

Н.И. Гафаров, В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин, Н.И. Панев

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ У ШАХТЕРОВ-УГОЛЬЩИКОВ, СТРАДАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИМ ПЫЛЕВЫМ БРОНХИТОМ

ГУ НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН, Новокузнецк,
ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, Томск

Изучен ряд биохимических (HP, GC, AcP, EsD, PI) и молекулярно-генетических (GSTT1, GSTM1, NOS3) маркеров и их сочетаний у шахтеров-угольщиков, страдающих хроническим пылевым бронхитом. Предрасположены к развитию болезни обладатели генотипа M1M2 ингибитора протеаз PI, генотипов AcPab, AcP bb, возможно, EsD 11. Резистентны к хроническому пылевому бронхиту обладатели генотипа M1M1 системы PI, возможно, HP 22.

Ключевые слова: генетические маркеры, генотип, генетическая предрасположенность, резистентность.

Приоритетными направлениями научных исследований в ГУ НИИ КППЗ СО РАМН являются исследования по оценке риска для здоровья работающего населения Сибири от воздействия неблагоприятных экологических и производственных факторов с целью научного обоснования мероприятий, направленных на сохранение здоровья работающего населения. Кузбасс — это основной угледобывающий регион России. Наиболее высокий уровень профессиональной патологии регистрируется в горнорудной и угольной промышленности. В структуре профессиональной заболеваемости болезни органов дыхания занимают одно из первых мест. Наряду с таким способом снижения профессиональной заболеваемости, как исключение неблагоприятного производственного фактора, провоцирующего развитие болезни, важное место занимает разработка методов первичной профилактики, основанной на изучении наследственной предрасположенности к профессиональным болезням. Это также является одним из приоритетных направлений современной медицины [5].

Поиск и анализ ассоциаций различных генетических маркеров с заболеваниями весьма актуальны и перспективны, так как это дает возможность судить об участии наследственных факторов в развитии того или иного заболевания [3, 6]. В свою очередь, частота встречаемости подобных ассоциаций указывает на значимость данного признака в развитии патологического процесса. Вместе с тем такие исследования позволяют выявить среди населения группы лиц с фенотипами повышенного риска к отдельным заболеваниям,

а это дает возможность разработки системы профотбора и определения мер профилактики [1, 2].

Цель настоящей работы — изучить генетический статус по совокупности биохимических маркеров (HP, PI, GC, AcP, EsD) и полиморфизм генов-кандидатов заболеваний органов дыхания (GSTT1, GSTM1, NOS3) у больных хроническим пылевым бронхитом и у здоровых лиц.

Материалы и методы

Обследовались работники угледобывающих шахт Юга Кузбасса. Возраст обследованных рабочих колебался от 40 до 65 лет. Большую часть (более 90%) составляли русские, из других национальностей в наибольшей степени были представлены украинцы, татары, немцы, шорцы. Основное профессиональное заболевание — хронический пылевой бронхит (ХПБ), в ряде случаев сочетающийся с вибрационной болезнью и нейросенсорной тугоухостью. Из мультифакториальных заболеваний часто встречались такие болезни, как гипертония, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, заболевания желудочно-кишечного тракта, неврологическая патология.

Материалом для исследования служили образцы венозной и капиллярной крови, результаты исследований функции дыхания, показатели состава крови и др. Методом электрофореза и изоэлектрофокусирования типировались сывороточные белки гаптоглобин HP, группоспецифический компонент GC, ингибитор протеаз α -1-антирипсин PI; эритроцитарные изоферменты: флуоресцентная эстераза EsD, кислая фосфатаза AcP [8, 9, 10]. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) изучался полиморфизм

сайтов GSTT1, GSTM1, NOS3. Выделение ДНК для ПЦР проводилось в лаборатории популяционной генетики ГУ НИИ КППЗ, дальнейшие операции (амплификация образцов, разделение и типирование фрагментов ДНК) проводились сотрудниками НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН г. Томска под руководством д-ра мед. наук, профессора В.П. Пузырева.

Для оценки различий в распределении генотипов у больных и здоровых лиц применяли критерий хи-квадрат по формуле:

$$\chi^2 = [N(ad-bc)^2] / [(a+b)(a+c)(b+d)(c+d)],$$

где a – больные, носители генотипа, b – здоровые, носители генотипа, c – больные, не несущие генотипа, d – здоровые, не несущие генотипа, N – общее число обследованных лиц.

О силе ассоциации между изучаемыми маркерами и болезнью судили по критерию относительного риска. Относительный риск (RR) показывает, во сколько раз чаще болезнь развивается у лиц с наличием данного генотипа по сравнению с теми, у которых он отсутствует:

$$RR = [fh(I - fk)] / [fk(I - fn)],$$

где fh – фракция носителей генотипа среди больных, fk – фракция носителей генотипа в контрольной группе.

Значение RR более единицы свидетельствует о положительной ассоциативной связи с заболеванием; при $RR \geq 2$ значение его считается статистически значимым (при условии $\chi^2 \geq 3,841$). При $\chi^2 \geq 3,841$ и $RR < 1$ это служит указателем резистентности обладателя данного генотипа к изучаемой патологии. Для кодоминантных систем просчитывали значение χ^2 на соответствие эмпирического распределения генотипов теоретическому [4, 7].

Результаты и обсуждение

По системе HP изучено 658 человек в основной группе и 49 – в контроле (Таблица 1). Не обнаружено статистически значимых различий между частотами генотипов у здоровых и больных лиц в целом по выборке. Можно отметить

градуальное уменьшение частоты генотипа HP 11 с 0,26 до 0,1077 и параллельное увеличение частоты генотипа HP 22 с 0,28 до 0,5231, т.е. почти вдвое. Вероятно, генотип HP 22 можно считать протекторным, т.к. значение $\chi^2=3,54$, т.е. близко к пороговому, а $RR=0,57$.

По системе GC изучено 663 человека в основной группе и 52 – в контроле. Наблюдается достоверно высокая гетерогенность генотипов GC в этой выборке. Хотя статистически достоверных различий по частотам генотипов между больными и здоровыми не обнаружено, можно отметить увеличение частоты наиболее распространенного генотипа GC 11 с возрастом у больных лиц и параллельное снижение частоты GC 22.

По системе EsD (Таблица 2) изучено 655 человек в основной группе и 49 – в контроле. Оказалось, что генотип EsD 11 имеет положительную ассоциативную связь с ХПБ ($\chi^2=36,72$, $RR=1,73$).

По системе PI в целом было изучено 433 человека в основной группе, в качестве контроля были взяты жители города Новокузнецка, не страдающие профессиональными заболеваниями, – 2029 человек. Протекторным генотипом является PI M1M1 ($\chi^2=22,34$, $RR=0,61$), а генотипом предрасположенности – PI M2M2 ($\chi^2=20,03$, $RR=2,65$). Следует отметить, что с возрастом частота аллеля M1 увеличивается с 0,5811 до 0,8335, а частота M2 и M3 снижается. Особенно резко падает частота редкого аллеля R (от 0,1102 до 0) и редких генотипов MR (Рис. 1).

По системе AcP было изучено 655 человек в основной группе и 52 – в контроле. Генотипами резистентности к ХПБ оказались редкие генотипы AcP aa, AcP ac и AcP bc. Генотипами предрасположенности к ХПБ оказались AcP ab и AcP bb – наиболее представленные по частотам в выборке и больных, и здоровых лиц. Это довольно необычно, т.к. отбор в данном случае идет не в пользу наиболее распространенных генотипов, а против них, в пользу редких генотипов.

Таблица 1

Распределение генотипов гаптоглобина HP у лиц разного возраста, страдающих хроническим пылевым бронхитом

Возраст, лет	Генотипы			N	q1	S	χ^2 X-B
	11	12	22				
до 51	0,26	0,46	0,28	300	0,49	0,0204	1,92
51-61	0,1467	0,4574	0,3959	293	0,3754	0,02	0,18
от 61	0,1077	0,3692	0,5231	65	0,2923	0,0399	0,7
Σ	0,1945	0,4498	0,3557	658	0,4194	0,0136	3,85
Контроль	0,1428	0,3673	0,4899	49	0,3265	0,0474	1,37
χ^2	0,79	1,26	3,54	–	–	–	–
RR	1,45	1,41	0,57	–	–	–	–

Примечание к таблицам: q – частота аллеля, S – ошибка частоты, N – размер выборки, χ^2 X-B – значение хи-квадрат-теста на соответствие эмпирического и теоретического распределения генотипов, исходя из правила Харди – Вайнберга.

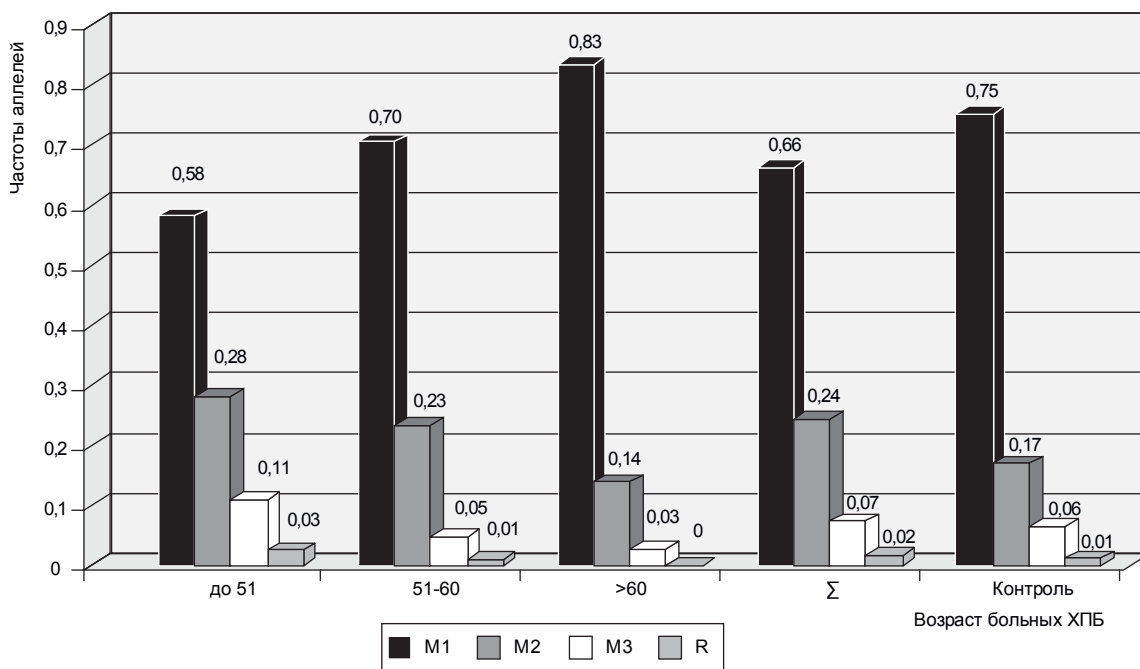


Рис. 1. Распределение частот аллелей ингибитора протеаз PI у больных ХПБ и в контроле

Полиморфизм глутатион-S-трансферазы θ_1 (GSTT1) был изучен у 137 рабочих основной группы и у 28 – в контроле. Не обнаружено статистически достоверных различий в частотах полиморфизмов между больными и здоровыми, хотя частота нулевого фенотипа у больных ниже, чем у здоровых (0,0949 против 0,1429). У лиц основных профессий (проходчики, горнорабочие очистного забоя, машинисты комбайнов) частота этого же фенотипа снижена почти в три раза при

сравнении выборки лиц в возрасте до 50 лет, 50 лет и старше, что может быть связано с жестким отбором против носителей нулевых гомозигот. Сходная картина наблюдается у некурящих, страдающих ХПБ. В целом частота нулевого фенотипа с возрастом снижается.

Полиморфизм глутатион-S-трансферазы μ_1 (GSTM1) был изучен у 137 человек в основной группе и у 28 – в контроле. По этой системе также не было обнаружено статистически значимых

Таблица 2

Распределение генотипов флуоресцентной эстеразы EsD у лиц разного возраста, страдающих хроническим пылевым бронхитом

Возраст, лет	Генотипы EsD			N	q1	S	χ^2 X-B
	11	12	22				
до 51	0,7584	0,1879	0,0537	298	0,8524	0,0145	19,11
51-61	0,8213	0,1478	0,0309	291	0,8952	0,0127	13,12
от 61	0,8636	0,1364	0,0000	66	0,9318	0,0219	0,14
Σ	0,7969	0,1649	0,0382	655	0,8794	0,0089	32,68
Контроль	0,6939	0,2449	0,0612	49	0,8163	0,0391	4,63
χ^2	36,72	2,06	0,63	—	—	—	—
RR	1,73	0,61	0,61	—	—	—	—

Таблица 3

Частота сочетаний полиморфизмов GSTT1 и GSTM1 у больных хроническим пылевым бронхитом и в контроле

Фенотипы	Группы		N
	GSTT1 (+)	GSTT1 (-)	
GSTM1(+)	ХПБ	0,4191	65
	Контроль	0,3929	12
GSTM1(-)	ХПБ	0,4853	71
	Контроль	0,0714	16
Всего изучено, человек			164

различий между основной и контрольной группами, а также между курящими и некурящими лицами, основными и вспомогательными профессиями. В целом частота нулевого фенотипа с возрастом также снижается.

При исследовании полиморфизма сайта WNTR гена синтазы оксида азота NOS3 (120 человек в основной группе и у 128 — в контроле) также не было обнаружено статистически достоверных различий в частотах генотипов больных и здоровых лиц. Не выявлено связи с курением или основными и вспомогательными профессиями. Вероятно, эта система также не имеет отношения к развитию ХПБ.

Изучение сочетаний генотипов отдельных систем также не выявило достоверных различий по их частотам у здоровых и больных, даже при сочетаниях генотипов риска PI M2M2, AcP ab, AcP bb с другими маркерами. Анализ сочетаний глутатионтрансфераз GSTT1 и GSTM1 также не выявил таких различий (Таблица 3). Можно отметить повышенную частоту сочетаний (+ +) у больных по сравнению с контролем, и, наоборот, сниженную частоту (— —) сочетаний фенотипов у больных, что может указывать на отбор против двойных нулевых гомозигот по этим полиморфизмам. Но при анализе по возрасту частота этих двойных гомозигот даже возрастала, поэтому в данном случае мы не можем говорить о прямой связи изученных полиморфизмов с развитием ХПБ.

Заключение

При изучении биохимических и молекулярно-генетических маркеров и их сочетаний у шахтеров-угольщиков, страдающих хроническим пылевым бронхитом, было показано, что предрасположены к развитию ХПБ лица с генотипами M1M2 ингибитора протеаз PI, AcP ab и AcP bb кислой фосфатазы эритроцитов, и возможно, EsD 11 флуоресцентной эстеразы. Резистентны к ХПБ лица с генотипами M1M1 системы PI, и возможно, HP 22 системы гаптоглобина. По остальным изученным генетическим системам не было обнаружено статистически значимых различий между здоровыми и больными людьми, что указывает на то, что эти системы прямо не связаны с развитием хронического пылевого бронхита. Тем не менее, по некоторым системам (AcP, HP, GC, EsD, PI) наблюдалось градуальное увеличение частоты наиболее распространенных генотипов параллельно с увеличением возраста пациентов, что требует дальнейшего детального анализа.

Полученные результаты можно использовать в системе профилактики развития этой профессиональной патологии у рабочих угольной промышленности.

DISTRIBUTION OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN MINERS SUFFERING FROM CHRONIC MECHANIC BRONCHITIS

N.I. Gafarov, V.P. Puzugov, M.B. Freidin, N.I. Panev

The number of biochemical (HP, GC, AcP, EsD, PI) and molecular-genetic (GSTT1, GSTM1, NOS3) markers and their combinations are investigated in miners suffering from chronic mechanic bronchitis. The subjects having M1M2 genotype of inhibitor of PI proteases, AcP ab, AcP bb genotypes, and probably of EsD 11 are predisposed to the disease development. The subjects with M1M1 genotype of PI system, and perhaps with HP 22 are resistant to chronic mechanic bronchitis.

Литература

1. Артамонова, В.Г. Профессиональные болезни / В.Г. Артамонова В.Г., В.Н. Шаталова В.Н. — М., 1996. — 431 с.
2. Дидковский, Н.А. Наследственные факторы и местная защита при неспецифических заболеваниях легких / Н.А. Дидковский, Л.И. Дворецкий. — М., 1990. — 224 с.
3. Дранник, Г.Н. Генетические системы крови человека и болезни / Г.Н. Дранник, Г.М. Дизик. — Киев, 1990. — 197 с.
4. Животовский, Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях / Л.А. Животовский // Итоги науки и техники. Общая генетика. Т. 8. — М., 1983. — С. 76-104.
5. Измеров, Н.Ф. Охрана здоровья рабочих и профилактика профессиональных заболеваний на современном этапе / Н.Ф. Измеров // Медицина труда и промышленная экология. — 2002. — № 1. — С. 1-7.
6. Кузнецов, М.Ф. Генетический скрининг маркеров индивидуальной чувствительности к действию биологических факторов / М.Ф. Кузнецов, В.Г. Артамонова // Медицина труда и промышленная экология. — 1993. — № 9-10. — С. 12-15.
7. Ли, Ч. Введение в популяционную генетику: Пер. с англ. / Ч. Ли. — М., 1978. — 556 с.
8. Прокоп, О. Группы крови человека: Пер. с нем. / О. Прокоп, В. Геллер. — М., 1991.
9. Спицын, В.А. Биохимический полиморфизм человека / В.А. Спицын. — М., 1985. — 214 с.
10. Троицкий, Г.В. Изоэлектрофокусирование белков в самоорганизующихся и искусственных рН-градиентах / Г.В. Троицкий, Г.В. Ажицкий. — Киев, 1984. — 220 с.