов *GC 1-1*, *EsD 1-1*, *AcP bc*.

3. В старшей возрастной группе больных лиц в большинстве случаев наблюдается пониженная частота генотипов риска и повышенная частота генотипов резистентности. Это может указывать на естественный профессиональный отбор по чувствительности к воздействию неблагоприятных факторов при подземной добыче угля. Обладатели генотипов риска быстрее выбывают с производства вследствие развития у них профессионального заболевания, а в старшей возрастной группе накапливаются генотипы резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейр Б. Анализ генетических данных. — М.: Мир, 1995. — 400 с.
2. Генофонд и геногеография народонаселения. Т.1. Генофонд населения России и сопредельных стран / под ред. Ю.Г. Рычкова. — СПб.: Наука, 2000. — 611 с.
3. Измеров Н.Ф., Каспаров А.А. Медицина труда. Введение в специальность. — М.: Медицина, 2002. — 392 с.
4. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
5. Прокоп О., Гелер В. Группы крови человека: пер. с нем. — М.: Медицина, 1991. — 511 с.
6. Пузырёв В.П., Фрейдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека. — Томск: Печатная мануфактура, 2007. — 320 с.
7. Хронический бронхит. — Режим доступа: <http://mshealthy.com.ua/disease-art-hron-bronhitis.htm>.
8. Endothelial nitric synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in alpha-1-antitrypsin deficiency / A. Novoradovsky [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. — 1999. — Vol. 20. — P. 441 — 447.
9. Polymorphisms at the glutathione-S-transferase *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* loci: risk of ovarian cancer by histological subtype / A.B. Spurdle [et al.] // Carcinogenesis. — 2001. — Vol. 22. — P. 67 — 72.
10. Pearce N. What does the odds ratio estimate in case-control study? // Int. J. Epidemiol. — 1993. — Vol. 26, N 6. — P. 1189 — 1192.

Сведения об авторах

Захаренков Василий Васильевич — доктор медицинских наук, академик РАЕН, директор Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН

Гафаров Николай Исмаилович — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории популяционной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел.: 8 (3843) 79-66-05; e-mail: genlab_nk@mail.ru)

Панев Николай Иванович – кандидат медицинских наук, руководитель отдела медицины труда Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН

Кучер Аксана Николаевна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН

Фрейдин Максим Борисович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН

Рудко Алексей Анатольевич – кандидат медицинских наук, главный врач генетической клиники Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН

Ядыкина Татьяна Константиновна – научный сотрудник лаборатории популяционной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН

Казицкая Анастасия Сергеевна – биолог лаборатории популяционной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН