

С. В. Федорович, С. М. Соколов, А. Н. Ганькин, И. С. Позняк,
Т. Д. Гриценко, В. М. Завальнюк

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРЕПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ

РУП «Научно-практический центр гигиены»

В развитие большинства предпатологических состояний, существенный вклад вносят факторы окружающей среды. Постоянное воздействие на организм ксенобиотиков, может вызвать сбой в работе ферментативной системы метаболизма. В статье представлены материалы, генотипирования второй фазы биотрансформации ксенобиотиков и оценки относительного риска развития заболеваний органов половой сферы у работников, контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами. Определены генотипические маркеры предпатологического состояния у работающих.

Ключевые слова: генетические маркеры, предпатологическое состояние, здоровье работающих, генотипирование, полиморфизм генов.

S. V. Fedorovich, S. M. Sokolov, A. N. Hankin, I. S. Poznyak, T. D. Gritsenko, V. M. Zavalnyuk

GENETIC MARKERS OF THE PRE-PATHOLOGICAL STATE OF HEALTH OF THE POPULATION

In the development of most pre-pathological conditions, environmental factors make a significant contribution. The constant effect on the body of xenobiotics, can cause a malfunction in the enzymatic system of metabolism. The article presents materials, genotyping of the second phase of biotransformation of xenobiotics and assessment of the relative risk of development of diseases of the genital organs in workers in contact with polycyclic aromatic hydrocarbons. Genotypic markers of the pre-pathological condition in the workers have been determined.

Key words: genetic markers, pre-pathological condition, workers health, genotyping, polymorphism of genes.

В развитии большинства патологических состояний, наряду с генетическими факторами, существенный вклад вносит влияние окружающей среды. Постоянное воздействие на организм ксенобиотиков в экологически неблагоприятных регионах вызывает сбой в работе ферментативной системы метаболизма, что приводит к росту многих социально значимых заболеваний.

Известно, что заболевания при одних и тех же условиях труда возникают не у всех работающих, а развившиеся болезни характеризуются различной нозоло-

гией, разнообразным течением, осложнениями и исходами [5]. При этом индивидуумы могут сохранять устойчивость или проявлять повышенную чувствительность к поступающим в организм токсическим веществам. С точки зрения генетики, эти различия объясняются индивидуальными особенностями, в основе которых лежит генетический полиморфизм человека. Генетические особенности могут быть фактором, предрасполагающим к развитию у чувствительных людей различных патологических изменений [2].

Роль генетических факторов в процессах формирования адаптационных способностей организма подтверждена многочисленными эпидемиологическими исследованиями, проведенными в различных странах [5]. Так, выявлено наличие связи между показателями загрязнения производственной среды и увеличением частоты профессиональных болезней органов дыхания, пищеварения, кожи, эндокринных заболеваний, иммунодефицитных состояний, онкопатологии [1].

Учитывая немаловажную роль системы детоксикации в обезвреживании вредных веществ, поступающих в организм рабочих в процессе производственной деятельности, представляется актуальным поиск генетических маркеров индивидуальной чувствительности работников, подвергающихся воздействию токсических веществ, на основе анализа полиморфизма ферментов биотрансформации ксенобиотиков [6].

В связи с неблагоприятными тенденциями динамики здоровья населения, для понимания процессов адаптации к многофакторному воздействию токсических факторов, актуальными являются комплексные молекулярно-генетические исследования, направленные на поиск маркеров экологического риска нарушений здоровья [1].

Изучение соотношения между процессами детоксикации и активации ксенобиотиков в разных условиях среды, позволит обосновать возможность искусственной регуляции ферментных систем, ответственных за метаболизм, с целью поиска путей профилактики и лечения заболеваний химической этиологии. В результате воздействия на организм ксенобиотиков могут возникать различные патологические изменения, которые по всей вероятности связаны, в первую очередь, с изменением скорости протекания биохимических процессов (изменением липидного обмена, активацией процессов перекисного окисления липидов, снижением антиоксидантной защиты клетки, с окислительным стрессом, модификацией структуры ДНК и т.д.), приводящих к различным функциональным изменениям на субклеточном, клеточном, а затем и на организменном уровне [4].

Материалы и методы

Среди ксенобиотиков, чужеродных для организма соединений, наиболее распространенными являются ароматические углеводороды, которые широко применяются в промышленности в качестве растворителей лаков, красок, в производстве синтетических волокон, каучука и др. В производственных условиях бензол и его гомологи поступают в организм человека ингаляционно и через неповрежденную кожу, вызывая острые и хронические интоксикации. Благодаря хорошей растворимости в липидах, они легко проникают в организм и обезвреживаются во многих органах и тканях. В основе интоксикации ароматическими углеводородами, независимо от пути их поступления в организм, лежат процессы активизации свободно-радикального окисления липидов и белков в печени и головном мозге.

Объектом исследования были выбраны работники цеха окраски и металлопокрытий (дом) ОАО «Минский автомобильный завод», контактирующих в процессе трудовой деятельности с гомологами бензола (ксилол, толуол). Исследуемую группу составили 340 человек, в том числе: 228 женщин (67%) и 112 мужчин (33%), средний возраст которых составил – 40,2±0,26; G-11,72; средний стаж работы (лет) в цехе – 9,3; G-13,9. Группу сравнения составили работники заводоуправления, в частности, работники заводоуправления информационных технологий того же завода – 136 человек, из них 65 женщин (47,8%) и 71 мужчина (52,2%), не контактирующих с ПАУ и другими химическими веществами, средний возраст – 39,8±1,3; G-11,3, средний стаж работы - 13,6±0,9; G-8,8.

У исследуемой группы проводился забор периферической крови из пальца во время ежегодного медицинского обследования. Определяли активность глутатион-S-трансферазы (GST), супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, глутатиона и тиоловых групп в гемолизатах крови. Полученные результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Показатели антиоксидантной системы (ферментативной и неферментативной) у работников контрольной группы и работников, контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Активность глутатионредуктазы (GR), мкмоль/гНбмин	3,30±1,23	3,05±1,16
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	3,0	24,7
Активность глутатионпероксидазы (GPO), мкмоль/гНбмин	309,5±93,58	345,8±63,52
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	3,0	19,5
Активность супероксиддисмутазы (СОД), мкг/мл	23,71±6,86	37,86±11,35
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	3,0	71,6
Содержание глутатиона восстановленного (GSH), мкмоль/мгНб	35,09±8,06	34,49±10,15
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	6,1	32,5
Содержание тиоловых групп (SH-групп), мкмоль/мгНб	0,23±0,054	0,23±0,068
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	–	40,3
Активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6FD), нмоль/НАДФН/гНбмин	4,95±0,66	5,09±0,73
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	–	32,5

Содержание 8-окси-2-дезоксигуанозина определяли иммуноферментным методом, предназначенным для количественного определения 8-окси-2-дезоксигуанозина в образцах мочи. В указанной методике используются моноклональные антитела к 8-охо-dG. Анти-8-охо-dG связываются с 8-охо-dG образца или стандарта удаляются при промывки, тогда как антитела, захваченные иммунобилизированным 8-охо-dG, выявляются вторыми антителами, конъюгированными с HRP. В методике используется субстрат тетраметилбензидин и абсорбция измеряется на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания обратно пропорциональна концентрации 8-охо-dG.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют, что активность фермента опытной группы ($3,05 \pm 1,16$ мкмоль/гНьмин) незначительно снижается по сравнению с показателем контрольной ($3,30 \pm 1,23$ мкмоль/гНьмин). Но в тоже время, процент частоты встречаемости отклонений составляет 24,7% по сравнению с 3,0% контрольной группы. Результаты дают основания полагать, что при воздействии экзогенных факторов производственной среды, в организме образуется достаточное количество побочных продуктов, которые не могут кинетически активно превращаться в безвредные медиаторы.

Интересным было проследить изменение активности фермента глутатионпероксидазы, инактивирующего образование перекиси водорода и липидных пероксидов. Показатели изменения активности фермента носят достоверный характер. Так, в гемолизатах крови рабочих контрольной группы она составляет 309,5 мкмоль/гНьмин, а у рабочих контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами – 345,8 мкмоль/гНьмин. Частота встречаемости отклонений в опытной группе составила 19,5%, против 3% в контрольной. Увеличение активности энзима под воздействием производственной среды свидетельствует об усилении метаболических процессов, в результате которых могут образовываться различные органические пероксиды и для уменьшения вредного воздействия этих соединений активируется работа одного из ключевых ферментов – глутатионпероксидазы.

Кроме указанных показателей, была исследована активность супероксиддисмутазы (СОД) в гемолизатах крови, как контрольной группы, так и у рабочих, труд которых длительное время был связан с производственными вредностями.

Сравнивая полученные результаты следует отметить, что активность СОД опытной группы существенно увеличивается ($37,86 \pm 11,35$ мкг/мл) по отношению к показаниям контрольных величин ($23,71 \pm 6,86$ мкг/мл), а процент частоты встречаемо-

сти отклонений в опытной группе составляет более 71 % против 3,0% в контроле. Указанное свидетельствует, что в результате воздействия производственного фактора в гемолизатах крови рабочих образуются супероксиды, которые приводят к образованию перекисей и для снижения уровня супероксидных радикалов, повышается активность супероксиддисмутазы, предотвращая процессы перекисного окисления липидов, стабилизируя физиологические функции клеточных мембран.

Анализ содержания восстановленного глутатиона в гемолизатах крови рабочих контрольной и опытной групп, показал, что количество метаболита в исследуемом материале опытной группы, составляет $34,49 \pm 10,15$ мкмоль/мгНь, а контрольной – $39,05 \pm 8,06$ мкмоль/мгНь. Расчет частоты встречаемости отклонений контрольной группы составил 6,1% против 32,5% опытной группы. Глутатион в клетке обеспечивает динамическое равновесие между различными физиологическими и биохимическими процессами и поэтому может изменяться и подстраиваться к различным стрессовым ситуациям. Он является буферным медиатором и нормализует физиологические процессы, исключая негативное влияние факторов производственной среды.

Тиоловые группы активно участвуют во многих биохимических процессах, включая восстановление перекисей, обезвреживание чужеродных органических соединений, а также выполнение коферментных функций глутатиона. Блокирование, разрушение или снижение количества SH-групп ведет к изменению активности многих ферментов. При анализе показателей, полученных в результате определения содержания тиоловых групп в гемолизатах крови рабочих, установлено что, изменение содержания SH-групп в опытной группе ($0,23 \pm 0,068$ мкмоль/мгНь) по отношению к контрольной группе ($0,23 \pm 0,054$ мкмоль/мгНь) не носит достоверный характер. Анализ данных частот встречаемости отклонений в опытной группе по отношению к контрольной, составляющих 40,3%, позволяет говорить о неблагоприятном влиянии факторов производственной среды на содержание тиоловых групп в гемолизатах крови.

В планируемый объем исследований входило изучение активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, одного из активных ферментов пентозофосфатного пути, в результате которого образуется клеточный НАДФ-Н, необходимый для поддержания уровня восстановленного глутатиона в клетке, синтеза жирных кислот и изопреноидов. Недостаточность фермента ведет к снижению содержания восстановленного глутатиона, что, в свою очередь, приводит к повышению образования токсических примесей и изменению состояния мембраны клеток. Полученные данные указывают, что активность фермента в опытной группе ($5,09 \pm 0,73$ нмоль НАДФН/гНьмин) незначительно увеличивается по сравнению к контрольной

(4,95±0,66 нмоль НАДФН/гНЬмин). Но в тоже время, процент частоты встречаемости отклонений в опытной группе составляет 32,5% по отношению к контрольной группе. Указанное свидетельствует о негативном влиянии внешних факторов на организм рабочих, что может привести к не обратимым процессам.

Следовательно, при сопоставлении полученных показателей антиоксидантной защиты организма у группы сравнения и работников, контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами, можно отметить, что значительных изменений по средним показателям изучаемых параметров не наблюдается, за исключением активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, сдвиг которых носит достоверный характер. Однако оценивая показатели частоты встречаемости отклонений по каждому изучаемому параметру, были отмечены различия между опытной и контрольной группами.

Рассматривая результаты активности исследуемых ферментов (глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза) в ранжированных группах по стажу, можно отметить, что в первой ранжированной группе,

наиболее высокие показатели концентрации супероксиддисмутазы наблюдаются у всех стажированных рабочих опытной группы. Эти уровни выше контрольных величин почти на 36,5% и носят значимый характер.

Выявлено достоверное снижение глутатиона в 1-ой опытной группе, ранжированной по стажу, а содержание глутатиона у рабочих 2-ой опытной группы практически не отличается от показаний контрольной группы.

Особый интерес вызывают результаты содержания тиоловых групп в гемолизатах крови работающих в стажированных группах. Так, у всех работников покрасочного цеха, ранжированных по стажу (опытная 1-ая группа), непосредственно контактирующих с вредными условиями производства, содержание метаболита в крови увеличено и носит достоверный характер. В тоже время в опытной 2-ой группе этот показатель незначительно выше по сравнению величинами контрольной группы.

Результаты исследования 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в моче опытной и контрольной групп представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8ОНbG) в моче у работников контрольной группы и работников, контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами

Показатели	Стаж	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2
Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8ОНbG), нг/мл		86,9±6,32	115,8±7,49	95,4±6,15
Частота встречаемости отклонений от контрольной группы, %	0–5 лет	6,4	24,3	10,9
		88,7±9,74	116,9±14,53	97,7±12,72
	6–10 лет	86,3±10,8	115,4±10,96	94,8±12,4
	11 и < лет	84,8±12,66	115,5±14,99	95,5±8,72

Примечание: $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

стаж которой составлял 0–5 лет, изменение активности изучаемых показателей находилось в пределах контрольных величин. У работников, которые имели стаж работы 6–10 и 11 и более лет, наблюдалось падение активности этого фермента, при этом изменения носят статистически достоверный характер.

Анализ активности фермента глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы у ранжированных групп по стажу показал, что у всех рабочих покрасочного цеха (1-ая опытная группа), в независимости от стажа работы, отмечается достоверной увеличение активности изучаемого фермента, а у 2-ой опытной группы показатели свидетельствуют об отсутствии значимых отклонений от показаний группы сравнения.

Как следует из анализа активности фермента глутатионпероксидазы, выявлено достоверное повышение его активности во всех опытных группах, ранжированных по стажу и самые высокие показатели у опытных групп, имеющие стаж работы одиннадцать лет и более.

При анализе активности СОД, в зависимости от стажа работы во вредных условиях установлено, что

Как следует из полученных результатов, содержание 8-окси-2-дезоксигуанозина в моче рабочих, непосредственно контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами (опытная группа 1) увеличивается по сравнению с рабочими контрольной группы и составляет в контрольной группе – 86,9±6,32 нг/мл, а в 1-ой опытной – 115,8±7,49 нг/мл, указанные изменения носят достоверный характер. В опытной группе 2 происходит недостоверное увеличение содержания данного метаболита по сравнению с контролем группой и составляет 95,4±6,15 нг/мл. Увеличение содержания 8-окси-2-дезоксигуанозина указывает на усиление процессов окислительного стресса в организме работающих. Особенно это проявляется у рабочих, непосредственно контактирующих с полициклическими ароматическими углеводородами (1-ая опытная группа).

Учитывая, что показатели средних величин недостаточно характеризуют воздействие вредных факторов производственной среды, нами был проведен анализ частоты встречаемости отклонений от контрольной группы, который показал, что в контрольной

группе, данный показатель выходил за пределы колебаний у 6,4% работающих, в то время, как в опытной группе 2 он составил 10,9%, а в опытной группе рабочих, непосредственно контактирующих с вредными условиями (опытная группа 1) выход за пределы контрольной группы составил 24,3%.

Особый интерес представляют результаты содержания 8-окси-2-дезоксигуанозина в моче работающих в стажированных группах. Так у всех работников покрасочного цеха (опытная группа 1), непосредственно контактирующих с вредными условиями производства, содержание метаболита в моче увеличено и носит достоверный характер. В тоже время в опытной группе 2, этот показатель незначительно выше по сравнению величинами контрольной группы и не носит значимого характера.

Таким образом, установлено достоверное снижение активности глутатион-S-трансферазы в гемолизатах крови у рабочих 1-ой опытной и стажированных группах 6–10, 11 и более лет; а частота встречаемости отклонений от контрольной группы составляла 33,7%.

Наблюдается значимое увеличение активности глутатионредуктазы у группы рабочих, которые непосредственно контактируют с вредными условиями труда (1-ая группа). Такую же направленность имеет и частота встречаемости отклонений от контрольной группы. Аналогичная закономерность прослеживается и при анализе результатов активности супероксиддисмутазы и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, как по общим среднестатистическим показателям, так и в группах, ранжированных по стажу. Показатель частоты встречаемости отклонений от контроля (СОД) – самый высокий и составляет 36,5%. Активность глутатионпероксидазы была выше во всех опытных и стажированных группах и носила достоверный характер.

Результаты содержания метаболитов неферментативной антиоксидантной системы (глутатион восстановленный и небелковые тиоловые группы) носили разнонаправленный характер. Так, содержание глутатиона восстановленного в гемолизатах крови в 1-ой опытной группе, ранжированной по стажу,

достоверно снижалась. Содержание тиоловых групп в этих же условиях также носило значимый характер.

Выявлены изменения содержания в моче 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-охо-dG) – показателя окислительного стресса. Так среднестатистическое содержание в 1-ой опытной группе достоверно увеличено ($115,8 \pm 7,49$ нг/мл) по сравнению с контролем на 33,2%. При этом частота встречаемости отклонений от контроля составила 24,3%. В ранжированной по стажу 1-ой опытной группе все значения достоверно увеличены по отношению к контролю; вторая опытная группа характеризуется повышенным содержанием данного метаболита, однако результаты свидетельствуют об отсутствии значимых отклонений.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о воздействии неблагоприятных факторов условий труда, главным образом химической природы, на ферментативную антиоксидантную систему, что необходимо учитывать при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров, особенно на химических предприятиях.

Литература

1. Баранов, В. С. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предродительную медицину / В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Е. Иващенко. – СПб: Интермедика, 2000. – 272 с.
2. Барышников, И. И. Критерии оценки здоровья населения и качества среды обитания / И. И. Барышников // Токсикологический вестник. – 1996. – № 4. – С. 10–13.
3. Брагина, Е. Ю. Полиморфизм генов трансформации ксенобиотиков GSTT1, GSTM1, CYP2E и CYP2C19 у больных атопической бронхиальной астмой / Е. Ю. Брагина, М. Б. Фрейдлин // Бюл. СоРАМН. – 2005 (117). – № 3. – С. 100–111.
4. Грачев, Ю. П. Загрязнение окружающей среды и здоровье человека. Печальный опыт России. – Новосибирск: СоРАМН, 2002. – 230 с.
5. Кузьмина, Л. П. Генетико-биохимические исследования в медицине труда / Л. П. Кузьмина // Вестник РАМН. – 2001. – № 10. – С. 89–91.
6. Ревазова, Ю. А. Генетические подходы к оценке безопасности факторов среды обитания человека / Ю. А. Ревазова, В. С. Журков // Вестник РАМН. – 2001. – № 10. – С. 77–80.