

Н.Ф. Измеров, Л.П. Кузьмина, М.М. Коляскина, Л.М. Безрукавникова, Н.А. Лазарашвили, И.И. Дедов, Я.А. Петинати

ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицины труда» РАМН, Москва

Полиморфизм генов системы биотрансформации ксенобиотиков у больных профессиональными аллергическими дерматозами

*Изучение генов полиморфной системы биотрансформации ксенобиотиков у больных профессиональными аллергодерматозами показало достоверно высокий процент встречаемости полиморфных вариантов генов CYP1A1*2C и EPHX1 A-415G по сравнению с популяционным контролем. Сочетание 3 и более неблагоприятных гетеро- и гомозиготных аллелей генов CYP1A1, CYP3A4, EPHX1 и делеций генов GSTM1 и GSTT1 характеризуется более ранним (при стаже работы во вредных условиях до 5 лет) развитием, тяжелым течением и неблагоприятным прогнозом профессиональной патологии кожи.*

Ключевые слова: гены полиморфной системы, больные профессиональными аллергодерматозами.

Введение

В последние годы широкое распространение получили геномные и протеомные исследования по изучению генетико-биохимических полиморфных систем и взаимосвязи отдельных аллельных вариантов генов с различными патологическими процессами, интенсивностью протекания биохимических реакций, особенностями метаболизма лекарственных средств, предрасположенностью к различным видам спортивной деятельности и т.д. [1, 2].

Многообразие производственных химических соединений с раздражающими и сенсибилизирующими свойствами, их комплексное воздействие на организм и кожу, в частности в сочетании с многочисленными факторами экзо- и эндогенного характера, включая генетически обусловленные особенности метаболизма, приводит к формированию и развитию профессиональных аллергических дерматозов [3].

Высокая распространенность данной патологии в структуре профессиональной заболеваемости, тенденция к продолжающемуся росту делают актуальным дальнейшее изучение патогенетических особенностей формирования профаллергодерматозов для обнаружения генетических и биохимических маркеров предрасположенности.

Комплексный и комбинированный характер воздействия химических веществ на организм, особенности токсикокинетики, популяционная и индивидуальная чувствительность к химическим веществам обуславливают особенности протекания метаболических реакций, определяющих преобладание процессов детоксикации или активации химических веществ, влияющих на сроки формирования и течение профессиональных аллергодерматозов.

Данные многочисленных исследований, выполненных в России и за рубежом, позволяют утверждать, что одним из основных биохимических процессов, определяющих

N.F. Izmerov, L.P. Kuzmina, M.M. Kolyaskina, L.M. Bezrukavnikova, N.A. Lazarashvili, I.I. Dedov, YA.A. Petinati

Federal State Budgetary Research Institute of Occupational Health under the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Polymorphism of genes of the system of biotransformation of xenobiotics in patients with occupational allergic dermatoses

*Evaluation of genes polymorphic system of xenobiotics biotransformation in patients with occupational allergodermatoses showed significantly higher percentage of incidence of polymorphic variants of genes CYP 1A1 *2C and EPHX1 AND-415G compared with population control. A combination of 3 or more adverse hetero - and homozygous gene alleles CYP 1A1, CYP3A4, EPHX1 and deletions of genes GSTM1 and GSTT1, is characterized by earlier (with the experience of work in harmful conditions up to 5 years) development, severe and unfavorable prognosis of occupational pathology of the skin.*

Key words: genes of polymorphic system, patients with occupational allergodermatoses.

индивидуальный ответ организма на воздействие ксенобиотиков, в том числе и лекарственных веществ, является биотрансформация с преимущественным участием многочисленного семейства цитохромов P450, ферментов конъюгации и транспортных белков.

Всю последовательность реакций по детоксикации ксенобиотиков можно разделить на 2 основных фазы.

- I фаза биотрансформации ксенобиотиков — химическая модификация, связанная с приданием токсическим соединениям гидрофильных свойств, которые облегчают их солюбилизацию, т.е. растворение. К ферментам I фазы биотрансформации относят цитохромы P450, флавиносодержащие монооксигеназы, эстеразы, амидазы, альдегиддегидрогеназы и др., которые участвуют в реакциях окисления и восстановления, а также гидролиза молекул ксенобиотика [4].
- II фаза биотрансформации ксенобиотиков — ковалентная конъюгация, ведущая к образованию транспортных форм ксенобиотиков и способствующая их выведению из организма. Ко II фазе метаболизма принадлежат ферменты конъюгации: глутатион S-трансферазы (GST), конъюгирующие главным образом электрофильные соединения с глутатионом, УДФ-глюкуронозилтрансферазы (UDPGT), катализирующие реакции конъюгации молекул ксенобиотика или его метаболита с глюкуроновой кислотой, N-ацетил-(NAT) и сульфо-(ST)-трансферазы, эпексидгидролазы (EPHX), гидролизующие эпексиды и др. [5].

Функционирование системы биотрансформации ксенобиотиков осуществляется за счет работы более чем 200 различных ферментов. Конкретному индивидууму свойственна уникальная конфигурация разновидностей каждого из генов, ответственных за синтез ферментов биотрансформации, и, соответственно, имеет место уникальная реакция каждого человека на повреждающие химические факторы внешней среды [6].

Равновесие в работе ферментов I и II фазы метаболизма ксенобиотиков является необходимым условием для обеспечения эффективности детоксикации и элиминации ксенобиотиков. Риск развития заболеваний от воздействия веществ токсического и аллергенного действия связан с высокой активностью множественных форм цитохромов P450 в сочетании с низкой активностью ферментов II фазы биотрансформации и приводит к увеличению риска развития интоксикаций, иммунопатологических процессов и формированию профессиональных и производственно-обусловленных заболеваний.

Исследования, посвященные изучению роли генетико-биохимической полиморфной цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы в механизмах развития профаллергодерматозов, носят ограниченный характер и требуют продолжения для разработки патогенетически обоснованной системы лечебно-профилактических мероприятий [7, 8].

Все вышесказанное определяет актуальность изучения роли полиморфных вариантов генов системы биотрансформации ксенобиотиков в механизмах формирования и развития профессиональных аллергических дерматозов, оценки индивидуального риска развития, прогноза и индивидуализированного подбора лекарственных средств у данного контингента населения.

и развития профессиональных аллергодерматозов в ходе выполнения работы были исследованы полиморфные варианты генов цитохромов P450: цитохрома P4501A1 (CYP1A1(*2C1462V(A>G))) и P4503A4 (CYP3A4(*1BA>G)), глутатион S-трансферазы μ 1 (ген *GSTM1*), глутатион-S-трансферазы θ 1 (ген *GSTT1*), микросомальной эпексидгидролазы I (EPHX1, полиморфизмы H139R (A-415G) и Y113H (T-337C)). В качестве контроля использовались результаты анализов крови 250 практически здоровых лиц (данные профессора В.А. Спицына). При изучении полиморфизмов генов *CYP3A4* и *EPHX1* полученные нами результаты сравнивались с литературными данными (с использованием базы данных NCBI).

Определение генетических полиморфизмов генов *CYP1A1*, *CYP3A4*, *EPHX1* проводили совместно с лабораторией постгеномных технологий (зав. лабораторией постгеномных технологий НИИ МТ РАМН — акад. РАМН В.В. Покровский) при помощи нового метода: полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением реакции пиросеквенирования. Пиросеквенирование относится к новому поколению методик секвенирования, нашедшему свое применение как в фундаментальных исследованиях, так и в диагностических целях. Для прободготовки использовали приборы и станцию фирмы «Qiagen» (Германия). Для пиросеквенирования применяли пиросеквенаторы «РугоMark Q96 MD» и «РугоMark Q24». Анализ полиморфных систем генов *GSTM1* и *GSTT1* производили методом ПЦР в амплификаторе «Терцик» фирмы ООО «ДНК-технология» с использованием locus-специфических олигонуклеотидных праймеров (реагенты производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора) и анализом продуктов реакции в 3% полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Нами были обследованы 201 человек с установленными профессиональными заболеваниями кожи. Все они контактировали с веществами сенсибилизирующего и раздражающего действия. У всех больных была диагностирована повышенная чувствительность к тому или иному химическому веществу по результатам кожного тестирования: к цементу и бетону — у 21 человека, к органическим растворителям — у 27, к соединениям хрома — у 89, к солям никеля — у 78, к соединениям кобальта — у 71, к синтетическим смолам, клеям, краскам — у 47, к антибиотикам и фармацевтическим средствам — у 19, к минеральным удобрениям и ядохимикатам — у 3. Большая часть больных были заняты в строительстве, производстве строительных материалов или работали на домостроительных комбинатах (86 человек, 42,8%) и имели профессии отделочницы, плиточника, штукатурка, маляра, слесаря, формовщика, монтажника, машиниста и др.

Все обследованные лица (201 человек) в зависимости от формы профессионального аллергического заболевания кожи были разделены на 3 группы.

Первую группу обследованных составили 139 больных профессиональной экземой. Во вторую группу (42 человека) вошли больные профессиональным аллергическим дерматитом. В третью группу (20 человек) вошли лица, страдающие профаллергодерматозами (экзема и аллергический дерматит) в сочетании с профессиональной бронхиальной астмой.

Материалы и методы

Для оценки влияния различных генетико-биохимических полиморфизмов на механизмы формирования

Результаты исследования и их обсуждение

Цитохром P4501A1 принимает участие главным образом в активации химических веществ до развития

канцерогенных, мутагенных и токсических эффектов. По современным представлениям, химические вещества, воздействующие на организм, в результате метаболической активации образуют продукты, способные взаимодействовать с биологическими макромолекулами и образовывать с ними комплексы — неоантигены, вызывая таким образом иммунотоксические реакции. Установлено, что до 25% токсических эффектов составляют анафилактические, астматические, аллергические реакции, которые обуславливают формирование бронхиальной астмы, дерматитов, гепатитов, нефритов и др. Мы исследовали полиморфизм гена *CYP1A1*2C*, при экспрессии которого синтезируется белок Cyp1A1.2, в котором в положении 462 изолейцин заменен на валин. В результате такой замены синтезирующийся белок имеет активность почти в 2 раза выше по сравнению с исходным, что ведет к повышению концентрации промежуточных токсичных метаболитов и накоплению свободных радикалов. Встречается почти у 7% представителей европеоидной расы и рассматривается как фактор риска возникновения рака легких.

При анализе результатов распределения частоты встречаемости полиморфного варианта гена *CYP1A1*2C* было обнаружено достоверное повышение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа (A/G) у 14,9% ($\chi^2=5,66$; $p < 0,05$) у больных профессиональными аллергодерматозами в сравнении с группой популяционного контроля (7%). При этом гетерозиготный вариант встречался у 12,9% обследованных лиц первой группы, у 16,7% лиц второй группы, и наиболее выраженные изменения были получены в группе больных сочетанной патологией — 25% ($\chi^2=4,57$; $p > 0,05$), что свидетельствует о более высокой скорости образования токсичных метаболитов у лиц данной группы.

Анализ особенностей клинического течения профаллергодерматозов в зависимости от генотипа *CYP1A1* позволил установить у 73,3% ($\chi^2=4,08$; $p > 0,05$) лиц с наличием гетерозиготного генотипа (A/G) *CYP1A1*2C* формирование заболевания при небольшом (до 5 лет) стаже работы в условиях воздействия вредных производственных факторов, тогда как у лиц с нормальной аллелью *CYP1A1* (A/A) — лишь в 52,0% случаев, что свидетельствует о роли указанного полиморфизма в механизмах формирования и развития профаллергодерматозов (рис. 1). Исходя из полученных данных, можно предположить, что лица, имеющие полиморфный вариант гена *CYP1A1*2C*, т.е. более высокую активность синтезируемого белка, более подвержены влиянию веществ раздражающего и сенсибилизирующего действия, приводящих к раннему развитию профессионального заболевания кожи. Наличие гетерозиготного варианта (A/G) гена *CYP1A1* следует рассматривать как критерий предрасположенности к развитию профессиональных заболеваний кожи от воздействия веществ раздражающего и сенсибилизирующего действия.

Цитохромы P503A оказывают преимущественно детоксицирующий эффект при воздействии ксенобiotиков на организм. CYP3A4 является изоферментом цитохрома P450, который принимает участие в биотрансформации более 45% всех применяемых в настоящее время лекарственных средств, катализируя I фазу биотрансформации. При экспрессии гена *CYP3A4*1B* синтезируется белок CYP3A4.1, отличающийся более низкой активностью. Встречается почти у 9% представителей европеоидной расы.

При исследовании полиморфизма (*1B) гена *CYP3A4* достоверных различий по сравнению с попу-

ляционным контролем обнаружено не было, однако у 66,7% лиц с гетерозиготным вариантом гена наблюдалось развитие заболевания в первые 5 лет от начала работы с веществами раздражающего и сенсибилизирующего действия.

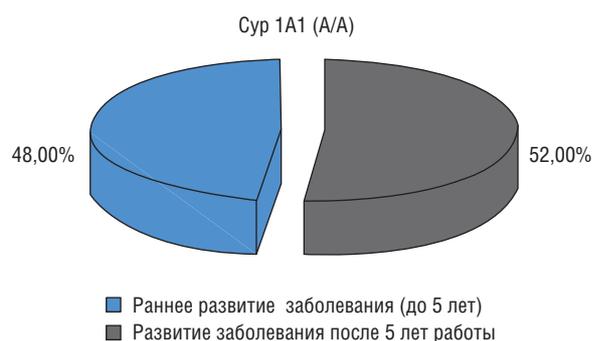
Исследуемая нами микросомальная эпоксидгидролаза (EPXH) обеспечивает метаболизм и детоксикацию высокоактивных производных эпоксида, которые накапливаются в результате работы предшествующих ферментов. В настоящее время известно, что EPXH может существовать в двух функционально различных состояниях — «медленном» и «быстром», каждое из которых обусловлено мутациями в экзонах 3 и 4, соответственно. Присутствие фермента как с низкой, так и с высокой активностью приводит к накоплению промежуточных токсичных метаболитов, которые усиливают токсическое действие химических веществ. Кроме этого, промежуточные метаболиты могут связываться с нуклеиновыми кислотами, поражая при этом геном и запуская процессы мута- и канцерогенеза.

При исследовании «быстрого» аллеля A-415G среди больных профессиональными аллергодерматозами было обнаружено достоверное превышение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа (A/G) гена *EPXH A-415G* у 31,8% лиц ($\chi^2=7,5$; $p < 0,01$) в сравнении с группой популяционного контроля — 19,5%, т.е. у этих лиц имело место увеличение активности эпоксидгидролазы на 25%.

Исследование «медленного» аллеля T-337C, характеризующегося снижением ферментативной активности эпоксидгидролазы до 50%, статистически не показало достоверных различий по сравнению с популяционным контролем, однако у 57,8% лиц с гетерозиготным вариантом гена и у 53,3% лиц с гомозиготным вариантом наблюдалось более раннее развитие заболевания: до 5 лет работы с вредными производственными факторами.

Система глутатионтрансфераз является важной антиоксидантной системой, которая препятствует образованию и накоплению в организме активных форм кислорода. Глутатионопосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и в предотвращении повреждений ДНК. Полиморфизм *GSTM1* и *GSTT1* обусловлен наличием двух аллелей: функционально активного и неактивного, или нулевого.

При анализе результатов распределения частоты гомозигот по дефицитному варианту генов *GSTM1* и *GSTT1*



$\chi^2=4,08$; $p > 0,05$

Рис. 1. Частота раннего развития заболевания в зависимости от генотипа *CYP 1A1*.

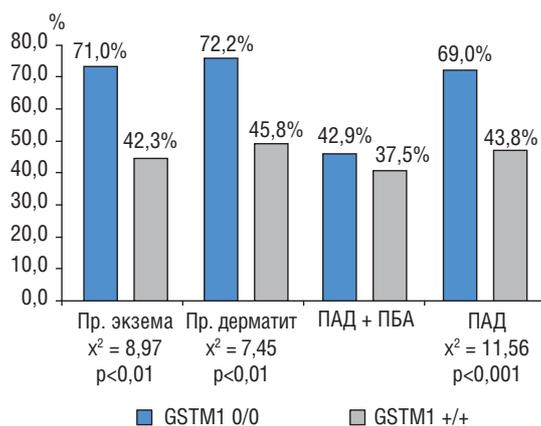


Рис. 2. Доля лиц с ранним развитием заболевания (при стаже работы до 5 лет) в зависимости от генотипа *GSTM1* в обследованных группах.

Примечание. ПАД — профаллергодерматозы, ПБА — профессиональная бронхиальная астма.

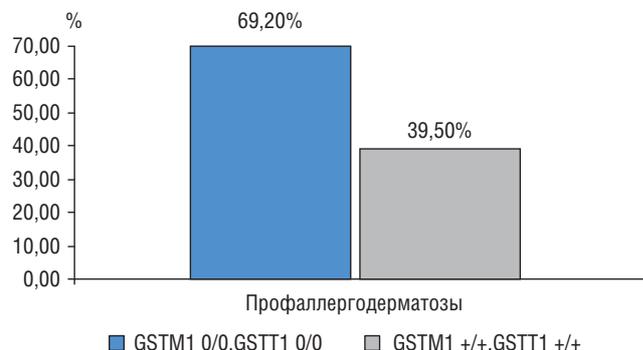


Рис. 3. Доля лиц с ранним развитием заболевания (при стаже работы до 5 лет) в зависимости от генотипов *GSTM1* и *GSTT1* у больных профаллергодерматозами.

42

у обследованных больных в сравнении с популяционным контролем достоверных различий установлено не было. Это связано с высокой встречаемостью данных полиморфизмов в популяции: до 46,8% для *GSTM1* и до 20% для *GSTT1*.

Индивидуальный анализ больных с отсутствием фермента *GSTM1* позволил обнаружить достоверное превышение частоты встречаемости лиц, у которых заболевание началось до 5 лет от начала работы с вредными производственными факторами во всех обследованных группах в сравнении с лицами, имеющими нормальную активность фермента (рис. 2).

При одновременном наличии делеции по генам *GSTM1* и *GSTT1* раннее развитие заболевания наблюдалось у 69,2% лиц с профессиональными болезнями кожи, при отсутствии делеции по обоим генам раннее развитие наблюдалось у 39,5% обследованных (рис. 3).

Сложное взаимодействие функций отдельных генов обеспечивает стабильность и адаптивность функционирования генотипа в целом в различных условиях окружающей среды. В результате отдельных генных мутаций, которые могут определять индивидуальные особенности метаболических систем организма, включая различные белковые и другие молекулярные структуры, системные проявления гомеостаза нарушаются, и изменяется способность организма выдерживать повреждающее воздействие факторов окружающей среды различной природы (производственных, экологических, инфекционных).

При анализе состояния больных и сроков развития заболевания в зависимости от сочетания 3 и более установленных полиморфизмов по изученным генам нами было выявлено 42 человека с таким сочетанием генов, причем у 31 из них заболевание начиналось в течение первых 5 лет от начала работы во вредных условиях. Обращает на себя внимание и тот факт, что эти же больные имели более высокие уровни диеновых конъюгатов, повышенное содержание внеклеточной ДНК и высокую активность нуклеаз в сочетании с низким содержанием глутатион S-трансферазы P1, что также свидетельствует о роли изученных систем в патогенезе профессиональных аллергических дерматозов.

Выводы

В патогенетических механизмах развития профессиональных аллергодерматозов от воздействия веществ раздражающего и сенсибилизирующего действия важную роль играет сопряженность генетико-биохимической полиморфной цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы, процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты.

У больных профессиональными аллергодерматозами установлен достоверно высокий процент встречаемости полиморфных вариантов генов *CYP1A1*2C* и *EPHX1A-415G* по сравнению с популяционным контролем, что свидетельствует об участии генетически детерминированной системы биотрансформации ксенобиотиков в патогенезе профессиональных аллергодерматозов.

Установлена связь наличия нулевого варианта гена глутатион S-трансферазы μ и θ с началом развития и тяжестью течения заболевания.

Наличие гетерозиготного варианта (A/G) гена *CYP1A1* следует рассматривать как критерий предрасположенности к развитию профессиональных заболеваний кожи от воздействия веществ раздражающего и сенсибилизирующего действия.

Сочетание неблагоприятных гетеро- и гомозиготных аллелей генов *CYP1A1*, *CYP3A4*, *EPHX1* и делеций генов *GSTM1* и *GSTT1* характеризуется ранним (при стаже работы во вредных условиях до 5 лет) развитием и неблагоприятным прогнозом в отношении профессиональной патологии кожи.

На основании выполненных молекулярно-генетических исследований по изучению особенностей состояния цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы у больных профессиональными аллергодерматозами разработаны критерии, включающие определение полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP3A4*, *EPHX1*, делеций генов *GSTM1* и *GSTT1*, которые могут быть использованы для оценки индивидуального риска развития профаллергодерматозов у здоровых лиц, поступающих на аллергоопасные производства, а также для индивидуального прогноза заболевания и разработки мер профилактики заболеваемости профессиональными аллергодерматозами.

REFERENCES

1. Kuz'mina L.P., Bezruqavniqova L.M. i dr. Molekuliarny'e mehanizmy' i individual'ny'e osobennosti metabolizma, opredeliaiushchie vozniqnovenie, klinicheskoe techenie i ishod professional'ny'kh i proizvodstvenno-obuslovlenny'kh zabolevanii'. Aktual'ny'e problemy' «Meditsiny' truda». Sb. trudov inst. / Pod red. aqad. RAMN N.F. Izmerova. M. 2006. 465–478.
2. Spitsy'n V.A. E'qologicheskaya genetika cheloveqa. M.: Nauqa. 2008. 503.
3. Izmerova N.I., Ivanova L.A. Clinicheskie aspekty' i laboratornaia diagnostika rannikh proiavlenii' professional'ny'kh dermatozov i ikh profilaqtika. // V sb.: Problemy' donozologicheskoi' diagnostiki. L. 1989. 280–281.
14. Gonzalez D.H., Bonnard G., Grienenberger J.-M. A gene involved in the biogenesis of c-type cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria. *Curr. Genet.* 1993; 21: 248–255.
15. Sipes I.G., Gandolfi A.J. Biotransformation of toxicants. Casarett and Doull's toxicology. N.-Y.: Macmillan Publishing Company. 1986. 99–173.
16. Cookes V.G., Grachev S.V. i dr. Metabolizm leqarstvenny'kh sredstv. Nauchny'e osnovy' personalizirovannoi' meditsiny': ruq-vo dlia vrachei'. M.: GE'OTAR-Media. 2008. 304.
17. Kuz'mina L.P. E'ntsiclopediia po meditsine truda / Pod red. N.F. Izmerova. 2006.
18. Westphal G.A., Reich K., Schulz T.G. et al. N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms in para-substituted arylamine-induced contact allergy. *Br. J. Dermatol.* 2000; 142: 1121–1127.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Измеров Николай Федотович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ФГБУ «НИИ МТ» РАМН

Адрес: 105275, Москва, пр-т Буденного, д. 31

Тел.: (495) 365-02-09, факс: (495) 366-05-83

E-mail: izmerov@niimt.ru

Кузьмина Людмила Павловна, доктор биологических наук, профессор, заведующая клиническим отделом и лабораторией медико-биологических исследований Клиники ФГБУ «НИИ МТ» РАМН

Адрес: 105275, Москва, ул. 9-я Соколиной Горы, д. 12

Тел.: (495) 365-14-90

E-mail: lpkuzmina@mail.ru

Коляскина Мария Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований Клиники ФГБУ «НИИ МТ» РАМН

Адрес: 105275, Москва, ул. 9-я Соколиной Горы, д. 12

Тел.: (495) 365-41-59

E-mail: biochimiamt@mail.ru

Безрукавникова Людмила Михайловна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований Клиники ФГБУ «НИИ МТ» РАМН

Адрес: 105275, Москва, ул. 9-я Соколиной Горы, д. 12

Тел.: (495) 365-41-59

E-mail: biochimiamt@mail.ru

Лазарашвили Нана Анзориевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований Клиники ФГБУ «НИИ МТ» РАМН

Адрес: 105275, Москва, ул. 9-я Соколиной Горы, д. 12

Тел.: (495) 365-41-59

E-mail: biochimiamt@mail.ru

Петинати Яна Александровна, кандидат медицинских наук, врач отделения дерматологии Клиники ФГБУ «НИИ МТ» РАМН

Адрес: 105275, Москва, ул. 9-я Соколиной Горы, д. 12

Тел.: (495) 366-80-22

E-mail: biochimiamt@mail.ru