

УДК 613.62:576

Е.Л. Смирнова^{1,2}, Е.Л. Потеряева^{1,2}, В.Н. Максимов^{1,3}, К.Н. Колесник^{1,3}, Н.Г. Никифорова^{1,2}, С.А. Песков^{1,2}**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ПНЕВМОКОНИОЗОВ В ПОСТКОНТАКТНОМ ПЕРИОДЕ**¹ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Красный пр., 52, Новосибирск, Россия, 630091²ФБУН Новосибирский НИИ гигиены Роспотребнадзора, ул. Пархоменко, 7, Новосибирск, Россия, 630108³ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН, ул. Бориса Богаткова, 175/1, Новосибирск, Россия, 630089

На основании изучения полиморфизма некоторых генов-кандидатов выявлены маркеры раннего развития и неблагоприятного течения пневмокониозов в постконтактном периоде. Проведен анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5, 4a/b полиморфизма гена NOS3, VNTR полиморфизма гена IL1RN, I/D полиморфизма CASP8 и мутации GLU342LYS (rs28929474) и GLU264VAL (rs17580) в гене SERPINA1 у больных с разными сроками формирования пневмокониоза. Выявлены индивидуальные критерии раннего формирования и прогрессирования пневмокониоза в постконтактном периоде.

Ключевые слова: пневмокониоз, профессиональные заболевания, полиморфизм генов.

E.L. Smirnova^{1,2}, E.L. Poteryaeva^{1,2}, V.N. Maksimov^{1,3}, K.N. Kolesnik^{1,3}, N.G. Nikiforova^{1,2}, S.A. Peskov^{1,2}. **Forecasting role of genetic markers in outlining features of pneumoconiosis course in post-contact period**

¹Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia, 52, Krasny av., Novosibirsk, Russia, 630091²FBUN Novosibirsk research Institute of hygiene of Rospotrebnadzor, 7, Parhomenko str., 7, Novosibirsk, Russia, 630108³Institute of therapy and preventive medicine SB RAMS, 175/1, B. Bogatkov str., Novosibirsk, Russia, 630089

Based on studies of certain gene-candidate polymorphism, the authors studied markers of early development and unfavorable course of pneumoconiosis in post-contact period. Analysis covered occurrence of genotypes and alleles of I/D polymorphism of gene CCR5, 4a/b polymorphism of gene NOS3, VNTR polymorphism of gene IL1RN, I/D polymorphism of CASP8 and mutation GLU342LYS (rs28929474) and GLU264VAL (rs17580) in gene SERPINA1 in patients with various terms of pneumoconiosis formation. Findings are individual criteria of early formation and progress of pneumoconiosis in post-contact period.

Key words: pneumoconiosis, occupational diseases, gene polymorphism.

В настоящее время большинство молекулярно-генетических исследований в основном посвящены заболеваниям бронхолегочной системы [2–4,6,7,9,10].

Особенности метаболического и генетического статуса могут определять характер течения профессиональных заболеваний и эффективность восстановительного лечения в постконтактном периоде [1,11].

Анализ ассоциаций генетических маркеров с профессиональными заболеваниями позволяет выявлять среди работающих группы лиц повышенного риска и разрабатывать меры эффективной профилактики.

Цель исследования: изучить прогностическую роль генетических маркеров в формировании особенностей течения пневмокониоза в постконтактном периоде у лиц с различной устойчивостью к воздействию пылевого фактора.

Материал и методики. Для достижения поставленной цели было проведено обследование 261 мужчины. Из них 61 человек — больные пневмокониозом и 200 человек — контрольная группа (здоровые доноры). Контрольная группа (подобранная по полу и возрасту) была сформирована на основе популяционной

выборки 45–69-летних жителей Октябрьского и Кировского районов г. Новосибирска (9400 человек), которая была собрана НИИ терапии в ходе работы по международному проекту HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe).

Средний возраст обследованных составил 57,3±2,18 лет. Средний стаж работы в контакте с промышленным аэрозолем составил 23,8 ±7,27 года. В зависимости от сроков развития заболевания все обследованные больные были разделены на две группы:

- заболевшие в ранние сроки (до 15 лет работы в условиях промышленного аэрозоля);
- заболевшие в поздние сроки (более 15 лет работы в условиях промышленного аэрозоля).

Все больные пневмокониозом были также разделены на две группы в зависимости от прогрессирования или стабильного течения заболевания в постконтактном периоде.

Работающие в контакте с промышленным аэрозолем были представлены следующими специальностями: обрубщики, формовщики, заточники, клепальщики, чистильщики, огнеупорщики, токари, электро-

сварщики, горнорабочие очистного забоя (ГРОЗ), проходчики, подземные машинисты, подземные электрослесари, взрывники.

Выделение ДНК из венозной крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции [5,8]. В анализ были взяты следующие генетические маркеры: I/D полиморфизм гена CCR5, полиморфизм 4a/b гена NOS3, VNTR полиморфизм гена IL1RN, I/D полиморфизм гена CASP8 и мутации Z и S в гене SERPINA1. Генотипирование выполнялось в лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИТГПМ по опубликованным методикам.

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ SPSS 11.5. Первым этапом определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в группах, потом оценивали соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга в контрольной группе (по критерию хи-квадрат).

Результаты исследования. В результате проведенных исследований изучены частоты генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 у больных пневмокониозом в постконтактном периоде. Проведено сравнение группы больных пневмокониозом с контрольной группой для установления ассоциации того или иного аллеля генотипа с заболеванием. Для выявления устойчивости к действию промышленного аэрозоля частоты генотипов I/D полиморфизма гена CCR5 изучали в группах больных с ранними и поздними сроками развития пневмокониоза, а также в группах с прогрессированием и стабильным течением заболевания в постконтактном периоде.

Частоты генотипов I/D полиморфизма гена CCR5 в контрольной группе находятся в равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 1,73$). При сравнении групп больных пневмокониозом и контрольной по частотам генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 достоверных различий не получено (табл. 1).

Таблица 1
Частоты генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 в контрольной группе и в группе больных пневмокониозом

Генотип	Контроль		Пневмокониоз	
	n	%	n	%
II	156	78,0	46	78,0
ID	44	22,0	12	20,3
DD	0	0	1	1,7
Достоверность различий, р	0,178			
Аллель	%		%	
I	89,0		88,1	
D	11,0		11,9	
Достоверность различий, р	0,868			

При сравнении группы больных с ранними сроками развития заболевания с группой больных с позд-

ними сроками развития пневмокониоза по частотам генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 достоверных различий не получено.

При сравнении средних уровней ряда показателей у носителей разных генотипов I/D полиморфизма гена CCR5 достоверные различия в тесте Крускала-Уоллиса не обнаружены.

При разделении группы больных пневмокониозом по признаку прогрессирования заболевания достоверных различий по частотам генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 не получено.

NOS3 — ген эндотелиальной синтазы оксида азота (NO). NO — это эндотелиальный фактор релаксации. Оксид азота NO синтезируется эндотелиальной NO-синтазой, которая кодируется геном NOS3 (7q36). Активация синтеза NO происходит под влиянием экзогенных факторов (химические вещества, инфекция, аллергены) и некоторых эндогенных. Радикальные свойства NO обеспечивают его способность реагировать с различными соединениями и свободными радикалами, также он участвует в регуляции тонуса бронхального дерева.

Частоты генотипов и аллелей 4a/b полиморфизма гена NOS3 изучены в тех же группах больных. Частоты генотипов 4a/b полиморфизма гена NOS3 в контрольной группе находятся в равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0,31$). При сравнении группы больных пневмокониозом с контролем по частотам генотипов и аллелей полиморфизма 4a/b гена NOS3 достоверных различий не получено (табл. 2).

При разделении группы больных пневмокониозом по срокам развития заболевания по частотам генотипов и аллелей 4a/b полиморфизма гена NOS3 достоверных различий между группами не получено.

Достоверные различия получены между группами больных с прогрессированием и стабильным течением пневмокониоза в постконтактном периоде. Так оказалось, что гетерозиготы 4a/4b в группе больных с прогрессированием пневмокониоза встречаются в 2 раза реже, чем в группе больных со стабильным течением заболевания (23,5% и 50%, $p=0,040$). Отношение шансов для гетерозигот оказаться в группе с прогрессированием пневмокониоза составляет 0,32 (95% ДИ 0,11–0,97).

Таблица 2
Частоты генотипов и аллелей 4a/b полиморфизма гена NOS3 в контрольной группе и в группе больных пневмокониозом

Генотип	Контроль		Пневмокониоз	
	n	%	n	%
4b/4b	143	71,5	38	63,3
4a/4b	51	25,5	21	35,0
4a/4a	6	3	1	1,7
Достоверность различий, p	0,967			
Аллель	%		%	
4b	84,2		86	
4a	15,8		14	

Ген антагониста рецептора интерлейкина 1 (IL1RN (OMIM 147679)) находится на длинном плече 2-й хромосомы (2q13). Согласно данным базы HuGE Navigator исследованы ассоциации этого гена с несколькими сотнями патологических фенотипов, в том числе с пневмокониозом (<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm>).

Частоты генотипов в контрольной группе соответствуют равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 2,17$). При сравнении группы больных пневмокониозом с контролем по частотам генотипов и аллелей VNTR полиморфизма гена IL1RN достоверных различий не получено (табл. 3).

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей VNTR полиморфизма гена IL1RN в контрольной группе и в группе больных пневмокониозом

Генотип	Контроль		Пневмокониоз	
	n	%	n	%
410/410	108	54	32	52,5
410/240	68	34	22	36,1
410/325	4	2	1	1,6
240/240	20	10	5	8,2
240/325	0	0	1	1,6
Достоверность различий, р	0,470			
Аллель	%		%	
410	71,2		71,3	
325	0,8		1,6	
240	28,0		27,1	
Достоверность различий, р	0,306			

При сравнении групп больных пневмокониозом с ранними и поздними сроками развития заболевания по частотам генотипов и аллелей VNTR полиморфизма гена IL1RN оказалось, что гомозиготы 240/240 в группе больных с ранними сроками развития пневмокониоза встречаются значительно чаще, чем в группе с поздними сроками развития заболевания (23,1% и 4,2%, $p=0,027$).

При разделении группы больных пневмокониозом по признаку прогрессирования заболевания достоверных различий не получено, хотя имеется тенденция к накоплению носителей гомозиготного генотипа 240/240 в группе с прогрессированием пневмокониотического процесса в постконтактном периоде (11,8% и 3,7%).

Каспаза-8 (CASP8) играет важную роль во всех физиологических процессах, связанных с апоптозом. Известно, что заболевания легких сопровождаются изменением апоптоза в клетках эпителия и эндотелия легочных альвеол.

Частоты генотипов I/D полиморфизма (rs3834129) гена CASP8 в контрольной группе находятся в равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 1,73$). При сравнении групп больных пневмокониозом и контрольной по частотам генотипов и аллелей I/D полиморфизма ге-

на CASP8 получили достоверные различия, $p=0,024$ и $p=0,015$ (табл. 4).

Таблица 4

Частоты генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CASP8 в контрольной группе и в группе больных пневмокониозом

Генотип	Контроль		Пневмокониоз	
	n	%	n	%
II	64	32,0	13	22,4
ID	100	50,0	25	43,1
DD	36	18,0	20	34,5
Достоверность различий, p	0,024			
Аллель	%		%	
I	57,0%		44,0%	
D	43,0%		56,0%	
Двустор. тест Фишера	0,015			
Отношение шансов	1,7			
95% ДИ ОШ	1,1–2,6			
	n	%	n	%
Носители генотипов II и ID	164	82,0	38	65,5
Носители генотипа DD	36	18,0	20	34,5
Двустор. тест Фишера	0,011			
Отношение шансов	2,4			
95% ДИ ОШ	1,3–4,6			

Отношение шансов обнаружить носителя генотипа DD в группе с пневмокониозом в 2,4 раза выше, по сравнению с контролем (95% ДИ 1,3–4,6; $p=0,011$). Следовательно, генотип DD полиморфизма гена CASP8 является генетическим фактором риска развития пневмокониоза у работников пылевых профессий.

При сравнении групп больных с ранними и поздними сроками развития пневмокониоза по частотам генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CASP8 достоверных различий не получено. Хотя имеется тенденция к уменьшению частоты носительства генотипа II в группе больных пневмокониозом с ранними сроками развития заболевания, по сравнению с группой больных с поздними сроками (стаж работы в контакте с промышленным аэрозолем более 15 лет) развития пневмокониоза (21,7% и 39,7% соответственно).

При сравнении средних уровней ряда показателей у носителей разных генотипов I/D полиморфизма гена CASP8 достоверные различия в тесте Крускала-Уоллиса не обнаружены.

Мутации GLU342LYS (rs28929474) и GLU264VAL (rs17580) в гене SERPINA1, по старой биохимической номенклатуре Z и S, были исследованы у 60 человек больных пневмокониозом и в контрольной группе. Частота гетерозиготного носительства в контрольной группе составила 2%. В группе с пневмокониозом носители этих мутаций не обнаружены. Хотя испанские авторы при исследовании ассоциации этих мутаций с асбестозом показали значительное повышение частоты носительства этих мутаций у больных, по сравнению со здоровыми [12].

Выводы. 1. Генетические маркеры (носительство генотипа 240/240 VNTR полиморфизма гена IL1RN,

генотипа DD гена CASP8) являются прогностическими факторами индивидуального риска развития и прогрессирования пневмокониоза в постконтактном периоде.

2. Носительство генотипа II гена CASP8 и гетерозиготы 4a/4b гена NOS3 ассоциированы с низким риском развития пневмокониоза у рабочих пылеопасных профессий и отсутствием прогрессирования этого заболевания в постконтактном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (см. REFERENCES стр. 12)

1. Быковская Т.Ю., Пиктушанская Т.Е. // Мед. труда и пром. экол. — 2011. — № 8. — С. 1–5.
2. Зайцева Н.В., Устинова О.Ю., Сбоев А.С. // Гиг. и санит. — 2016. — № 1. — С. 17–21.
3. Измеров Н.Ф. // Мед. труда и пром. экология. — 2008. — № 6. — С. 1–9.
4. Кузьмина Л.П., Коляскина М.М., Лазарашвили Н.А., Безрукавникова Л.М. // Региональные аспекты инновационных технологий профилактики, диагностики, лечения и реабилитации больных профессиональными и производственно обусловленными заболеваниями верхних дыхательных путей и легких: сб. тр. Всерос. науч.-практ. конф., Боровичи Новгородской обл., 7–8 февраля 2013 г. — Великий Новгород: НовГУ им. Ярослава Мудрого, 2013. — 130–135.
5. Маниатис Т., Фрих Э., Сембрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир. — 1984. — С. 357.
6. Потеряева Е.А., Ромейко В.А., Ивлева Г.П., Кругликова Н.В. // Сб. матер. Междунар. научн. конгр. «Сиббезопасность-Спасиб-2013» 25–27 сентября 2013 г., Новосибирск. — Новосибирск: СГГА, 2013. — 279 с.
7. Смелая Т.В. Генетическая предрасположенность, патоморфоз, лечение внебольничной и нозокомиальной пневмонии: Автореф. дис. ... докт. мед. наук / Т.В. Смелая. — Москва, 2011. — 49 с.
8. Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК // Анализ генома. Под ред. К. Дейвиса, пер. с англ. — М.: Мир. — 1990. — С. 58–94.
9. Шпагина Л.Н., Захаренков В.В. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 4. — С. 158–160.
10. Шур П.З., Зайцева Н.В. и др. // Мед. труда и пром. эколог. — 2012. — № 12. — С. 8–11.
11. Яковлева Е.П., Пиктушанская Т.Е., Быковская Т.Ю. // Мед. труда и пром. экология. — 2011. — №3. — С. 41–44.

REFERENCES

1. Bykovskaya T.Yu., Piktushanskaya T.E. // Industr. med. — 2011. — 8. — P. 1–5 (in Russian).
2. Zaytseva N.V., Ustinova O.Yu., Sboev A.S. // Gig. i sanit. — 2016. — 1. — P. 17–21 (in Russian).
3. Izmerov N.F. // Industr. med. — 2008. — 6. — P. 1–9 (in Russian).
4. Kuz'mina L.P., Kolyaskina M.M., Lazarashvili N.A., Bezrukavnikova L.M. Regional aspects of innovation technologies of prevention, diagnosis, treatment and rehabilitation of patients

with occupational and occupationally conditioned diseases of upper respiratory tract and lungs: proc of Russian scientific and practical conference, Borovichi, Novgorod region, 7–8 February 2013. — Velikiy Novgorod, NovGU im. Yaroslava Mudrogo, 2013. — P. 130–135 (in Russian).

5. Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Genetic engineering methods. Molecular cloning. — Moscow: Mir, 1984. — 357 p. (in Russian).

6. Poteryaeva E.L., Romeyko V.L., Ivleva G.P., Kruglikova N.V. / Proc of International scientific congress «Sibbezopasnost'-Spasib-2013» 25–27 September 2013, Novosibirsk. — Novosibirsk: SGGA, 2013. — 279 p. (in Russian).

7. Smelaya T.V. Genetic predisposition, pathomorphosis, treatment of community-acquired and hospital-acquired pneumonia: diss. — Moscow, 2011. — 49 p. (in Russian).

8. Smit K., Kalko S., Kantor Ch. Pulse-electrophoresis and methods of work with large DNA molecules. In: Deivis K., ed. Genome analysis. Translated from English. — Moscow: Mir, 1990. — P. 58–94 (in Russian).

9. Shpagina L.N., Zakharenkov V.V. // Byulleten' VSNTs SO RAMN. — 2010. — 4. — P. 158–160 (in Russian).

10. Shur P.Z., Zaitseva N.V., et al. // Industr. med. — 2012. — 12. — P. 8–11 (in Russian).

11. Yakovleva E.P., Piktushanskaya T.E., Bykovskaya T.Yu. // Industr. med. — 2011. — 3. — P. 41–44 (in Russian).

12. Lafuente M.J., Casterad X. et al. // Toxicol. Lett. — 2002. — Nov. 15. — 136(1). — P. 9–17.

Поступила 04.08.2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнова Елена Леонидовна (Smirnova E.L.),

доц. каф. неотл. тер. с эндокринологией и профпатологией ФПК и ППВ ГБОУ ВПО «НГМУ», ст. науч. сотрудник ФБУН «Новосибирский НИИ гигиены», канд. мед. наук. E-mail: kafprofpat@mail.ru.

Потеряева Елена Леонидовна (Poteryaeva E.L.),

зав. каф. неотл. тер. с эндокринологией и профпатологией ФПК и ППВ ГБОУ ВПО «НГМУ», рук. отдела мед. труда ФБУН «Новосибирский НИИ гигиены», д-р мед. наук, проф. E-mail: sovetmedin@yandex.ru.

Максимов Владимир Николаевич (Maksimov V.N.),

проф. каф. мед. генетики и биологии ГБОУ ВПО «НГМУ», зав. лаб. молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», д-р мед. наук. E-mail: medic11@mail.ru.

Колесник Ксения Николаевна (Kolesnik K.N.),

ординатор 2-го года ГБОУ ВПО «НГМУ», мл. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины». E-mail: ksenya-kolesnik@mail.ru.

Никифорова Наталья Германовна (Nikiforova N.G.),

зав. каф. гигиены и экологии ГБОУ ВПО «НГМУ», д-р биол. наук, проф. E-mail: sovetmedin@yandex.ru.

Песков Сергей Александрович (Peskov S.A.),

проф. каф. гигиены и экологии ГБОУ ВПО «НГМУ», д-р мед. наук. E-mail: sovetmedin@yandex.ru.