

Н.И. Гафаров

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЁРОВ У РАБОТНИКОВ ЦВЕТНОЙ МЕТАЛЛУРГИИ, БОЛЬНЫХ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ФЛЮОРОЗОМ: СЫВОРОТОЧНЫЕ БЕЛКИ И ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ ИЗОФЕРМЕНТЫ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (Новокузнецк)

Цель настоящей работы – изучение ассоциации биохимических маркеров генов с риском развития профессионального и производственно обусловленного флюороза у работающих на предприятии алюминиевой промышленности.

Обследовано по разным полиморфным генетическим системам от 303 до 387 работников Новокузнецкого алюминиевого завода (НКАЗ). Основную группу составили лица, больные флюорозом, проходившие обследование в клинике ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН. Контрольную группу (110 человек) составили практически здоровые лица тех же специальностей, работающие на НКАЗ, но без диагноза этого профессионального заболевания.

Изучались сывороточные белки гаптоглобин (HP), группоспецифический компонент GC, кислая фосфатаза эритроцитов AcP, флуоресцентная эстераза EsD, ингибитор протеаз α -1-антитрипсин AAT. Материалом для исследования служили образцы венозной крови. Исследование проводилось с применением метода электрофореза в полиакриламидном и крахмальном гелях с последующим гистохимическим окрашиванием электрофореграмм. Варианты ингибитора протеаз α -1-антитрипсина (AAT) разделяли методом изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле. Для анализа ассоциации маркеров исследуемых генов с риском развития (или с резистентностью к развитию) флюороза использовались критерии χ^2 и OR.

Установлено, что варианты AcP aa, AcP bb, AcP bc, EsD 2-2, PI M3M3, а также сочетания GC(1-1) + PI(MR), GC(1-1) + PI(M3M3), PI(MR) + EsD(2-2), GC(1-1) + PI(M2M3), EsD(2-2) + AcP aa, GC(1-1) + EsD(2-2) относятся к генотипам риска развития флюороза. Выявлены 2-компонентные сочетания генотипов, также ассоциированные с повышенным риском развития профессионального флюороза: GC(1-1) + PI(MR), GC(1-1) + PI(M3M3), PI(MR) + EsD(2-2); GC(1-1) + PI(M2M3), EsD(2-2) + AcP aa; GC(1-1) + EsD(2-2). К трехкомпонентным сочетаниям относятся генотипы GC(1-1) + PI(MR) + AcP aa и GC(1-1) + EsD(2-2) + AcP cc. Генотипами резистентности являются варианты: PI M1M1, EsD 1-1, AcP ab, AcP ac.

Ключевые слова: флюороз, генетические маркеры предрасположенности и резистентности

DISTRIBUTION OF GENETIC MARKERS AT WORKERS OF ALUMINUM INDUSTRY WITH PROFESSIONAL FLUOROSIS: SERUM PROTEINS AND ERYTHROCYTE ISOENZYMES

N.I. Gafarov

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

The aim of this work was the study of the association of biochemical markers of genes with the risk of the development of professional and work-related fluorosis in people, working in the aluminum industry.

From 303 to 387 employees of Novokuznetsk aluminum factory were examined for various polymorphic genetic systems. The main group consisted of patients with fluorosis who were tested in the clinic of Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases RAMS. The control group (110 people) consisted of apparently healthy individuals of the same professions, working on Novokuznetsk aluminum factory, but without a diagnosis of occupational disease. We studied the serum proteins haptoglobin (HP), group-specific component GC, erythrocyte acid phosphatase ACP, fluorescent esterase EsD, protease inhibitor α -1-antitrypsin AAT. The material for the study was the venous blood samples. The study was conducted with the use of electrophoresis in polyacrylamide and the starch gels followed by histochemical staining electrophoregrams. Variants of protease inhibitor α -1-antitrypsin (AAT) were separated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. For analyzing the association studies of gene markers of the risk of development (or resistance to the development) of fluorosis the criteria χ^2 and OR were used.

It was revealed that variants AcP aa, AcP bb, AcP bc, EsD 2-2, PI M3M3 and GC, combinations (1-1) + PI (MR), GC (1-1) + PI (M3M3), PI (MR) + EsD (2-2), GC (1-1) + PI (M2M3), EsD (2-2) + AcP aa, GC (1-1) + EsD (2-2) referred to the risk genotypes of development of fluorosis. Two-component combinations of genotypes that were also associated with an increased risk of development of professional fluorosis were identified: GC (1-1) + PI (MR), GC (1-1) + PI (M3M3), PI (MR) + EsD (2-2); GC (1-1) + PI (M2M3), EsD (2-2) + AcP aa; GC (1-1) + EsD (2-2). For three-way combinations of genotypes are GC (1-1) + PI (MR) + AcP AA and GC (1-1) + EsD (2-2) + AcP cc. Genotypes resistant variants are: PI M1M1, EsD 1-1, AcP ab, AcP ac.

Key words: fluorosis, genetic markers of resistance and susceptibility

ВВЕДЕНИЕ

Профессиональная заболеваемость в Кемеровской области остается самой высокой среди субъектов РФ и превышает общероссийский показатель в 8 раз. В нозологической структуре профпатологии

первое ранговое место занимают болезни периферической нервной системы, суставов, сухожилий и мышц (34,8 %), вибрационная болезнь (23,9 %), нейросенсорная тугоухость (18 %), пылевые заболевания органов дыхания (15,5 %), другие професси-

ональные заболевания на предприятиях цветной и чёрной металлургии. Все диагнозы хронических профзаболеваний установлены в специализированных лечебно-профилактических учреждениях: центрах профпатологии (40,9 %), а также в клинике профессиональных заболеваний ФГБУ НИИ КПГПЗ СО РАМН.

Рост преждевременной смертности трудоспособного населения, увеличение уровня трудопотерь от производственной заболеваемости, травматизма и инвалидизации, ухудшение репродуктивного здоровья населения [2, 4, 6] – это только ряд последствий негативного влияния урбанизации общества и развития производства [7]. В этих условиях мероприятия, направленные на сохранение здоровья работающего населения, а также исследования по оценке риска нарушения здоровья от неблагоприятных экологических и производственных факторов становятся крайне актуальными [11, 12].

Весьма перспективными являются генетические исследования, которые позволяют оценить вклад наследственных факторов в развитии того или иного заболевания, что в конечном счете приведёт к снижению риска потери здоровья и сохранению трудового потенциала [8, 9]. Концепция экогенетики объясняет различную чувствительность отдельных людей к действию внешних факторов индивидуальными генетическими особенностями или генетическим статусом. Возникновение большинства мультифакторных заболеваний у человека определяется взаимодействием генотипа и факторов внешней среды, поэтому для прогнозирования риска развития заболевания представляется перспективным изучать те генетические маркеры, которые наиболее часто встречаются у больных лиц [10, 13].

Цель настоящего исследования – изучение ассоциации биохимических маркеров генов с профессиональным и производственно обусловленным флюорозом среди работающих на предприятии алюминиевой промышленности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

Обследовано по разным полиморфным генетическим системам от 303 до 387 работников Новокузнецкого алюминиевого завода (НКАЗ). При обследовании в клинике ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (ФГБУ «НИИ КПГПЗ» СО РАМН) этим лицам был поставлен диагноз – флюороз. Контрольную группу (110 человек) составили практически здоровые лица тех же специальностей и рабочего стажа, работающие на НКАЗ, но без диагноза этого профессионального за-

болевания. Материалом для исследования служили образцы венозной крови (табл. 1).

Изучались сывороточные белки гаптоглобин (НР), группоспецифический компонент GC, кислая фосфатаза эритроцитов AcP, флуоресцентная эстераза EsD, ингибитор протеаз α -1-антитрипсин ААТ. Исследование проводилось с применением метода электрофореза в полиакриламидном и крахмальном гелях с последующим гистохимическим окрашиванием электрофореграмм [11, 13]. Варианты ингибитора протеаз α -1-антитрипсина (ААТ) разделяли методом изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле [14].

Гаптоглобин НР представляет собой гликопротеид, относящийся к α -2-фракции глобулина. Одной из основных известных функций гаптоглобина является его способность связывать в плазме гемоглобин с образованием комплекса гемоглобин-гаптоглобин, который не проходит через почечный фильтр, что предохраняет организм от выделения с мочой гемоглобина и потери организмом железа. Кроме связывания гемоглобина, гаптоглобин может быть вовлечен в регуляцию уровня холестерина в плазме. Частота генотипа Нр 2-1 оказывается более высокой у больных аневризмой аорты. К этой системе имеют отношение также лейкемия, псориаз, дерматозы. Среди больных, страдающих ревматоидным артритом, обнаружено увеличение частоты лиц с фенотипом Нр 2-2. Напротив, пневмония и хронический лимфолейкоз характеризуются существенным ростом числа пациентов с фенотипом Нр 1-1. В некоторых исследованиях сообщается о значимости гаптоглобина в оценке подверженности профессиональным болезням, таким, как асбестоз, флюороз [3], силикоз, шизофрения, идиопатическая генерализованная эпилепсия, бронхолёгочные заболевания [10].

Группоспецифический компонент GC также представляет собой гликопротеид. Синтезируемый клетками печени белок GC относится к α 2-глобулиновой фракции. Основная функция GC – связывание и перенос витамина D2 и 25-гидроксивитамина D3 [11, 13]. Также GC вступает во взаимодействие с мышечными белками, что предотвращает полимеризацию мономеров мышечного белка в волокнах, обеспечивает их включение в группу белков, связывающих С-актин. Имеются данные о корреляции GC с различными заболеваниями. Так, отмечается повышенная частота индивидов с фенотипом Gc 2-2, по сравнению с контрольной группой, у пациентов с ревматоидным артритом, есть данные о связи полиморфизма GC с такими заболеваниями, как туберкулёз, сахарный диабет 2 [11].

Таблица 1
Объём изученной выборки лиц, больных профессиональным флюорозом и лиц контрольной группы

Контингент работников	Количество лиц, изученных по генетическим системам				
	НР	GC	EsD	AcP	PI
Больные лица	346	346	387	387	303
Контроль	110	110	110	110	110

Кислая фосфатаза эритроцитов АсР генетически детерминирована тремя аутосомными аллелями: АсРа, АсРb, АсРс, что обуславливает наличие 6 фенотипов – aa, ab, bb, ac, bc, cc. В большинстве европеоидных популяций частоты аллелей АсР располагаются в следующем порядке: $b > a > c$. Кислая фосфатаза эритроцитов принимает участие в обмене аминокислот.

Флуоресцентная эстераза **EsD генетически детерминирована двумя аутосомными аллелями:** EsD1 и EsD2, что обуславливает наличие трёх фенотипов – EsD 1-1, EsD 1-2 и EsD 2-2. В большинстве европеоидных популяций и среди русскоязычного населения России частота аллеля EsD1 превышает 0,9. Этот фермент принимает участие в жировом и липидном обмене аминокислот.

α -1-антрипсин (ААТ, PI) является ингибитором протеаз, относится к семейству серпинов. Физиологическая роль ААТ состоит в ингибировании эластазы, участвующей в естественной деградаци белков матрикса легочной паренхимы (эластина, коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов) и защите тканей от протеолитического воздействия. В здоровом организме существует равновесие в системе «протеолиз – антипротеолиз». Дисбаланс в этом равновесии приводит к деструкции эластических волокон легочной ткани и раннему развитию эмфиземы [13].

Описано несколько субтипов аллеля M (M1, M2, M3, M4), продукты которых обладают в целом нормальной функцией и представлены нормальной концентрацией ААТ в крови. Аллель M1 является самым распространенным вариантом Pi-гена и встречается у 95 % населения. Из дефицитных аллелей, связанных со сниженным уровнем ингибитора, наиболее

частыми являются варианты S и Z. Встречаемость этих аллелей в европейской популяции в среднем составляет 3–5 % [4, 13].

Статистическая обработка материалов у больных и лиц контрольной группы проводилась с помощью стандартных алгоритмов биометрии. Для оценки различий в распределении антигенов у больных и здоровых лиц использовали критерий хи-квадрат [1]: $\chi^2 = [N(ad - bc)^2] / [(a + b) \times (a + c) \times (b + d) \times (c + d)]$, где: a – больные лица, носители генотипа (например, EsD 1-1); b – здоровые лица, носители этого же генотипа; c – больные лица, не несущие этого генотипа; d – здоровые лица, не несущие этого же генотипа; N – общее число обследованных лиц.

В качестве границы между случайным и существенным принимали уровень значимости $p \leq 0,05$.

О силе ассоциации между изучаемыми маркерами и болезнью судили по значению OR (odds ratio) – отношению шансов [15].

$$OR = [Fn(I - fk)] / [fk(I - fn)],$$

где fn – фракция носителей антигена среди больных, fk – фракция носителей антигена в контрольной группе.

Все вычисления выполнены на ПК Pentium 4 по стандартным («SYSTAT», «STATISTICA 6.0», Excel-97) и оригинальным программам

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты генотипов и аллелей изученных полиморфных систем в целом сходны с ранее опубликованными результатами по РФ и Сибири [11, 13], распределение частот генотипов этих систем в основном соответствует правилу Харди – Вайнберга.

Таблица 2
Сывороточные и эритроцитарные генетические маркёры, ассоциированные с высоким риском развития профессионального флюороза

	Генотипы предрасположенности			
	АсР aa	АсР bb	EsD 1-2	PI M3M3
Частота генотипа у больных лиц	0,2093	0,3152	0,2532	0,0426
Частота генотипа в контроле	0,1	0,1	0,1727	0,01
χ^2	4,06	15,83	4,15	1,85
OR	1,98	6,82	1,75	4,85
p	0,04	0	0,04	0,17

Примечание (здесь и в табл. 3): χ^2 – значение хи-квадрат теста на различия в распределении частот генотипов между больными и лицами контрольной группы; p – уровень значимости этих различий; OR – отношение шансов.

Таблица 3
Сывороточные и эритроцитарные генетические маркёры, ассоциированные с резистентностью к развитию профессионального флюороза

	Генотипы резистентности				
	PI M1M1	EsD 1-1	АсР ac	АсР bc	АсР cc
Частота генотипа у больных лиц	0,3836	0,6689	0,0465	0,0517	0,0026
Частота генотипа в контроле	0,58	0,81	0,1818	0,1818	0,0364
χ^2	10,8	7,35	15,79	17,88	6,72
OR	0,45	0,49	0,25	0,25	0,07
p	1×10^{-3}	0,04	0	0	0,01

Исключение составляет распределение генотипов АсР в группе больных лиц, связанное с дефицитом генотипов АсР ab и АсР bb и избытком генотипов АсР aa ($\chi^2 = 8,5; p < 0,05$). Такое явление может иметь место, если в изученной выборке ген представлен тремя и более аллелями. Не было выявлено статистически значимых различий по частотам генотипов НР и GC между здоровыми и больными лицами.

По ряду генотипов АсР и PI результаты исследования представлены в таблицах 2 и 3. Исходя из значений χ^2 , а также значений OR и p, можно сделать вывод, что высокий риск заболевания профессиональным флюорозом имеет место у обладателей генотипов АсР aa, АсР bb кислой фосфатазы эритроцитов, EsD 1-2 флуоресцентной эстеразы, PI M3M3 ингибитора протеаз α -1-антитрипсина. Генотипами резистентности к развитию профессионального флюороза являются варианты PI M1M1, EsD 1-1, АсР ac, АсР bc, АсР cc.

Анализ распределения генотипов среди здоровых и больных лиц разного возраста (40–49 лет и 50–59 лет) показал, что в большинстве случаев в старшей возрастной группе рабочих (с большим стажем работы) частота генотипов риска снижена, по сравнению с менее стажированными рабочими. В то же время частота генотипов резистентности в группе более стажированных работников выше. Вероятно, это связано с выбытием с производства лиц, наиболее подверженных этому заболеванию. В некоторых случаях (генотипы кислой фосфатазы АсР) такой закономерности не наблюдается, и в этом случае мы считаем, что наличие этих генотипов ассоциируется лишь с риском развития заболевания, но не с его тяжестью. В контрольной группе частоты генотипов меняются случайным образом, и не наблюдается какой-то ассоциации между частотами генотипов риска или резистентности и возрастом работников.

К двухкомпонентным сочетаниям генотипов, статистически достоверно ассоциированным с повышенным риском развития профессионального флюороза, относятся комбинации: GC(1-1) + PI(MR), GC(1-1) + PI(M3M3), PI(MR) + EsD(2-2) с частотой 0,0066; GC(1-1) + PI (M2M3), EsD(2-2) + АсР aa с частотой 0,0197; GC(1-1) + EsD(2-2) с частотой 0,0329. К трехкомпонентным сочетаниям относятся генотипы GC(1-1) + PI(MR) + АсР aa и GC(1-1) + EsD(2-2) + АсР cc с частотой по 0,066.

В заключение следует отметить, что изученные нами продукты генов являются нормальными метаболитами и сами по себе не связаны с развитием флюороза. Но продукты сцепленных с ними генов или блоков генов могут определять повышенный риск развития профессионального флюороза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При одинаковом или сходном воздействии неблагоприятных факторов производства и с равноценными социально-бытовыми, климатическими условиями ряд заболеваний возникает лишь у определенной части лиц. Вероятность возникновения, особенностей формирования и течение заболевания в значительной мере определяют эндогенные причины. Вместе с тем, частота и тяжесть профессионального забо-

левания определяется не только интенсивностью и характером вредных производственных факторов, но и индивидуальной реактивностью на воздействие этих факторов.

Современная концепция экогенетики объясняет различную чувствительность к воздействию внешнесредовых факторов индивидуальными генетическими особенностями, в основе которых лежит генетический полиморфизм человека. Поиск и изучение ассоциаций различных генетических маркеров с заболеваниями весьма актуальны и перспективны, так как дают возможность судить об участии наследственных факторов в развитии того или иного заболевания. Вместе с тем, их исследование позволяет выявить среди населения группы лиц повышенного риска к отдельным заболеваниям и определять меры их своевременной профилактики. В представленной работе были выявлены генетические маркеры, наличие которых ассоциировано с высоким риском заболевания профессиональным флюорозом (АсР aa, АсР bb, EsD 1-2, PI M3M3), а также с резистентностью к его развитию (PI M1M1, EsD 1-1, АсР ac, АсР bc, АсР cc). Полученные данные могут быть использованы для своевременной профилактики этого заболевания и снижения потерь здоровья трудоспособного населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейр Б. Анализ генетических данных. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
2. Виблая И.В., Захаренков В.В. Население трудоспособного возраста. Тенденции демографических процессов СФО // Материалы XI Всероссийского конгресса «Профессия и здоровье» (Москва, 27–29 ноября 2012 г.). – М., 2012. – С. 114–116.
3. Данилов И.П., Гафаров Н.И., Третьякова С.Ю. Эндогенные факторы риска развития профессионального флюороза у рабочих алюминиевого завода // Проблемы профессиональной и общей патологии в регионах Сибири. – Новокузнецк, 2002. – С. 32–35.
4. Дефицит альфа-1-антитрипсина [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://vse-pro-geny.ru/ru_disease_4_Deficit-alfa-1-antitrypsyn.
5. Захаренков В.В., Виблая И.В. Демографическое развитие Сибирского федерального округа // Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья. – Вып. 2. – М., 2012. – С. 31–33.
6. Захаренков В.В., Виблая И.В. Негативные связи показателей здоровья населения с уровнем безработицы в г. Новокузнецке // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 4. – С. 169–172.
7. Захаренков В.В., Виблая И.В. Спектр влияния социальных условий на состояние здоровья населения г. Новокузнецка в 2006–2009 гг. – Кемерово: Примула, 2010. – 112 с.
8. Захаренков В.В., Виблая И.В., Олещенко А.М. Первые результаты демографической политики СФО по сохранению трудового потенциала (на примере модельного объекта) // Материалы XI Всероссийского конгресса «Профессия и здоровье» (Москва, 27–29 ноября 2012 г.). – М., 2012. – С. 192–194.

9. Захаренков В.В., Виблая И.В., Олещенко А.М. Проблемы общественного здоровья в Сибирском федеральном округе и пути их решения // Вестник Российской академии естественных наук. – 2011. – Вып. 13. – С. 39–40.

10. Измеров Н.Ф., Тихонова Г.И. Актуальные проблемы здоровья населения трудоспособного возраста в Российской Федерации // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 9. – С. 3–9.

11. Прокоп О., Гелер В. Группы крови человека: пер. с нем. – М.: Медицина, 1991 – 511 с.

12. Спицына Н.Х., Балинова Н.В., Дерябин В.Е., Спицын В.А. Генетические факторы, ответственные за репродуктивные особенности в бурятской популяции // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 24–28.

13. Спицын В.А. Экологическая генетика человека. – М.: Наука, 2008. – 503 с.

14. Троицкий Г.В., Ажицкий Г.В. Изоэлектрофокусирование белков в самоорганизующихся и искусственных pH-градиентах. – Киев: Наукова Думка, 1984. – 220 с.

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

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) 79-66-05; e-mail: genlab_nk@mail.ru)