

В.В. Захаренков, Н.И. Гафаров, И.В. Виблая

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ GSTT1 И GSTM1 У РАБОТНИКОВ ЦВЕТНОЙ МЕТАЛЛУРГИИ, БОЛЬНЫХ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ФЛЮОРОЗОМ**ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (Новокузнецк)**

Целью настоящей работы было изучение генетических факторов риска развития профессионального флюороза у работников Новокузнецкого алюминиевого завода, наличие которых связано как с риском развития профессионального флюороза, так и с резистентностью к нему. Обследовано 79 лиц мужского пола, работающих на Новокузнецком алюминиевом заводе ООО «РУСАЛ», в возрасте от 35 до 60 лет. Контрольная группа (212 человек) включала практически здоровых лиц, работающих на этом же предприятии и не болеющих флюорозом. Материалом для исследования служили образцы венозной крови. Изучали полиморфизм по нуль-аллелям генов, кодирующих трансферазы 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков – GSTT1 и GSTM1. В представленной работе образцы ДНК выделяли фенол-хлороформным методом, проводили полимеразную цепную реакцию и электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле, а полученные продукты визуализировали в ультрафиолетовом свете. Частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц сравнивали, используя критерий χ^2 , с поправкой Йетса на непрерывность. Об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с заболеванием судили по величине отношения шансов (OR). Значения частот фенотипов и аллелей в изученной нами выборке работников алюминиевого завода были сопоставимы с уже опубликованными ранее данными по Российской Федерации и Сибирскому федеральному округу. Анализ различий по частотам генотипов между больными флюорозом и лицами контрольной группы с использованием критериев χ^2 и OR показывает, что наибольший вклад в риск развития этого заболевания вносят нулевой аллель гена GSTT1 (GSTT1(-)), а также «двойные нули» – сочетания GSTT1(-) и GSTM1(-). С другой стороны, наиболее резистентны к этому заболеванию обладатели генотипа GSTT1(+), а также сочетания генотипов GSTT1(+)/GSTM1(-). Полученные данные могут найти применение при формировании групп риска к развитию флюороза, для проведения своевременной диагностики и профилактики потерь здоровья работающего населения.

Ключевые слова: ранняя диагностика профессиональных заболеваний, генетические маркеры предрасположенности, флюороз

POLYMORPHISM OF GSTM1 AND GSTT1 GENES IN WORKERS OF FERROUS METALLURGY WITH PROFESSIONAL FLUOROSIS

V.V. Zakharenkov, N.I. Gafarov, I.V. Viblaya

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

The aim of the present work was to study genetic risk factors for the development of professional fluorosis in workers of Novokuznetsk aluminum factory, the presence of which is associated with the risk of professional dental fluorosis and resistance to it. The study involved 79 male workers of Novokuznetsk aluminum factory Ltd. "RUSAL" of 35–60 years. The control group (212 people) consisted of healthy individuals working for the same company and without fluorosis. The material for the study were the venous blood samples. Polymorphism of null-alleles of genes encoding transferase phase 2 biotransformation of xenobiotics – GSTT1 and GSTM1 was studied. In this study DNA was isolated by phenol-chloroform method performing polymerase chain reaction amplification products electrophoresed on agarose gel, and the products were visualized under ultraviolet light. The frequencies of alleles and genotypes in groups of patients and healthy subjects were compared using the χ^2 test with Yates correction for continuity. The association of different genotypes (or combinations thereof) was estimated by the magnitude of the disease odds ratio (OR). The frequencies of alleles and phenotypes in our sample were studied on an aluminum factory workers and were already comparable to previously published data on Russian Federation and Siberian federal district. Analysis of differences in genotype frequencies between patients with fluorosis and those of the control group using χ^2 criteria and OR shows that the largest contribution to the risk of developing the disease is making by null-allele of the GSTT1 gene (GSTT1(-)), as well as the "double zero" – a combination of GSTT1(-) and GSTM1(-). On the other hand the holders GSTT1(+) as well as combinations of genotypes GSTT1(+)/GSTM1(-) are the most resistant to this disease genotype. The obtained data can be used in the formation of risk groups for development of fluorosis, for timely diagnosis and prevention of loss of workers' health.

Key words: early diagnostics of occupational diseases, genetic markers of predisposition, fluorosis

В последние годы отмечается ухудшение медико-демографической ситуации в целом по России [7]. Разработка методов ранней диагностики начальных стадий профессиональных заболеваний и совершенствование критериев профессионального отбора является одной из приоритетных направлений медицины труда. По критериям ВОЗ физические, химические и биологически вредные производственные

факторы, если их воздействие превышает предельно допустимые уровни, рассматриваются как причинные факторы профессиональных заболеваний. Имеются убедительные данные о том, что при одинаковом воздействии неблагоприятных заболеваний возникает лишь у части лиц. Очевидно, вероятность возникновения заболевания под действием производственных факторов определяется, среди прочего, и эндоген-

ными причинами [2]. Весьма актуальными являются исследования по оценке риска нарушений здоровья от воздействия неблагоприятных экологических и производственных факторов с целью научного обоснования мероприятий, направленных на сохранение здоровья работающего населения [1, 9].

Важным направлением государственной политики является обеспечение права работника на труд без риска потери здоровья, что необходимо для сохранения трудового потенциала страны и её устойчивого экономического развития. Внедрение новых подходов и технологий в целях прогноза и профилактики профессиональных заболеваний является социально значимой задачей и одним из приоритетных направлений современной медицины труда.

Одним из перспективных способов снижения профессиональной заболеваемости является разработка методов оценки риска заболевания и своевременная профилактика, основанные на изучении наследственной предрасположенности к этим заболеваниям [2, 6]. Но именно эти направления до сих пор являются недостаточно проработанными в современной системе здравоохранения.

Как уже отмечалось, вероятность возникновения, особенности формирования и течение заболевания в значительной мере определяют эндогенные факторы [4]. Вместе с тем частота и тяжесть профессионального заболевания определяются не только интенсивностью и характером воздействия вредных производственных факторов, но и индивидуальной реактивностью. Современная концепция экогенетики объясняет различную резистентность к воздействию внешних факторов индивидуальными генетическими особенностями, в основе которых лежит генетический полиморфизм человека. Перспективным направлением для прогнозирования заболевания является изучение маркеров, наиболее часто встречающихся у больных лиц [13].

Цель настоящей работы – изучить генетические факторы риска развития профессионального флюороза у работников Новокузнецкого алюминиевого завода, наличие которых связано с риском развития профессионального флюороза и с резистентностью к нему.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 79 лиц мужского пола, в возрасте от 35 до 60 лет, работающих на ООО «НКАЗ» (Новокузнецкий алюминиевый завод ООО «РУСАЛ». Контрольная группа (212 человек) включала практически здоровых лиц, работающих на указанном предприятии и не болеющих флюорозом. Материалом для исследования служили образцы венозной крови. Изучали полиморфизм по нуль-аллелям генов, кодирующих трансферазы 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков, – GSTT1 и GSTM1.

Гены биотрансформации ксенобиотиков – группа генов, кодирующих ферменты деградации эндогенных и экзогенных веществ, являющихся токсичными для организма (ксенобиотики, продукты метаболизма арахидоновой кислоты, биогенные амины и т.д.). Изучение полиморфизма некоторых из этих генов в

связи с бронхиальной астмой показало, что так называемые «нулевые» аллели генов GSTT1 и GSTM1, связанные с делециями и, как следствие, с отсутствием функциональной активности соответствующего продукта гена, и полиморфные варианты генов NAT2 и CYP1A1, также кодирующие ферменты биотрансформации, являются существенными факторами риска бронхиальной астмы и других мультифакторных заболеваний [8].

Биотрансформация поступающих в организм ксенобиотиков включает несколько этапов, в которых прямо или косвенно задействовано более 200 ферментов [10]. Первая фаза обеспечивается, главным образом, цитохромами P-450, микросомальной эпоксигидролазой, эстеразой, амилазой, алькогольдегидрогеназой. Главная функция ферментов этой фазы заключается в присоединении гидрофильных групп к молекуле ксенобиотика и метаболической активации эндогенных веществ.

Ферменты II фазы биотрансформации, или фазы детоксикации, главным образом, трансферазы, превращают токсичные продукты метаболизма предшествующей фазы в водорастворимые нетоксичные соединения. Полиморфизм генов ферментов II фазы биотрансформации, например, глутатион-S-трансфераз (GSTT1 и GSTM1 соответственно), связывают с риском развития многих онкологических заболеваний [10, 14], бронхиальной астмы [3], других заболеваний.

В представленной работе образцы ДНК выделяли фенол-хлороформным методом, затем проводили полимеразную цепную реакцию и электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле [11]. Частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц сравнивали, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность [5]. Об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с заболеванием судили по величине отношения шансов (OR) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблицах 1 и 2 представлены полученные результаты по распределению генотипов GSTT1 и GSTM1 и их сочетаний у больных флюорозом и в контрольной группе. В целом значения частот фенотипов и аллелей были сопоставимы с уже опубликованными данными по Российской Федерации [12].

Анализ частот генотипов у больных флюорозом и контрольной группы показывает, что наибольший вклад в риск развития этого заболевания вносит нулевой аллель гена GSTT1. Это следует в первую очередь из результатов таблицы 1, где статистически значимые значения χ^2 , OR и p были определены именно для этого гена. Из таблицы 2 следует, что высокий риск развития флюороза имеет место у обладателей «двойных нулей» по генам GSTT1 и GSTM1.

С другой стороны, резистентность к развитию флюороза в значительной мере связана с наличием нормального аллеля гена GSTT1(+). Обладатели генотипа GSTT1(+), а также сочетания генотипов GSTT1(+)/GSTM1(-) резистентны к развитию профессионального флюороза. Удивительным кажется факт, почему не являются резистентными к разви-

Таблица 1

Распределение частот генотипов глутатионтрансфераз GSTT1 и GSTM1 у больных флюорозом и в контрольной группе

Контингент обследованных лиц	Генотипы GSTT1		N	Генотипы GSTM1		N
	GSTT1(+)	GSTT1(-)		GSTM1(+)	GSTM1(-)	
Больные лица	0,5301	0,4699	79	0,3523	0,6477	79
Контрольная группа	0,8929	0,1071	212	0,4286	0,5714	212
χ^2	43,4	43,4	-	1,04	1,04	-
OR	0,14	7,24	-	0,73	1,37	-
p	0	0	-	0,31	0,31	-

Примечание (здесь и в табл. 2): χ^2 – значение хи-квадрат-теста на различие частот генотипов между больными флюорозом и лицами контрольной группы; OR – отношение шансов; p – уровень значимости различий между частотами фенотипов.

Таблица 2

Распределение частот сочетаний генотипов глутатионтрансфераз GSTT1 и GSTM1 у больных флюорозом и в контрольной группе

Контингент обследованных лиц	Сочетания генотипов GSTT1 и GSTM1				N
	GSTT1(+)/GSTM1(+)	GSTT1(+)/GSTM1(-)	GSTT1(-)/GSTM1(+)	GSTM1(-)/GSTT1(-)	
Больные лица	0,329	0,190	0,202	0,279	79
Здоровые лица	0,391	0,358	0,179	0,072	212
χ^2	0,71	6,85	0,08	20,54	
OR	0,76	0,42	1,16	5,07	
p	0,40	0,01	0,77	$5 \cdot 10^{-6}$	

тию заболевания обладатели сочетания GSTT1(+)/GSTM1(+), т.е. гомозиготы по нормальному аллелю. Частота сочетания GSTT1(-)/GSTM1(+) у больных лиц и в контрольной группе также сходны (табл. 2). Возможно, это связано с тем, что, как уже упоминалось [10], в процессах биотрансформации ксенобиотиков задействовано большое количество ферментов, и разные сочетания их форм могут обуславливать разную реактивность организма на воздействие ксенобиотиков. В этом случае лишь для ряда полиморфизмов выявляется статистический характер связи с риском развития или, наоборот, с резистентностью к ряду заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие фтора и фторидов на организм имеет сложный и комплексный характер, и система ферментов биотрансформации ксенобиотиков имеет самое прямое отношение к этому. Результаты проведенного исследования показали, что наличие нуль-аллелей гена GSTT1 у работников основных профессий в производстве алюминия является фактором риска развития у них флюороза. Сочетание нуль-аллелей генов GSTT1 и GSTM1 также является фактором риска развития этого заболевания. Наличие же нормального аллеля (GSTT1(+)) и сочетание GSTT1(+)/GSTM1(-) является фактором резистентности к развитию профессионального флюороза. Полученные данные могут найти применение при формировании групп риска к развитию флюороза, для проведения своевременной диагностики и профилактики потерь здоровья работающего населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонова В.Г. Актуальные проблемы промышленной экологии и профилактики профессиональных заболеваний // Вестник РАМН. – 1998. – № 1. – С. 38–42.
2. Артамонова В.Г., Кузнецов М.Ф. Генетический скрининг маркеров индивидуальной чувствительности к действию биологических факторов // Медицина труда и промышленная экология. – 1993. – № 9–10. – С. 12–15.
3. Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В. и др. Ассоциация полиморфных ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме с наследственной отягощенностью и без таковой // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 539–545.
4. Вавилин В.А., Часовникова О.Б., Ляхович В.В. и др. Генетический полиморфизм глутатион-S-трансферазы M1 и T1 у детей, больных бронхиальной астмой // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 388–397.
5. Вейр Б. Анализ генетических данных. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
6. Захаренков В.В., Гафаров Н.И., Панев Н.И., Кучер А.Н. и др. Распределение биохимических и молекулярно-генетических маркеров генов у работников угледобывающих предприятий Кузбасса, больных хроническим пылевым бронхитом // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 1. – С. 93–97.
7. Здоровье населения региона и приоритеты здравоохранения / под ред. О.П. Щепина, В.А. Медика. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с.

8. Иванов В.П., Полоников А.В., Солодилова М.А., Белугин Д.А. Некоторые результаты молекулярно-генетических исследований при мультифакториальной патологии // Генетика человека и патология: Сб. науч. тр.; под ред. В.П. Пузырёва. – Томск: Печатная мануфактура, 2007. – Вып. 8. – С. 74–79.
9. Измеров Н.Ф., Каспаров А.А. Медицина труда. Введение в специальность: пособие для последипломной подготовки. – М.: Медицина, 2002. – 292 с.
10. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гуткина Н.И. и др. Гены и ферменты системы метаболизма ксенобiotиков в онкопатологии // Вопросы медицинской химии. – 1997. – Т. 43. – № 5. – С. 330–338.
11. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
12. Пузырёв В.П., Фрейдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. – 320 с.
13. Спицын В.А. Экологическая генетика человека. – М.: Наука, 2008. – 503 с.
14. Alexandrie A.-K., Sundberg M.I., Seidegard J. et al. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study of host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types // Carcinogenesis. – 1994. – Vol. 15 (9). – 1785–1790.
15. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? // Int. J. Epidemiol. – 1993. – Vol. 26, N 6. – P. 1189–1192.

Сведения об авторах

Захаренков Василий Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел.: 8 (3843) 796-979; e-mail: zacharenkov@nvkz.kuzbass.net)

Гафаров Николай Исмаилович – кандидат биологических наук, руководитель лаборатории популяционной генетики ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел.: 8 (3843) 796-605; e-mail: genlab_nk@mail.ru)

Вибляя Ирина Викторовна – доктор медицинских наук, руководитель лаборатории информатизации здравоохранения ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел.: 8 (3843) 796-757; e-mail: viv.ds@yabdex.ru)