

3. Kudaeva I.V., Masnavieva L.B. // *Sovremennaya Laboratoriya. Seriya Meditsinskiy alfavit*. — 2015. — Vol. 1. — 2. — P. 14–18 (in Russian).

4. Obukhova T.Yu., Budkar' L.N., Tereshina L.G., Karpova E.A. // *Gigiena i sanitariya*. — 2015. — 94 (2). — P. 67–69 (in Russian).

5. Poletayev A.B. *Physiologic immunology (natural auto-antibodies and nanomedicine problems)*. — Moscow: Miklosh, 2011. — 218 p. (in Russian).

6. Syurin S.A., Nikanov A.N., Rocheva I.I. // *Industr. med.* — 2008. — 9. — P. 22–27 (in Russian).

7. Shayakhmetov S.F., Lisetskaya L.G., Merinov A.V. // *Industr. med.* — 2015. — 4. — P. 30–35 (in Russian).

8. Fishwick D., Sen D., Barber C. *et al.* // *Occup. Med.* — 2015. — N 65. — P. 270–282.

Поступила 06.12.2016

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кудаева Ирина Валерьевна (Kudaeva I.V.),

зав. КДЛ, вед. науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИ-

МЭИ, д-р мед. наук, доц. E-mail: kudaeva\_irina@mail.ru.

Маснавиева Людмила Борисовна (Masnavieva L.B.),

ст. науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: masnavieva\_luda@mail.ru.

Дьякович Ольга Александровна (D'yakovich O.A.),

науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: dyakovich.olga@mail.ru.

Бейгель Елена Александровна (Beysel' E.A.),

вр. аллерголог-иммунолог клиники ФГБНУ ВСИМЭИ, доц. каф. профпатологии и гиг. ГБОУ ДПО ИГМАПО Минздрава РФ, канд. мед. наук. E-mail: elena-abramates@ Rambler.ru.

Шаяхметов Салим Файзыевич (Shayakhmetov S.F.),

зам. дир. по науч. работе ФГБНУ ВСИМЭИ, проф. каф. профпатологии и гигиены ГБОУ ДПО ИГМАПО Минздрава РФ, д-р мед. наук, проф. E-mail: imt@irmail.ru.

Авраменко Ксения Андреевна (Avramenko K.A.)

ординатор ФГБНУ ВСИМЭИ. E-mail: angelks93@mail.ru.

УДК 616.23.24–057:616.1:577.1

О.В. Наумова, И.В. Кудаева, Л.Б. Маснавиева, О.А. Дьякович, В.П. Белик

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У ЛИЦ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ РТУТЬЮ

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 12а м/р, 3, Ангарск, Россия, 665827

В работе представлены данные о частоте полиморфизма генов-кандидатов, участвующих в формировании эндотелиальной дисфункции (EDN1 Lys198Asn, NOS3 T786C, AGT Thr174Met и AGT Met235Thr) в совокупности с концентрациями их активных продуктов у лиц, экспонированных ртутью. Установлены изменения в содержании метаболитов оксида азота, эндотелина-1, ангиотензина II у обследованных лиц, в том числе, без сердечно-сосудистой патологии. Их генетическая обусловленность связана с наличием неблагоприятных генотипов полиморфных вариантов Met235Thr гена AGT и Lys198Asn гена EDN1. У лиц, экспонированных ртутью, с сердечно-сосудистыми заболеваниями изменения в содержании биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции свидетельствуют о серьезных нарушениях функций эндотелия и не являются генетически детерминированным процессом.

**Ключевые слова:** ртуть, хроническое воздействие ртути, эндотелиальная дисфункция, полиморфизм генов, оксид азота, эндотелин-1, ангиотензин II.

O.V. Naumova, I.V. Kudaeva, L.B. Masnavieva, O.A. D'yakovich, V.P. Belik. **Molecular genetic aspects of endothelial dysfunction in individuals exposed to mercury**

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, 12a m/r, 3, Angarsk, Russia, 665827

The article deals with frequency data on polymorphism of candidate genes participating in endothelial dysfunction (EDN1 Lys198Asn, NOS3 T786C, AGT Thr174Met and AGT Met235Thr) in totality with concentrations of their active substances in individuals exposed to mercury. Findings are changes in levels of nitrogen oxide, endothelin-1, angiotensin II metabolites in examinees including those without cardiovascular diseases. The genetic conditionality is connected with unfavorable genotypes of polymorphic variants — Met235Thr of AGT gene and Lys198Asn of EDN1 gene. Changes in levels of biochemical markers of endothelial dysfunction in individuals exposed to mercury indicate serious endothelial function disorders and are not genetically determined processes.

**Key words:** mercury, chronic exposure to mercury, endothelial dysfunction, genes polymorphism, nitrogen oxide, endothelin-1, angiotensin II.

Наиболее распространенными среди сопутствующих патологий у лиц, экспонированных ртутью, являются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), такие как артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца [4]. Данные ССЗ встречаются у 54% пациентов с хронической ртутной интоксикацией и 24% работающих в контакте с ртутью, не имеющих профессионального заболевания. Также установлено, что при хроническом действии ртути у 30–57% работающих отмечаются изменения в концентрации биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭД), таких как эндотелин-1 (ЭТ-1) и оксид азота [4]. В основе развития ЭД могут иметь значение структурные полиморфизмы генов, белковые продукты которых либо непосредственно являются биологически активными веществами эндотелиального происхождения, либо вовлечены в их синтез и секрецию клетками эндотелия [2]. Таким образом, актуальным является изучение молекулярно-генетических механизмов формирования эндотелиальной дисфункции у лиц, экспонированных ртутью.

**Целью исследования** явилось изучение полиморфизма генов эндотелина-1 EDN1 Lys198Asn, эндотелиальной синтазы оксида азота NOS3 T786C, ангиотензиногена AGT Thr174Met и Met235Thr в совокупности с концентрациями их активных продуктов (эндотелин-1, оксид азота, ангиотензин II) у работающих в условиях экспозиции ртутью.

**Материалы и методы.** В условиях клиники ФГБНУ «Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований» были обследованы 173 мужчины, контактирующие в профессиональной деятельности с металлической ртутью, стаж работы во вредных условиях труда составил более 5 лет. Все обследованные были разделены на две группы: в 1 группу вошли 54 человека с сопутствующей сердечно-сосудистой патологией, во 2 группу — 119 обследуемых без ССЗ. Возраст 1, 2 группах составил 53,0 (46,0–57,0) и 42,0 (35,0–50,0) лет соответственно.

Материалом для лабораторных исследований служила венозная кровь, полученная после 12 часового перерыва в приеме пищи. Выделение ДНК из цельной крови, взятой с ЭДТА, проводили модифицированным методом при помощи наборов «ДНК-экспресс кровь» (Литех, Россия) [1]. Полиморфизм генов определяли методом ПЦР с использованием наборов реагентов «SNP-экспресс» (Литех, Россия) с электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле, и в режиме реального времени (SFX96, BioRad, США). Суммарное содержание стабильных метаболитов оксида азота ( $\text{NO}_x$ ) определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса. Концентрацию эндотелина-1 и ангиотензина II определяли методом иммуноферментного анализа при помощи тест-систем Biomedica Gruppe (Англия) и RayBiotech

Inc (США) соответственно на ИФА-ридере (BioTek, США). Исследования выполнены с информированного согласия обследуемых, и соответствуют этическим нормам Хельсинкской декларации (2000) и Приказа Минздрава РФ №266 (от 19.06.2003).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Сравнение групп осуществляли с использованием непараметрического U-критерия Mann-Whitney. Сравнение частот отклонений от нормы в содержании изучаемых биохимических маркеров проводили с использованием  $\chi^2$  Пирсона; при абсолютных частотах меньше 10, использовали поправку Йетса. Для сравнения частоты генотипов между двумя группами использовали аддитивную модель ( $\chi^2$ ,  $p$ , ОШ (95% ДИ) — тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного исследования во всех группах были обнаружены искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии (табл. 1). Носительство заявленных полиморфных вариантов статистически значимо не различалось в группах обследуемых и соответствовало распределению последних в популяции [7]. Установлено, что частота неблагоприятных генотипов ТТ/СТ гена NOS3 в 1 группе составила 17%/32%, во 2 группе — 19%/38% соответственно. Генотипы AsnAsn/LysAsn гена EDN1 встречались соответственно у 5%/27% и 5%/33% представителей 1 и 2 групп. Частота неблагоприятных генотипов гена AGT распределилась следующим образом: MetMet встречался в 1% случаев во 2 группе, ThrMet — в 20% и 14% случаев в 1 и 2 группе соответственно; генотипы ThrThr/MetThr — у 17%/59% лиц в 1 группе и у 16%/59% лиц во 2 группе.

Проведенными ранее исследованиями было установлено статистически значимое снижение концентрации  $\text{NO}_x$  в динамике обследования пациентов с хронической ртутной интоксикацией почти на 30%, выходящее за пределы нижней референсной границы, а также наличие повышенного уровня эндотелина-1 в сыворотке крови [4]. Исследование содержания биохимических маркеров ЭД в зависимости от наличия ССЗ в наших исследованиях показало (табл. 2), что в обеих группах более чем у 60% обследованных было выявлено снижение уровня  $\text{NO}_x$ , при этом среднegrupповые концентрации были ниже нормативных величин (32,5–45,6 мкМ/л). Анализ частоты отклонений от референсных значений содержания  $\text{NO}_x$  в зависимости от генотипов полиморфного варианта T786C гена NOS3 не выявил статистически значимых различий. В группе 1 пониженная концентрация  $\text{NO}_x$  встречалась у 67%, среди лиц с гетерозиготным генотипом — у 80%, с неблагоприятным генотипом — у

Таблица 1

**Распределение генотипов генов, участвующих в формировании дисфункции эндотелия у лиц, экспонированных ртутью**

Ген/полиморфизм	Генотип	n (частота), %		ОШ (95% ДИ)	$\chi^2$	p
		1-я гр.	2-я гр.			
NOS3 / C786T	CC	30 (51)	52 (44)	1,3 (0,7–2,5)	0,5	0,5
	TT	10 (17)	22 (18)	0,9 (0,4–2,1)		
	CT	19 (32)	45 (38)	0,8 (0,4–1,5)		
EDN1 / Lys198Asn	LysLys	40 (68)	74 (62)	1,3 (0,7–2,5)	0,4	0,6
	AsnAsn	3 (5)	6 (5)	1,0 (0,2–4,2)		
	LysAsn	16 (27)	39 (33)	0,8 (0,4–1,5)		
AGT / Thr174Met	ThrThr	47 (80)	102 (85)	0,7 (0,3–1,5)	0,7	0,4
	MetMet	-	1 (1)	0,7 (0,03–16,6)		
	ThrMet	12 (20)	16 (14)	1,6 (0,7–3,8)		
AGT / Met235Thr	MetMet	14 (24)	30 (25)	0,9 (0,5–1,9)	0,1	0,8
	ThrThr	10 (17)	19 (16)	1,1 (0,5–2,5)		
	MetThr	35 (59)	70 (59)	1,0 (0,5–1,9)		

Примечание:  $\chi^2$ , p ОШ (95 % ДИ) — тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов,  $\chi_1 = [0,1,2]$ ,  $df = 1$ .

Таблица 2

**Биохимические показатели функционального состояния эндотелия у лиц, подвергавшихся воздействию ртути; Med (Q25–Q75)**

Показатель, ед. изм.	1-я группа	2-я группа	p
NO <sub>x</sub> , мкМ/мл	25,5 (16,0–33,1)	26,2 (17,2–41,2)	0,38
Эндотелин-1, фмоль/мл	1,2 (1,0–1,8)	0,9 (0,6–1,3)	0,0001
Ангиотензин II, нг/мл	0,437 (0,232–1,625)	0,326 (0,059–1,664)	0,31

Примечание: p — критерий Манна-Уитни.

58%. В группе 2 аналогичные показатели составили 69, 73 и 51% соответственно.

Известно, что при воздействии ртути на организм происходит сокращение сосудов, снижается выработка сосудорасширяющих веществ, таких как оксид азота и другие [8]. В связи с этим можно предположить, что влияние ртути является пусковым механизмом снижения уровня NO<sub>x</sub> в крови лиц, подверженных ее воздействию, вне зависимости от генотипа полиморфного варианта T786C гена NOS3. Учитывая, что содержание NO<sub>x</sub> у носителей разных генотипов NOS3 было сопоставимо для лиц 1 и 2 групп, возраст которых различался, мониторинг уровня оксида азота в крови контактирующих с ртутью следует начинать в более раннем возрасте при малом стаже работы.

Необходимо отметить, что снижение концентрации NO<sub>x</sub> в крови рассматривается как один из факторов риска развития ишемических нарушений и артериальной гипертензии [5]. Обсуждая возможные механизмы изменения уровня NO<sub>x</sub> у лиц, экспонированных ртутью, следует отметить, что зарегистрированная у них гиперхолестеринемия [3] может рассматриваться в качестве компенсаторного механизма поддержания уровня оксида азота. В то же время, низкие концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и увеличение содержания холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), так-

же установленные у данных работающих [3], являются факторами риска снижения уровня NO<sub>x</sub> и повышения концентрации его антагониста эндотелина-1. Так, на культуре эндотелиальных клеток пуповины человека было показано, что ХС ЛПНП увеличивает секрецию эндотелина-1, тогда как ХС ЛПВП, наоборот, этот процесс тормозит [6].

Результаты проведенных исследований показали, что у лиц 1 группы уровень эндотелина-1 находился в диапазоне повышенных значений (референсный уровень — 0,26–1,0 фмоль/мл) и статистически значимо отличался ( $p=0,0001$ ) от такового в группе лиц, не имеющих ССЗ. Высокое содержание ЭТ-1 среди представителей группы 1 встречался у 60%, имеющих дикий генотип LysLys гена EDN1, и у 50% — с гетерозиготным генотипом. У обследуемых 2 группы аналогичные уровни ЭТ-1 встречались у 27 и 28% лиц соответственно. Результаты межгруппового сравнения показали, что среди носителей генотипа LysLys количество пациентов с повышенным уровнем ЭТ-1 в 1 группе статистически значимо было выше, чем в когорте лиц без ССЗ ( $p=0,001$ ). Различий в частоте отклонений от нормы содержания ЭТ-1 в зависимости от гетерозиготного генотипа в 1 и 2 группе обнаружено не было ( $p=0,12$ ). У всех лиц 1 группы, имеющих неблагоприятный генотип AsnAsn, уровень ЭТ-1 был повышен, в то время как у носителей данного генотипа из 2-й группы высокая концентрация ЭТ-1 встре-

чалась реже — в 17% случаев ( $p$  ( $\chi^2$  Пирсона) = 0,02;  $p$  (поправка Йетса) = 0,09).

Среди факторов, активирующих механизмы синтеза ЭТ-1, кроме ХС ЛПНП следует назвать также катехоламины и ангиотензин II [5]. Среднегрупповая концентрация последнего превышала референсный уровень (0,01–0,06 нг/мл) в обеих группах. Количество лиц, имеющих повышенное содержание ангиотензина II при наличии генотипов гена AGT (полиморфизм Thr174Met) в 1 и 2 группе практически не различалось ( $p=0,12$  и  $0,72$  соответственно). Относительный процент пациентов с сердечно-сосудистой патологией, имеющих повышенное содержание ангиотензина II, составил в среднем 50–60% в зависимости от генотипа полиморфизма Met235Thr. У лиц без ССЗ при наличии неблагоприятного генотипа данное увеличение отмечалось чаще. При этом статистически значимых различий в содержании повышенного уровня ангиотензина II в зависимости от полиморфных вариантов Met235Thr в группах обследуемых обнаружено не было.

Учитывая полученные результаты, можно выделить основные аспекты развития ССЗ у лиц, подвергавшихся воздействию ртути: Изменение уровня  $\text{NO}_x$  происходит на раннем этапе экспозиции токсикантом при небольшом стаже работы. Увеличение уровня ангиотензина II начинается до формирования сердечно-сосудистой патологии, при этом носители генотипа полиморфизма Met235Thr находятся в группе риска ранних изменений уровня ангиотензина II. В последующем повышение концентрации данного анализа отмечается и у лиц, не имеющих неблагоприятного генотипа. Поддержание в пределах референсных концентраций уровня ЭТ-1, скорей всего, следует рассматривать в качестве фактора, сдерживающего развитие ССЗ. При этом наличие неблагоприятного генотипа полиморфизма Lys198Asn является фактором риска повышения содержания ЭТ-1. Срыв компенсаторных механизмов, поддерживающих уровень ЭТ-1 в пределах референсных границ, может приводить к его неконтролируемому стойкому повышению и развитию сердечно-сосудистой патологии.

**Выводы.** 1. Изменения в содержании изучаемых биохимических маркеров ЭД (оксид азота, эндотелин-1, ангиотензин II) при воздействии ртути служат доказательством формирования ЭД у работающих, в том числе, не имеющих сердечно-сосудистой патологии. 2. Отмеченные изменения связаны с носительством «неблагоприятных» генотипов полиморфных вариантов Met235Thr гена AGT и Lys198Asn гена EDN1. 3. При наличии сердечно-сосудистых заболеваний у лиц, экспонированных ртутью, изменения в содержании биохимических маркеров ЭД не являются генетически детерминированным процессом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (см. REFERENCES стр. 5–8)

1. Белик В.П., Кудяева И.В., Маснабиева Л.Б. // Современная Лаборатория. Серия Медицинский алфавит. — 2014. — №1. — С. 36–38.
2. Козулин В.Ю. и др. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2004. — Т. 3. — С. 17–20.
3. Кудяева И.В., Бударина Л.А., Маснабиева Л.Б. // Мед. труда и пром. экология. — 2008. — № 8. — С. 7–12.
4. Попкова О.В., Кудяева И.В., Маснабиева Л.Б. // Современная Лаборатория. Серия Медицинский алфавит. — 2012. — Т. 4. №20. — С. 55–57.

#### REFERENCES

1. Belik V.P., Kudaeva I.V., Masnavieva L.B. // Sovremennaya Laboratoriya. Seriya Meditsinskiy alfavit. — 2014. — 1. — P. 36–38 (in Russian).
2. Kozulin V.Yu., et al. // Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. — 2004. — Vol. 3. — P. 17–20 (in Russian).
3. Kudaeva I.V., Budarina L.A., Masnavieva L.B. // Industr. med. — 2008. — 8. — P. 7–12 (in Russian).
4. Popkova O.V., Kudaeva I.V., Masnavieva L.B. // Sovremennaya Laboratoriya. Seriya Meditsinskiy alfavit. — 2012. — 4. — 20. — P. 55–57 (in Russian).
5. Alrefai A.A. et al. // Mol. Cell. Biochem. — 2016. — N 421(1–2). — P. 103–110.
6. Barsukov A.E., Makhnov N.A. // Vest. Khir. Im. II Grek. — 2005. — N164. — P. 102–104.
7. Kosior-Jarecka E. et al. // Molecular Vision. — 2016. — N 22. — P. 1256–1266.
8. Omanwar S., Fahim M. // Int. J. Toxicol. — 2015. — N 34(4). — P. 300–307.

Поступила 06.12.2016

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Наумова Ольга Вячеславовна (Naumova O.V.),  
мл. науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИМЭИ. E-mail: angpovolga@mail.ru.
- Кудяева Ирина Валерьевна (Kudaeva I.V.),  
зав. КДА, вед. науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИМЭИ, д-р. мед. наук, доц. E-mail: kudaeva\_irina@mail.ru.
- Маснабиева Людмила Борисовна (Masnavieva L.B.),  
ст. науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: masnavieva\_luda@mail.ru.
- Дьякович Ольга Александровна (D'yakovich O.A.),  
науч. сотр. лаб. иммуно-биохимич. и молекулярно-генетич. исслед. в гигиене ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: dyakovich.olga@mail.ru.
- Белик Владимир Павлович (Belik V.P.),  
вр. клинико-диагностич. лаб. ФГБНУ ВСИМЭИ.