

УДК: 616-057+613.6+575.113:001.5

## ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В МЕДИЦИНЕ ТРУДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Стежка В.А., Верхолаз Н.В.

Институт медицины труда АМН Украины, г.Киев

Проведено обобщение данных литературы, касающихся установления ассоциации отдельных генетических маркеров полиморфизма генов с измененной чувствительностью организма к влиянию факторов производственной среды и риском развития некоторых профессиональных заболеваний. Сделан вывод о том, что принципиально новые и важные научные результаты в медицине труда могут быть получены на основании исследования генетического полиморфизма белковых систем организма с применением метода полимеразной цепной реакции. Это существенно расширит научные подходы к индивидуальной первичной профилактике развития профессиональных заболеваний путем научно обоснованного профессионального отбора.

**Ключевые слова:** полиморфизм генов, индивидуальная предрасположенность к заболеваниям, мультифакторные заболевания, профессиональные заболевания, полимеразная цепная реакция

В течение нескольких последних десятилетий созданы современные, порою сложные, но достаточно эффективные методы разделения различных многокомпонентных смесей белков на отдельные фракции по их специфическим биологическим свойствам. Это привело к обнаружению множественных молекулярных, генетически контролируемых белковых систем организма. Было показано, что альтернативные формы белков, находящиеся под строгим генетическим контролем, очень неравномерно распределены среди народов мира. Поэтому явление их генетического полиморфизма изначально было использовано для гено-географических исследований в популяционной генетике и антропологии [19]. Однако еще в 40–50 годах прошлого столетия среди исследователей различных специальностей, и в первую очередь среди биохимиков, сформировалась точка зрения, что биохимические реакции в организме имеют как общие основы химизма молекулярных процессов и функционирования более высоких и сложных по иерархическому построению физиологических систем, так и определенные особенности у разных индивидов, которые формируют их своеобразный индивидуальный профиль. В частности, большая часть известных на сегодня биохимических показателей гомеостаза имеет высокую индивидуальную изменчивость с вариацией порядка 15–50%. В ряде фундаментальных работ [23–27] показаны довольно существенные различия в активности многих ферментов, величинах иммунологических показателей, уровнях гуморальных и гормональных факторов в биосредах, некоторых показателях функционирования физиологических

систем организма у здоровых людей и различных видов лабораторных животных. Для человека характерна особенно широкая зона изменения величин физиологических показателей, в границах которых в определенных условиях сохраняется оптимальная жизнедеятельность организма. Это так называемый диапазон адаптационных модификаций организма.

В частности, ранее нами было показано, что у человека активность некоторых биохимических систем организма и ферментов значительно варьирует как в физиологических условиях, так и в ответ на экзогенные воздействия, в зависимости от времени суток и сезона года [20]. Так, наиболее высокая активность системы неферментативного свободнорадикального перекисного окисления липидов (СРПОЛ) наблюдалась в весенне-летний период года и по сравнению с осенне-зимним различия в ее активности по некоторым показателям составляли 2,5–6 раз. Активность ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту организма (АОС), также существенно зависела от сезона года. Различия в активности фермента супероксиддисмутазы достигали 7 раз, каталазы – до 3 раз. В то же время, активность главного сывороточного антиоксиданта – фермента церулоплазмин мало зависела от сезона года. Максимальные различия в его сезонной активности составляли 12%. По нашим наблюдениям, в динамике суток и в различные сезоны года у людей выявлялось изменение не только взаимосвязанного функционирования систем СРПОЛ и АОС, но и процессов переаминирования и гликолиза в организме. А также ферментативно-

го энергообеспечения реализации отдельных проявлений его реактивности по показателям фагоцитоза, бактерицидной активности фагоцитов в периферической крови вследствие достаточно резких изменений активности внутриклеточных ферментов и функциональных резервов последних. На основании этих исследований нами были выявлены временные точки в динамике суток и сезоны года, в которых неблагоприятные экзогенные воздействия на человека могут вызвать наиболее выраженные нарушения гомеостаза. В подтверждение этому нами были установлены сезонные различия (осень-весна) в состоянии свободнорадикального окислительного гомеостаза у рабочих, которые в условиях производства подвергались воздействию соединений свинца или были выведены из профессии в связи с установленным диагнозом хронической свинцовой интоксикации [18]. Эти различия были обусловлены сезонной направленностью ответной реакции АОС на наличие свинца в биологических средах обследованных людей.

Согласно концепции Р.Уильямса, определение значений пределов биохимической варибельности здорового человека является чрезвычайно важным, исходя из роли крайних вариантов нормы, как основы для выделения лиц со сниженными адаптационными возможностями и с большей предрасположенностью к различным заболеваниям. Вероятно, справедливым может быть и наше утверждение, что биохимическая индивидуальность организма — это совокупность индивидуальных показателей особенностей генетически детерминированных биохимических реакций, обеспечивающих как определенный уровень ответных реакций организма на воздействие экзогенных и эндогенных факторов, так и исход этих воздействий для организма.

В последнее десятилетие изучение биохимического полиморфизма популяций людей связано с решением целого ряда прикладных медико-биологических вопросов, в частности, при установлении роли генетической компоненты в предрасположенности отдельных индивидов к определенным заболеваниям. Доказано, что любая функция организма человека осуществляется посредством активации соответствующих генов, которые детерминируют все его морфо-функциональные свойства и признаки, в том числе и поведение в определенных условиях [10]. Особенности обмена веществ, детоксикации ксенобиотиков, иммунологической реактивности, нервной деятельности и многих других процессов в организме изначально определяются фун-

кционированием определенных генов, другими словами генетической конституцией человека. Болезнь также развивается на основе взаимосвязи внешних факторов, как правило, повреждающих и внутренних, сохраняющих биологическое наследственное постоянство [17].

В зависимости от относительной роли наследственных и средовых факторов в развитии болезни, последние, с генетической точки зрения, принято разделять на три основные группы [1, 9, 17]. Первая — болезни, для которых этиологическим фактором является наследственная генная, хромосомная или геномная мутация. В этом случае проявление патологии не зависит от влияния окружающей среды. Вторая группа представлена болезнями с наследственной склонностью, так называемыми мультифакторными болезнями (МФБ). Они развиваются под влиянием факторов окружающей среды, включая производственные, у лиц с определенной генетической конституцией — имеющих полигенные мутации. К этой группе относят полигенные заболевания ведущих физиологических систем организма — сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нервной, эндокринной и других. Считается, что основная роль в их развитии принадлежит факторам окружающей среды. Однако частота их возникновения и тяжесть течения существенно зависят от наследственной предрасположенности, выраженность (степень) которой определяется количеством мутировавших генов [31, 32]. Вклад МФБ в общую патологию человека составляет около 92%, а в детскую смертность даже в экономически развитых странах — 35–40%. Следовательно, создание благоприятных внешних условий может облегчить протекание этих болезней и даже предупредить их развитие. Последнее также зависит от степени полигенности мутаций у индивидуума. К третьей группе относятся болезни, в возникновении которых наследственность не имеет существенного значения — травмы, ожоги, однако влияет на их течение и исход [17].

Основными недостатками существующих методов определения наследственной склонности к определенным болезням (клинико-генеалогический, близнецовый, популяционно-статистический) являются: необходимость использования большого количества семей, близнецовых пар, как можно более полной генеалогической информации, эмпирических подходов. Более перспективным и современным подходом является выявление ассоциаций между МФБ и их генетическими маркерами. При

наличии последних у индивида можно судить о степени его генетически обусловленной склонности к какой-либо МФБ. В последнее десятилетие достигнуты определенные успехи в этом направлении, в частности, в изучении МФБ на основе анализа конкретных биохимических или иммунологических наследственно обусловленных признаков их развития. Для целого ряда заболеваний выявлены такие признаки или их комплекс. Методология обнаружения генетических маркеров склонности к МФБ заключается в сравнении частоты встречаемости тех или иных типов полиморфных белков, ферментов, антигенов у пациентов с конкретным заболеванием и в контрольной группе здоровых людей, а также в установлении статистически достоверной их ассоциации и количественного риска возникновения болезни.

В ранее проведенных нами исследованиях были разработаны биохимические и иммунологические критерии вредного влияния на человека и риска для его здоровья от воздействия соединений свинца. На основании этих и специально проведенных иммуногенетических исследований было показано, что некоторые антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA-комплекса) I класса (локусы А, В, С) А3, А10, Аw19, В7, Вw16, В18, В27 и HLA-антигенные комбинации А3Аw19, А2А10, В12Вw16, В13Вw16, В14Вw21, Вw16Вw18, Сw2bl, Сw4bl ассоциированы с повышенной чувствительностью организма человека к соединениям свинца [6, 21]. При этом оцениваемый риск увеличенного содержания свинца в биосредах организма составлял по отдельным антигенам от 1,2 до 3,0 раз по сравнению со среднепопуляционным уровнем. В этом плане важно также продемонстрировать результаты иммуногенетических исследований в небольшой группе лиц с установленным клиническим диагнозом токсического гепатита свинцовой этиологии (таблица). Практически у всех обследованных выявлен генетический дефект, который проявлялся отсутствием одного из обязательно парных HLA-антигенов в локусе В (больной 2) и, особенно, в локусе С (больные 1, 2, 4–6). Последнее, вероятно, можно рассматривать как высокую степень полигенных мутаций у некоторых из них (больные 2, 4, 5). Кроме того, во всех трех локусах у обследованных выявлялись как отдельные HLA-антигены, так и их комбинации, которые предопределяли повышенную чувствительность организма к биологическому действию соединений свинца.

Таблица

#### HLA-антигены у обследованных с токсическим гепатитом свинцовой этиологии

Больные	HLA-локусы		
	А	В	С
1. Р-й	1, 2	<b>16, 18</b>	<b>2, bl</b>
2. К-о	9, <b>10</b>	5, <b>bl</b>	<b>4, bl</b>
3. Б-в	2, 11	8, 13	2, 3
4. Р-в	1, 3	7, 12	<b>bl, bl</b>
5. П-а	2, 3	<b>13, 16</b>	<b>bl, bl</b>
6. А-в	1, 2	8, 17	<b>2, bl</b>

Примечания: 1) *bl* – отсутствие HLA-антигена(нов) в соответствующем локусе;

2) *подчеркнуты и выделены жирным отдельные HLA-антигены и их комбинации, предопределяющие повышенную чувствительность организма к соединениям свинца.*

Как известно, вероятность развития профессионального заболевания существенно зависит от интенсивности воздействия производственного фактора и стажа работы во вредных условиях. Между тем, на сегодня при проведении эпидемиологических исследований в отдельных профессиональных группах накоплены сведения о существенных индивидуальных различиях как в сроках развития профессиональных заболеваний, так и выраженности манифестации связанных с ними патологических процессов. Эти различия, согласно концепции экологической генетики, объясняются индивидуальными особенностями организма, в основе которых лежит генетический полиморфизм, другими словами, генетическое разнообразие человека. На возможность рассмотрения понятия профессионального риска как реализации причинно-следственной зависимости между вредным воздействием и болезнью и дозо-эффективной зависимости действия фактора с учетом индивидуальных (эндогенных) факторов риска (наследственность, вредные привычки) указывают [8].

В этой связи следует отметить установленную достоверную зависимость развития ряда заболеваний от полиморфизма групп (ABO) и антигенов крови систем MN, P, ABH, а также резус-фактора (Rh); некоторых фенотипов белков сыворотки крови – гаптоглобина (Hp), трансферрина (Tf), витамин Д-транспортующего белка (GC), 3-го компонента компонента (C3), ингибитора протеназ  $\alpha$ -1-антитрипсина (PI); эритроцитарных ферментов: кислой фосфатазы (AcP), фосфоглюкоматазы (PGM1), эстеразы (ESD), глиоксилазы (CLO1), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-PGD); изоформ фермен-

тов глутатион-S-трансферазы (GST), N-ацетилтрансферазы (NAT), цитохрома P-450 (CYP); генетических разновидностей антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA) [3, 7, 17, 39–41, 44].

В частности, при обследовании рабочих нефтехимического завода установлена генетическая детерминированность адаптационных реакций гемостаза [2]. Наибольшая функциональная устойчивость системы гемостаза наблюдалась у носителей гетерозиготного фенотипа гаптоглобина Hр2–1, тогда как носители гомозиготных его фенотипов Hр2–2 и Hр1–1 были подвержены гипокоагуляционным и гиперкоагуляционным сдвигам. По мере увеличения стажа рабочих существенно уменьшалась доля лиц с гомозиготными фенотипами Hр (Hр1–1 и Hр2–2) и, соответственно, увеличивалось представительство лиц с гетерозиготным Hр2–1. Авторы считают, что это обусловлено тем, что лица с гомозиготными фенотипами Hр постепенно покидают производство в связи с затруднением адаптации к условиям труда нефтехимического производства, чрезмерным напряжением регуляторных систем и нарастанием вегетативно-сосудистой дисфункции, которые тесно коррелировали со стажем.

По 15 биохимическим системам наследственно-го полиморфизма установлены определенные фенотипы и их комбинации, определяющие предрасположенность или резистентность человека к развитию силикоза [4]. Предрасположенность к силикозу ассоциировалась с фенотипами: фосфоглюкомутазы PGM 2–2, АВН-секреторов, антигенами HLA A28, В18. Резистентность к развитию этого заболевания определялась у обладателей фенотипов: иммуноглобулина Gm1(-), M1M1 системы α-1-антитрипсина, кислой фосфатазы AcPab, антигенов HLA A3, В12, В35. Риску развития силикоза подвержены обладатели таких комбинаций фенотипов: NN, Hр 2–2; Gm1 (-), AcPbb; M1M2, PGM 1–2, AcPab; M1M2, AcPbb. Устойчивость к силикозу ассоциировалась со следующими их сочетаниями: Rh (+), M1M2; Gm1(+), M1M2; MM, M1M2; Hр 2–2, M1M2; GC 1–2, M1M2; Gm1(+), Hр2–2; NN, Hр2–1. Авторы делают вывод о том, что применение генетических маркеров позволяет выявить среди обследованных практически здоровых лиц, работающих в условиях повышенной запыленности производственной среды, группы риска по развитию силикоза, о чем свидетельствовали высокие показатели риска развития данного заболевания, ассоциирующиеся с определенными фенотипами разных генетических систем

организма. Кроме того, проведенные исследования открывают возможность использования данных о генетическом статусе индивида при проведении профессионального отбора на силикозоопасные предприятия.

Другими исследователями [11, 12] проведено тестирование работающих в условиях воздействия пылевого фактора по 7 генетическим локусам и обнаружены достоверные различия по частоте выявления риска развития силикоза по 5 из них. Носители некоторых аллелей – Hр\*2; C3\*F; PGM1\*2-; P1\*C1; T1\*D; GC\*R характеризовались меньшими адаптационными возможностями и большей заболеваемостью силикозом в условиях воздействия пыли.

Обобщение результатов обследования больных такими профессиональными бронхолегочными заболеваниями, как силикоз, пылевой бронхит, бронхиальная астма, проведенное [12], с их точки зрения, дает основание предложить комплекс информативных генетико-биохимических показателей, отображающих наличие предрасположенности индивида не только к данным заболеваниям, но и к определенному их клиническому течению. В частности, по их мнению, при наличии экзогенного воздействия неблагоприятных факторов организм мобилизует «программу адаптивного поведения», конечная цель которой – повышение резистентности к раздражителю. Нередко такое приспособление связано с развитием воспаления с целью локализации повреждения и ограничения его распространения, а также восстановления поврежденной структуры. При этом развивается комплекс защитных реакций организма, включающих биохимические, клеточные, гуморальные, гормональные и другие механизмы, выполняющие различные функции – транспортные, антиоксидантные, ингибиторные, активирующие (стимулирующие) и прочие, которые генетически детерминированы. Преобладание того или иного типа реакций организма на неблагоприятное воздействие зависит именно от этого.

Показано, что между ведущими профессиональными заболеваниями бронхолегочной системы есть как общие, так и различные генетические маркеры, что и предопределяет особенности развития патологии данной системы. Так, общим генетическим маркером восприимчивости или чувствительности бронхолегочной системы к воздействию пылевого фактора можно считать гомозиготный фенотип гаптоглобина Hр\*2. При этом для риска развития именно силикоза характерно наличие фенотипов

СЗ-комплемента (СЗF, аллель PtA), трансферрина (Tf\*D), гомозиготного фенотипа эритроцитарной фосфоглюкомутазы (PGM1\*2-). Тогда как для развития пылевого бронхита и бронхиальной астмы — фенотипа а-ингибитора протеиназ (PI\*S). А для силикоза и пылевого бронхита — фенотипа группоспецифического компонента сыворотки крови, осуществляющего перенос витамина D<sub>3</sub> в организме (GC\*R). Важно также отметить, что ассоциации фенотипов второго эритроцитарного фермента — глиоксилазы (GLO1) с профессиональной патологией бронхолегочной системы авторами не установлено.

У лиц, контактирующих в производственных условиях с соединениями фтора и не имеющих рентгенологических признаков интоксикации, выявлено достоверное увеличение частоты антигена крови фенотипа P(-), что позволяет рассматривать его как маркер генетической устойчивости к их токсическому влиянию, а фенотипы 0 (AB0) и P(+) — как маркеры повышенной чувствительности соединительной ткани к ним [5]. Для выявления роли генетического фактора в развитии разных типов поражения костной ткани при флюорозе, а именно остеосклероза или остеопороза, авторами проведен анализ распространенности фенотипов исследованных биохимических систем у рабочих с этими костными заболеваниями. Среди больных остеосклерозом выявлено увеличение до 38,5% лиц с группой крови В (AB0), тогда как среди лиц с остеопорозом достоверное снижение наличия этого фенотипа до 16,2%. Это подтвердило, что развитие остеопороза при хронической фтористой интоксикации определяется, прежде всего, тропностью фтора к соединительной ткани, которая связана с фенотипом 0 (AB0). В работе [14] проведено тестирование больных хронической профессиональной фтористой интоксикацией, здоровых рабочих алюминиевого завода и контрольной группы по 12 генетическим системам. Установлены различия в распределении между обследованными группами генотипов фосфоглюкомутазы (PGM1), кислой фосфатазы (AcP), ушной серы (Serumen). В группе больных выявлена достоверно повышенная частота аллелей AcP1\*A, PGM1\*1-, фенотипов кислой фосфатазы AA, фосфоглюкомутазы 1+1+, 2+2+ и сухого типа консистенции ушной серы -d. Полиморфизм систем групп крови (AB0), сывороточных белков — Hp, Tf, Gc, C3, Pi и эритроцитарных ферментов — ESD, GLO1, 6-PGD не ассоциировал с развитием интоксикации. Авторы счи-

тают, что выявленные ассоциации полиморфных ферментов с хронической фтористой интоксикацией решают фундаментальную проблему — расшифровку патогенетического механизма воздействия фтористых соединений на организм.

В ряде работ показано, что при производственном контакте со свинцом у обладателей гомозиготного генотипа фермента аминولةвулилат-дегидрогеназы (ALAD1-1) содержание в плазме крови аминولةвулиновой кислоты (5-АЛК) выше, чем у имеющих гетерозиготный ее фенотип (ALAD 1-2). При этом важно отметить, что особенности генотипа не влияли на экскрецию 5-АЛК с мочой. Отмечена корреляция между содержанием в плазме крови свинца и 5-АЛК и Zn-протопорфирина. Авторы считают, что лица с разными генотипами ALAD могут иметь разную чувствительность к нейротоксическому действию свинца, опосредованному 5-АЛК. В то же время, проведенным анализом генотипа гена ALAD при наличии токсического действия свинца у рабочих, связанных с его выплавкой, установлено, что его фенотип влияет только на ассоциацию между уровнем свинца в плазме крови и содержанием в ней Zn-протопорфирина и не влияет на другие эффекты интоксикации свинцом [28, 42]. В другой работе показано, что наличие у обследованных, контактирующих со свинцом, аллели ALAD2 ассоциировало с меньшим содержанием креатинина и кальция в моче. Однако достоверной связи ALAD-генотипа с содержанием свинца в крови и костном мозге установить не удалось. Авторы считают подтвержденной связь генотипа ALAD с функцией почек. При этом не исключается, что сочетание аллелей ALAD1-2 (гетерозиготы) все-таки может быть связано с чувствительностью организма к каким-либо химическим веществам [29].

Многими исследователями высказывается предположение, что свободнорадикальное повреждение молекулы ДНК приводит к развитию ряда заболеваний, в том числе рака [43]. При этом, наряду с традиционными методами выявления повреждения этой молекулы и генотоксического действия, такими как одно- и двунитиевые разрывы, хромосомные aberrации, сестринские хроматидные обмены, в последнее время значительное внимание уделяется определению аддуктов ДНК. При исследовании экскреции с мочой окислительного аддукта ДНК 8-гидроксидезоксигуанозина (8-OhdG) у рабочих производства асбеста, резины, красителей выявлено увеличение его содержания в моче. Авто-

ры считают, что данный аддукт ДНК может быть использован как индикатор риска канцерогенеза при мониторинге определенных профессиональных групп.

В оценке индивидуальной чувствительности к токсичным и канцерогенным химическим соединениям представляет интерес полиморфизм ферментов суперсемейства монооксигеназ, среди которых одно из ведущих мест занимает цитохром P-450 [13]. Изоформы последнего находятся под генетическим контролем около 50 групп генов [39, 40]. Среди биомаркеров индивидуальной чувствительности людей к действию химических канцерогенов выделяются те, которые отражают различия на уровне метаболической активации этих веществ с участием цитохрома P-450 и зависимых от него монооксигеназ в печени и других органах [41]. К ним относятся: степень индуцируемости арилуглеводородгидроксилазы (бенз[а]пиренгидроксилазы) под влиянием полициклических ароматических углеводов, полиморфизм уровней окисления дебризолина/спартеина и полиморфизм ацетилирования (реакции конъюгации). Индивидуальные различия в активности цитохром P-450-зависимых ферментов достигают 30–100-кратных. Получены доказательства генетической регуляции (Ah-локус генома) ряда изоформ цитохрома P-450, которые превращают канцерогенные полициклические углеводороды, нитрозамины и бензол из преканцерогенов в фактические канцерогены у человека. Наиболее доказанными метаболическими активаторами канцерогенных химических веществ являются ферменты его фенотипов CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 и CYP2E1. Среди ферментов второй фазы метаболизма ксенобиотиков важное значение в канцерогенезе имеют полиморфизм N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2), осуществляющей процессы ацетилирования довольно узкого круга ксенобиотиков (преимущественно содержащих в своей структуре amino-ароматические и гидразиновые группировки), а также глутатион-S-трансферазы (GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, GSTZ, GSTS, GSTK), обеспечивающей детоксикацию большого числа эндогенных и экзогенных канцерогенов в различных компартментах клетки путем нуклеофильного замещения при их конъюгации и алкилировании с участием глутатиона [39]. Генотипы GSTP1, GSTT1, GSTM1, GSTM3 отдельно и в комбинации исследователи используют в качестве маркера злокачественного поражения легких (плоскоклеточный и мелкоклеточный рак, мезотелиома) и патологических

процессов, связанных с высоким риском злокачественной трансформации [30, 44]. Сочетание генотипов NAT2 и GSTM1 более чем в 7 раз увеличивает риск заболевания на мезотелиому легких при влиянии на человека пыли асбеста по сравнению с лицами, имеющими отдельно генотипы NAT2 или GSTM1 [34, 35]. Аналогичный эффект — увеличение риска развития рака легких наблюдается при сочетании генотипов GSTM1 и GSTT1. Установлен также полиморфизм супероксиддисмутазы, в первую очередь эритроцитарной растворимой формы данного фермента, имеющей три фенотипа SOD-A1, SOD-A2-1, SOD-A2, которые контролируются двумя аллелями SOD-A1 и SOD-A2, находящимися в локусе, ответственном за ее детерминацию на хромосоме 21. Известны генетические маркеры полиморфизма ферментов церулоплазмينا, щелочной и кислой фосфатазы, холинэстеразы, миелопероксидазы и других ферментов [44]. С точки зрения [22], изучение генетико-биохимического статуса необходимо для обоснования критериев индивидуального прогноза риска развития профессиональных заболеваний и экологически обусловленной патологии, лечения и рационального трудоустройства лиц с определенными генетическими особенностями организма.

Приведенные выше данные позволяют заключить, что в настоящее время принципиально новые и важные научные результаты в медицине труда могут быть получены на основе изучения полиморфизма белковых систем организма человека. Они позволят глубже оценить основу адаптационных реакций или патологических процессов, развивающихся вследствие воздействия неблагоприятных факторов производственной среды. При этом ответные реакции организма могут отображать преимущественно клеточные, тканевые, органые процессы в организме или его системную реакцию, как целого. Генетические маркеры биохимического полиморфизма ассоциированы с наследственно детерминированными особенностями реакций: на клеточном уровне — например, иммунокомпетентных клеток на внешние воздействия, риском реализации иммунотоксического действия химических веществ; на тканевом уровне — резистентностью соединительной, костной или другой ткани к различным токсическим воздействиям; на органном уровне — детоксицирующей функцией печени или легких; на системном уровне — особенностями нервной деятельности, специфическими процессами, например, биотрансформацией ксенобиотиков,

гормональним забезпеченням діяльності, антиоксидантними можливостями організму, ризиком розвитку вторичного імунodefіцита і онкологічних захворювань і прочее.

Однако, множественность биохимических процессов, которые необходимо исследовать при традиционном подходе к данной проблеме, требует, соответственно, и одновременного применения большого арсенала определенных, достаточно трудоемких и громоздких методов, а также, что особенно важно, — большого объема генетического материала. В частности, наиболее часто применяемыми методами при исследовании биохимического полиморфизма являются:

1. Многоступенчатая процедура выделения геномной ДНК из биологических образцов, которыми могут быть кровь, ткани, содержащие ядра клетки.
2. Эндонуклеазная рестрикция ДНК, т.е. получение фрагментов (или сайтов) ДНК со специфическими последовательностями из 4–6, реже 8–12 нуклеотидов, которые могут быть использованы в качестве ее генетических маркеров.
3. Физическое картирование полученных сайтов проведением электрофореза в крахмальном, агаровом, агарозном или полиакриламидном геле.
4. Идентификация сайтов ДНК блот-гибридизацией или гибридизацией *in situ* с применением флуоресцентных или радиоактивных меток, процедуры которых очень трудоемки.
5. Наконец, ауторадиография в течение 1–5 дней при  $-70^{\circ}\text{C}$  и учет результатов. При этом для реализации данных методов необходимы не только примерно до 10 дней, но и внушительные количества биологического материала: от 5 до 30 мл крови, граммы тканей. Исходя из вышесказанных методов, очевидны и существенные недостатки применяемой технологии исследования генетического полиморфизма, и их дороговизна.

Американским исследователем Карри Мюллисом в 1983 г был предложен альтернативный метод анализа геномной ДНК, за что через 10 лет он был удостоен Нобелевской премии. Это — метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в английской аббревиатуре — PCR. Метод ПЦР, или специфической амплификации, т.е. выборочного копирования определенного участка ДНК, позволяет избирательно синтезировать *in vitro* относительно небольшие участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов (п.о.), ре-

же — до 1000–2000 или 5000 п.о., используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие интересующую исследователя последовательность. Необходимым условием для проведения ПЦР является знание специфической нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК, так как выбор этого участка для амплификации осуществляется путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами. Последние являются олигонуклеотидными фрагментами ДНК длиной от 15 до 30 п.о., которые комплементарны к 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК. В качестве матрицы для синтеза может быть использован любой тип ДНК — геномная от отдельных индивидов различных видов про- и эукариот, из культур клеток, бактерий, растений [16]. С помощью ПЦР можно непосредственно исследовать места локализации предполагаемых мутаций или наличие полиморфных сайтов, а также изучать наличие других специфических особенностей молекулы ДНК. Для проведения ПЦР не требуется больших количеств матричной ДНК, и, в принципе, достаточно даже одной молекулы [37]. При этом в качестве фермента, обеспечивающего синтез копий фрагментов матричной ДНК, используется термофильная ДНК-полимераза, выделенная из бактерий, живущих в горячих источниках, и поэтому устойчивая к действию высоких температур. Известны, по крайней мере, 9 видов ДНК-полимеразы, обладающие определенными преимуществами при их использовании в некоторых рецептурах воспроизведения ПЦР [36]. Следует отметить, что различные органические компоненты клеток и тканей — белки, углеводы, липиды, фрагменты клеточных органелл или мембран в некоторых случаях заметно не препятствуют проведению амплификации. В качестве источника матричной ДНК можно использовать любой, даже деструктурированный биологический материал, сохранивший полный набор фрагментов исходной ДНК. Поэтому для специфической амплификации, наряду с очищенной ДНК, можно использовать высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, небольшие кусочки ткани (биоптаты), смывы со слизистых, культуральные среды, луковицы корней волос, цитогенетические соскобы, а также оставшиеся после патологоанатомического анализа длительно хранившиеся фиксированные ткани [33].

Информацию о сущности метода ПЦР, технических средствах его воспроизведения, рецептуре от-

дельных вариантов постановки, подходах к оптимизации процедуры ПЦР, устройстве лаборатории ПЦР-диагностики, обеспечении мер предосторожности и безопасности при работе с биологическим материалом на всех этапах реализации этого метода, существующих стандартных протоколах для различных вариантов постановки ПЦР, библиотеках, атласах и картах генов, кодирующих свойства различных белковых молекул с ответственными за это нуклеотидными последовательностями и имеющимися праймерами для реализации ПЦР, кроме специализированных научных журналов, можно найти в Internet на информационных сайтах Aport Ru, Weismann Institute of Science, Библиотеки Конгресса США и других.

По данным журнала *LabMedica International*, с 1995 г. наблюдается увеличение расходов на ПЦР-диагностику, что является показателем роста использования данного метода в практической медицине. Американские ученые констатируют, что затраты на ДНК-диагностику с 1996 по 2003 гг. возросли со 181,6 миллиона до 1400 миллионов долларов. По данным этого же журнала в настоящее время наиболее быстро развиваются пять основных направлений ПЦР-диагностики: диагностика инфекционных, онкологических, генетических заболеваний, идентификация личности, диагностика патогенов в пище. На сегодняшний день большинство специалистов мирового сообщества по ПЦР-диагностике считают, что наиболее эффективно и экономически рационально использование данного метода для обнаружения микроорганизмов, трудно культивируемых в лабораторных условиях, и атипичных форм бактерий. Поэтому наиболее широко ПЦР используется: в урогинекологической практике — для выявления большого перечня специфических инфекций данной локализации; в пульмонологии — для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных пневмоний, туберкулеза; в

клинике инфекционных болезней — в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллеза, дифтерии, вирусных гепатитов; в гастроэнтерологии — для диагностики геликобактериоза; в гематологии — для выявления цитомегаловирусной инфекции, онковирусов. Значительно реже в открытой печати встречаются научные публикации о применении данного метода для исследования генетического полиморфизма и установления генетических маркеров предрасположенности человека к определенным заболеваниям и, особенно, профессиональной патологии. С нашей точки зрения, развитие такого направления исследований в медицине труда является чрезвычайно перспективным. На современном этапе развития медицины труда внедрение достижений молекулярной биологии, в частности генетических исследований с применением метода ПЦР, может существенно расширить научные подходы к исследованию причин возникновения, в том числе ранних, профессиональных заболеваний и разработке средств их индивидуальной первичной профилактики путем научно обоснованного профессионального отбора.

В конце считаем необходимым привести мнение английского исследователя Гарри Харрис, высказанное им в последнем абзаце известной монографии [26]: «Мы приходим к примечательному парадоксу. Оказывается, что изучение генетики многих болезней может привести к разработке методов их предотвращения или лечения, заключающихся исключительно в изменениях среды. Весьма возможно, что одним из наиболее важных социальных и медицинских аспектов приложения генетических исследований окажется регулирование условий среды, поскольку, чем точнее мы сможем охарактеризовать генетическую конституцию индивидуума, тем яснее нам станет, каким образом следует изменять или приспособлять условия среды соответственно его потребностям».

## Литература

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. — М.: Медицина, 1997. — 287 с.
2. Галкина Л.М., Борисова Н.А. Генетические особенности адаптивных реакций системы гемостаза у работников нефтехимического производства // Матер. конф. «Современные методы диагностики и лечения заболеваний нервной системы». — Уфа, 1996. — С. 82–84.
3. Головенко Н.Я. Некоторые аспекты биохимии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P-450 // Совр. пробл. токсикол. — 2001. — №3. — С. 17–23.

4. Горбатовский Л.А., Морозова О.А., Лотош Е.А., Лузина Ф.И. Роль генетических факторов в развитии силикоза // Мед. труда и пром. экол. — 1996. — №7. — С. 13–16.
5. Данилов И.П., Протасов В.В., Лотош Е.А., Лузина Ф.А. Некоторые генетические маркеры подверженности профессиональному флюорозу // Мед. труда и пром. экол. — 2001. — №7. — С. 30–33.
6. Дмитруха Н.М., Стежка В.А., Чумак А.А., Минченко Ж.М. Імуногенетичні маркери індивідуальної чутливості людини до сполук свинцю, імунологічні і біохімічні критерії шкідливого впливу та ризику для здоров'я // Фізіол. журн. — 2000. — Т.46, №2. — С. 100.

7. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. – К.: Здоров'я, 1990. – 243 с.
8. Измеров Н.Ф., Капцов В.А., Денисов Э.И., Овакимов В.Г. Проблема оценки профессионального риска в медицине труда // Мед. труда. и пром. экол. – 1993. – №3-4. – С. 1-4.
9. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е.И., Блишкова Е.И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. – М.: Практика, 1996. – 410 с.
10. Кордюм В.А. Расшифровка генома человека: финиш чего, старт куда? // Лікування та діагностика. – 2000. – №3. – С. 6-11.
11. Кузьмина Л.П. Фенотипические и генотипические особенности сывороточных и эритроцитарных белков при профессиональной бронхолегочной патологии // Мед. труда и пром. экол. – 1997. – №9. – С. 26-30
12. Кузьмина Л.П., Тарасова Л.А. Биохимический профиль организма: теоретические и практические аспекты изучения и оценки в медицине труда // Мед. труда и пром. экол. – 2000. – №7. – С. 1-6.
13. Леоненко О.Б., Стежка В.А. Сучасні уявлення про механізми гомеостатичної реакції за участю біотрансформації і детоксикації хімічних речовин, вільнорадикального окислення, імунної та антиоксидантної систем організму // Матер. XIV з'їзду гігієністів України «Гігієнічна наука та практика на рубежі століть». – Дніпропетровськ: АРТ-ПРЕС, 2004. – С. 176-179.
14. Макаров С.В., Спицын В.А., Кравчук О.И. Генетические факторы предрасположенности к развитию профессионального флюороза // Мед. труда и пром. экол. – 2000. – №6. – С. 17-21.
15. Морозова О.А., Горбатовский В.Д., Суржиков В.Д. и др. Особенности наследственного полиморфизма у больных силикозом с сопутствующим хроническим бронхитом // Мед. труда и пром. экол. – 2001. – №4. – С. 9-12.
16. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Под ред. Ю.И.Бажоры, В.И.Кресюна, В.Н.Запорожана. – К.: Здоров'я, 1996. – 206 с.
17. Нейко Е.М., Ковальчук Л.Е. Мультифакторні хвороби: від теорії до практики // Лікування та діагностика. – 2001. – №4. – С. 14-19.
18. Падакина Е.В. Сезонные особенности некоторых биохимических процессов организма человека при воздействии соединений свинца и его носительстве // Современные проблемы медицины труда в Украине. – К., 1999. – С. 39-42.
19. Спицын В.А. Биохимический полиморфизм человека. – М.: МГУ, 1985. – 215 с.
20. Стежка В.А., Падакина О.В. Сезонні та циркадні ритми взаємопов'язаного фізіологічного функціонування систем вільнорадикального окислення та ендогенних біоантиоксидантів у людини // Фізіологія та патологія імунітету, гемостазу та перекисного окислення ліпідів (зб. наук. праць). – Полтава, 1997. – С. 213-215.
21. Стежка В.А., Дмитруха Н.М., Покровська Т.М. та ін. Критерії імунотоксичності важких металів, методи скрінінгового дослідження потенційної токсичності та імунотоксичної дії ксенобіотиків *in vitro* // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, №2. – С. 65-66.
22. Тарасова Л.А., Кузьмина Л.П., Милицникова В.В. Изучение генетико-биохимического статуса рабочих, подвергающихся воздействию промышленных аэрозолей // 5 Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство»: тез. докл. – М., 1998. – С. 460.
23. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Проблемы нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы). – М.: Медицина, 1991. – 208 с.
24. Трахтенберг И.М., Тычинин В.А., Сова Р.Е. и др. Основные показатели физиологической нормы у человека (руководство для токсикологов). – К.: Авиценна, 2001. – 372 с.
25. Уильямс Р. Биохимическая индивидуальность. Пер. с англ. – М.: Мир, 1960. – 210 с.
26. Харрис Г. Основы биохимической генетики человека. Пер. с англ. – М.: Мир, 1973. – 160 с.
27. Хрисанфова Е.Н. Конституция и биохимическая индивидуальность человека. – М.: МГУ, 1990. – 230 с.
28. Alexander B.H., Checkoway H., Costa-Mallen P. et al. Interaction of blood lead and aminolevulinic acid dehydratase genotype on workers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers // Environ. Health Perspect. – 1998, – V.106. – №4. – P. 213-216.
29. Berydahl I.A., Gerhardsson L., Schutz A. et al. Delta-aminolavulinic acid dehydratase polymorphism: Influence on lead levels and kidney function in humans // Arch. Environ. Health. – 1997. – V.52, №2. – P. 91-96.
30. Reszka E., Wasowicz W. Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk // Int. J. Occup. Med. Envir. Health. – 2001. – V.14, №2. – P.99-113.
31. Hani E.N., Stoffers D.A., Chevre J.C. et al. Detective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset tipe 2 diabetes mellitus // Clin. Invest. – 1999. – V.104. – P. 41-48.
32. Hearch A.C., Bucholz K.K., Madden P.A. et al. Genetic and environmental contributions to alcohol

dependence risk in a national twin sample – consistency of findings in women and men//Psychol. Med.– 1997.– V.27, №6.– P. 1381–1396.

33. Higuchi P., von Beroldingen C.H., Seusabangh G.F., Erlich H.A. DNA typing from single hairs//Nature.– 1988.– V.332.– P. 543–546.

34. Hirvonen A., Pelin K., Tammiletbo I. et al. Inherited GSTM1 and NAT2 defects as concurrent risk modifiers for asbestos-associated human malignant mesothelioma//Cancer Res.– 1995.– V. 55.– P. 2981–2983.

35. Hirvonen A. Polymorphism of xenobiotic-metabolising enzymes and susceptibility to cancer//Environ. Health Perspect.– 1999.– V.107.– P. 37–47.

36. Kogan S.C., Doherty M., Giischeir J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences//New Engl. J. Med.– 1987.– V.15.– P. 985–990.

37. Li C., Gyllensten U.B., Cui X. et al. Amplification and analysis of DNA sequence in single human sperm and diploid cells//Nature.– 1988.– V.335.– P. 414–417.

38. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction//Sci. Am.– 1990.– V.3.– P. 36–43.

39. Meyer U.A., Zanger U.M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism//Pharmacol. Toxicol.– 1997.– V.37.– P. 269–296.

40. Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J. The P450 superfamily: Up date on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trival names, and nomenclature//DNA Cell. Biol.– 1993.– V.12.– P. 1–51.

41. Palkonen O. Carcinogen metabolism and individual susceptibility//Scand. J. Work, Environ. Health.– 1992.– V.18 (Suppl. 1).– P. 17–21.

42. Sithisarankul P., Schwartz B.S., Lee B.-K. et al. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of the neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers//Am. J. Int. Med.– 1997.– V.32.– №1.– P. 15–20.

43. Uwarunkowania srodowiskowe i genetyczne raka pluca/Pod red. K.Rydzynskiego.– Lodz, 2000.– 150 s.

## ПЕРСПЕКТИВИ ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У МЕДИЦИНІ ПРАЦІ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДА ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

**Стежка В.А., Верхолаз Н.В.**

Інститут медицини праці АМН України, м.Київ

Проведено узагальнення даних літератури стосовно встановлення асоціації окремих генетичних маркерів поліморфізму генів зі зміненою чутливістю організму до впливу факторів виробничого середовища і ризиком розвитку деяких професійних захворювань. Зроблено висновок про те, що принципово нові і важливі наукові результати у медицині праці можуть бути отримані на основі дослідження поліморфізму білкових систем організму із застосуванням метода полімеразної ланцюгової реакції. Це суттєво розширить наукові підходи до індивідуальної первинної профілактики розвитку професійних захворювань шляхом науково обґрунтованого професійного відбору.

**Ключові слова:** поліморфізм генів, індивідуальна схильність до захворювань, мультифакторіальні захворювання, професійні захворювання, полімеразна ланцюгова реакція

## PERSPECTIVES OF GENETIC STUDIES IN OCCUPATIONAL HEALTH USING A POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD

**Stezhka V.A., Verkholaz N.V.**

Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kyiv

The generalization of the literature data was performed concerning associations of separate genetic markers of gene polymorphism with the changing body sensitivity to work environmental factors and risks of developments of some occupational diseases. It was concluded that new and important scientific results in occupational medicine are supposed to be received basing on studies of the polymorphism of protein body systems using a polymerase chain reaction method. This will allow to significantly broaden scientific approaches to individual primary prevention of occupational disease development through scientifically grounded professional selection.

**Key words:** gene polymorphism, individual sensitivity to diseases, multifactorial diseases, occupational diseases, polymerase chain reaction

Поступила 21.03.05

**Контактное лицо:** Стежка А.В., Институт медицины труда АМН Украины, ул. Саксаганского, 75, Киев 01033, Украина