УДК 575.113:616.24-003.661-057-084(477.61)

АСОЦІАЦІЯ МІЖ ГЕНЕТИЧНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНІВ GSTT1, GSTM1, CC16, TNF- α , P1 ТА РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ПНЕВМОКОНІОЗУ У ШАХТАРІВ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ

Горovenko H.G.¹, Zhurakhivska H.V.^{1,2}, Basanets A.V.², Podolska S.V.¹¹Кафедра медичної генетики Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ²Інститут медицини праці АМН України, м. Київ

Пневмокониоз (ПК) шахтарів вугільних шахт це мультичиннікільне захворювання, що виникає внаслідок поєднаної дії генетичних та екзогенних чинників. Для профілактики розвитку ПК важливе значення має оцінка ступеня ризику виникнення цього захворювання шляхом виявлення групи осіб, що мають спадкову схильність до ПК. Виходячи з механізмів патогенезу ПК, одними з найбільш реальних кандидатів на роль біомаркерів спадкової схильності до цього захворювання є гени GST, TNF- α , CC16 та P1.

Алельні поліморфізми генів GSTT1, GSTM1, TNF- α , CC16 та P1 були досліджені за допомогою молекулярно-генетичного методу у 112 хворих на ПК та 138 здорових (контрольна група) шахтарів зі стажем роботи під землею не менш ніж 13 років. Алелі генів GSTT1 та GSTM1 визначалися з використанням мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції. Для вивчення поліморфних ділянок гену TNF- α , CC16 та P1 застосовували ПЛР з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Для статистичної обробки результатів використовували стандартний метод χ^2 -квдрату (χ^2) та метод Z- критерію.

Частоти виявлення генотипів P1*MM та P1*MZ у групі здорових шахтарів статистично не відрізнялися від частот у групі хворих на ПК ($p = 0,19$). Гомозиготних носіїв алелю P1*Z не було в жодній з досліджених груп. Аналіз комбінацій алелів генів GSTT1, GSTM1, CC16, P1 та TNF- α засвідчив, що статистично достовірно більшою частота виявлення генотипів GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A ($Z = 2,13$, $p = 0,034$) і GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G ($Z = 1,99$, $p = 0,046$) була у контрольній групі. А частота генотипу GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A ($Z = 2,96$; $p = 0,003$) була значно вищою у групі хворих на ПК.

За результатами даного дослідження жоден з досліджених поліморфних варіантів гену P1 не має впливу на розвиток ПК у працівників вугільних шахт України. Встановлено, що генотип GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A є чинником ризику виникнення ПК у шахтарів вугільних шахт України, а генотипи GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A та GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G асоціюються з резистентністю до розвитку даного захворювання.

Ключові слова: пневмокониоз, поліморфізм, гени GSTT1, GSTM1, TNF- α , CC16, P1, метод Z-критерію

Вступ

У популяціях людини не менш як 25–30 % генетичних локусів представлені двома та більш алелями [1], тобто індивідуальні комбінації алелів є неймовірно різноманітними, вони створюють генетичну унікальність кожної людини, що відображається у реакціях організму на патогенні чинники навколишнього середовища. Відносна роль впливу генетичних чинників та навколишнього середовища на виникнення та перебіг хвороби індивідуальна для кожного випадку захворювання.

Пневмокониоз шахтарів вугільних шахт (ПК) відноситься до мультичиннікільних захворювань (МФЗ) з полігенним типом успадкування і виникає внаслідок поєднаної дії генетичних та екзогенних чинників. Підтвердженням мультичиннікільної природи ПК служить той факт, що далеко не всі робітники, що працюють в несприятливих умовах,

хворіють на дане захворювання. Так, за даними власних і зарубіжних досліджень на ПК хворіють від 1,5 до 8 % шахтарів, що працюють в підземних умовах [2, 3].

Існування спадкової схильності до ПК почали обговорювати нещодавно і на сьогодні конкретні механізми її реалізації тільки починають вималюватися. Виходячи з сучасних знань про природу МФЗ, передбачається, що сукупність генів, які відповідають за формування схильності до цих захворювань, утворює систему зв'язаних між собою елементів, ефекти взаємодії яких на рівні білкових продуктів визначають біохімічну індивідуальність людини. Залежно від цього у індивідуума формується властивий йому високий або низький ступінь схильності до розвитку того або іншого захворювання, який у разі аддитивної дії відповідних чинників зовнішнього середовища реалізується патоло-

гічним фенотипом. Таким чином, для розуміння спадкових основ ПК, як і інших МФЗ, необхідно встановити, яке саме «несприятливе» поєднання поліморфних варіантів генів схильності призводить до високої вірогідності розвитку патології.

Дані літератури останніх 10 років свідчать про зв'язок ПК, що виникає внаслідок впливу вугільного пилу, з 14 поліморфними генами-кандидатами. Залежно від функції білкових продуктів у процесі розвитку ПК їх можна розділити на кілька груп (табл. 1):

1. Гени, що впливають на стан окислювальних процесів у легенях, пригнічують антиоксидантний захист, порушують перекисне окиснення ліпідів та білків, внаслідок чого відбувається пошкодження клітин і рубцювання легеневої тканини.
2. Гени чинників запалення, серед яких, найважливішими є гени власне медіаторів запалення білкової природи — прозапальних цитокінів (інтерлейкінів, чинників некрозу пухлин та інші) які синтезуються альвеолярними макрофагами і епітеліальними клітинами та зумовлюють легеневі пошкодження та рубцювання.
3. Гени, що впливають на проліферацію фібробластів та на процес синтезу і руйнування колагену (наприклад деякі чинники росту та протеази).
4. Інші гени, які неможливо однозначно віднести ні до однієї з вказаних груп.

Виходячи із механізмів патогенезу ПК, що розвивається від дії вугільного пилу [30, 31] та закор-

донних джерел літератури одними з найбільш реальних кандидатів на роль біомаркерів спадкової схильності до цього захворювання є гени GST, TNF- α , CC16 та Pi. В Україні дотепер подібні дослідження не проводилися.

Мета роботи: аналіз поліморфізму гену Pi та оцінка ролі поєднань алельних варіантів генів GSTT1, GSTM1, TNF- α , CC16 і Pi у процесі розвитку ПК шахтарів вугільних шахт України. Визначення можливості використання означених алельних варіантів як біомаркерів спадкової схильності до ПК.

Матеріали та методи

У ході роботи було обстежено 112 хворих на ПК шахтарів, що працювали у вугільних шахтах Донецького та Луганського регіонів в основних професіях: гірничий робітник очисного забою (ГРОЗ), гірничий майстер, забійник, прохідник, кріпильник, підземний електрослюсар та машиніст гірничовиймальних машин (МГВМ). Стаж їх роботи під землею був не меншим 13 років. Вік обстежених коливався у межах від 38 до 76 років, середній вік становив 52,5 років. Хворі знаходилися на лікуванні у терапевтичному відділенні клініки Інституту медицини праці. Діагноз ПК встановлювався лікарем-профпатологом на підставі клінічного обстеження з використанням рентгендіагностики, комп'ютерної томографії, спірографії та загальноклінічних лабораторних методів.

Таблиця 1

Відомі гени-кандидати пневмоконіозу

Ген	Білковий продукт	Посилання
<i>I. Гени, що впливають на стан окислювальних процесів у легенях</i>		
GST	Глутатіон-S-трансфераза	4, 5, 6
<i>II. Гени власне медіаторів запалення</i>		
TNF- α	Чинник некрозу пухлин α	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CC16	Білок клітин Клара 16	4, 16, 17
IL-1	Інтерлейкін 1	9, 11, 18, 19
IL-6	Інтерлейкін 6	10, 20, 19, 21
IL-8	Інтерлейкін 8	8
IL-12	Інтерлейкін 12	22
<i>III. Гени, що впливають на процес синтезу та руйнування колагену</i>		
Pi	α -1-антитрипсин	19, 23, 24
TGF- α	Трансформуючий чинник росту	4, 18, 25, 26, 27, 28
PDGF	Чинник росту тромбоцитів	29
<i>IV. Інші гени</i>		
HP	Гаптоглобін	23, 24
TF	Трансферин	23, 24
PGM	Еритроцитарна фосфоглокомутаза	23, 24
C3	Третій компонент комплементу	23, 24

Групу контролю складали 138 шахтарів, що не хворіли на ПК та не мали будь-якої бронхолегеневої патології, але стаж та умови праці яких відповідали таким, що були у шахтарів основної групи. Вік обстежених коливався у межах від 32 до 69 років, середній вік становив 49,7 років. Обстеження здійснювалося лікарем-профпатологом з використанням рентгенодіагностики, спірографії та загальноклінічних методів на базі міської лікарні м. Донецька № 25.

Для здійснення молекулярно-генетичного аналізу ДНК виділяли з лейкоцитів периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи «DNA PCR test» (ООО Лаборатория Изоген, Росія) відповідно до інструкції. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) проводилася з використанням амплі-

фікатору Perkin-Elmer 2700 та реагентів фірми Fermentas (США). Протоколи ПЛР та аналізу довжин рестрикційних фрагментів, а також послідовність олігонуклеотидних праймерів, що застосовувалися для дослідження поліморфізмів генів GSTT1, GSTM1, TNF- α та CC16 описані у наших попередніх публікаціях [6, 15, 32]. Послідовність олігонуклеотидних праймерів, протокол ПЛР та температурний режим ампліфікації, що наведені у таблицях 2, 3 і 4 використовувалися для визначення алейного поліморфізму гену *Pi*.

Продукти ампліфікації гену *Pi* оброблялися рестриктазою TaqI фірми Fermentas. Інкубація тривала 2 години при температурі 650С. Реакційну суміш готували за протоколом, наведеним у табл. 5.

Таблиця 2

Протокол реакційної суміші для ПЛР

Ген, фрагмент якого ампліфікувався	Реагенти	Кількість
<i>Pi</i>	10× Taq буфер	5 μ l
	2 mM dNTP mix	5 μ l
	25 mM MgCl ₂	3 μ l
	Праймери (табл. 3)	25 pmol кожного
	Taq DNA полімераза	1,5 unit
	ДНК (> 0,2 mg)	10 μ l
	H ₂ O (стерильна)	Довести об'єм до 50 μ l

Таблиця 3

Олігонуклеотидні праймери, що використовувалися для ПЛР

Ген, фрагмент якого ампліфікувався	Послідовності праймерів (5' – 3')	Розмір фрагменту	Посилання
<i>Pi</i>	TAAGGCTGTGCTGACCAT CGTC GGAGACTTGGTATTTGTTCAATC	144 п.н.	[33]

Таблиця 4

Режими ампліфікації генних локусів

Ген, фрагмент якого ампліфікувався	Назва етапу	Температура, °C	Час, с	Кількість циклів
<i>Pi</i>	Денатурація	95	300	35
	Денатурація	94	30	
	Віджиг	59	30	
	Синтез	72	30	
	Пролонгація синтезу	72	600	

Таблиця 5

Протокол суміші для рестрикційного аналізу

Ген, фрагмент якого ампліфікувався	Реагенти	Кількість	Розмір фрагментів	Посилання
<i>Pi</i>	10× Буфер Tango	1,25 μ l	Генотип MM: 123 та 21 п.н. Генотип ZZ: 144 п.н. Генотип ZM: 123, 21 та 144 п.н.	[33]
	Фермент TaqI	1 unit		
	H ₂ O (стерильна)	Довести об'єм до 2,5 μ l		
	ДНК (продукт ампліфікації)	10 μ l

Рис. 1 Електрофореграма продуктів рестрикції у процесі аналізу поліморфізму гену *Pi*.

Примітка: Зразки 1, 2, 3, 4, 5 – *Pi***MM*. *M* – маркер молекулярної маси.

Візуалізація продуктів ампліфікації та рестрикції генних локусів *GSTM1*, *GSTT1*, *CC16*, *TNF-α*(-308) та *Pi* здійснювалася у 2–3 % агарозному гелі (рис. 1).

Для статистичного аналізу отриманих даних використовували стандартний метод χ^2 -критерію та метод *Z*-критерію [34, 35].

Результати

Відомо, що кожен з генів *GSTT1*, *GSTM1*, *CC16*, *TNF-α* та *Pi* може бути представлений кількома поліморфними варіантами алелів [6, 15 32, 36]. У попередніх працях нами були досліджені частоти розповсюдження алелів *GSTT1*(-/-), *GSTT1*(+), *GSTM1*(-/-), *GSTM1*(+), *CC16***A/A*, *CC16***A/G*, *CC16***G/G* і *TNF-α***A/A*, *TNF-α***A/G*, *TNF-α***G/G* [6, 15 32]. Асоціація ризику розвитку ПК була виявлена для генотипів *GSTM1*(+), *TNF-α*-308**G/A* та алелю *TNF-α*-308**A*. Генотипи *GSTM1*(-/-) та сполучення алелів *GSTM1*(-/-);*GSTT1*(-/-) виявили себе як чинників стійкості до ПК. Проте, слід зазначити, що сам по собі генотип *GSTT1*(-/-) та всі поліморфні варіанти гену *CC16*(*A38G*) не впливають на спадкову схильність або резистентність до ПК у працівників вугільних шахт України.

У даному дослідженні нами була визначена частота розповсюдження алелів *M* та *Z* гену *Pi* у групі хворих на ПК шахтарів та в контрольній групі. Отримані результати відображені у вигляді діаграми на рис. 2.

Як видно з наведених даних, в групі хворих на ПК всі обстежені особи мали гомозиготний генотип –

MM. В контрольній групі 4 особи (2,9 %) були гетерозиготними носіями (*MZ*), а 134 (97,1 %) мали генотип *MM*. Гомозигот за алелем *Z* в жодній групі не знайдено. Різниця 2,9 % у частотах виявлення *MZ* генотипу між двома обстеженими групами виявилася статистично не достовірною ($P = 0,19$). Це пояснюється малою популяційною частотою алеля *Z*, що для кавказької популяції складає 0,3–4 % [37, 38] та недостатньо великою кількістю осіб у вибірці обох груп.

При аналіз всіх можливих комбінацій поєднання різних комбінацій алелів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *CC16*, *TNF-α* та *Pi* утворюється 133 різних сполучень деякі асоціації яких можуть, доповнюючи одне одного, сприяти розвитку ПК. Попри велику кількість варіантів алельних поліморфізмів, статистично достовірною різниця між частотами розподілення генотипів у групах хворих на ПК та контрольній була виявлена лише для трьох із них. А саме:

1. Генотип *GSTM1*(-/-);*CC16*(*A38G*)**A/A* у групі хворих на ПК був виявлений тільки у 1 особи (частота 0,9 %), а в контрольній групі у 10 осіб (частота 7,2 %). Значення *Z*-критерію дорівнює 2,13 при $P = 0,034$.
2. Генотип *GSTT1*(-/-);*GSTM1*(+);*TNF-α*-308**G/A* був визначений у 5 осіб серед хворих на ПК, що склало 5,12 %. Проте, у контрольній групі жоден з шахтарів не мав зазначеного генотипу (частота 0 %). Величина *Z*-критерію ($Z = 2,96$, $P = 0,003$) свідчить про статистично достовірну різницю.
3. Генотип *GSTT1*(-/-);*GSTM1*(-/-);*TNF-α*-308**G/G* мали 6 (5,4 %) хворих шахтарів та 19 (13,8 %) обстежених контрольної групи. Статистично достовірною різниця між частотами складала 8,4 % ($\chi^2 = 3,97$, $P = 0,046$; $Z = 1,99$, $P = 0,046$).

Рис. 2 Розподілення поліморфних варіантів гену *Pi* у хворих на ПК та в контрольній групі.

Обговорення

Так як раніше ми вже виявили асоціацію між алелем GSTM1(-/-) і стійкістю до розвитку ПК [6], та прийшли до висновку, що наявність CC16(A38G)*A/A ніяк не впливає на процес виникнення захворювання [32], то було логічним припустити, що вища частота виявлення генотипу GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A в контрольній групі підтверджує гіпотезу щодо протективної ролі делетованого гену GSTM1. У двох інших генотипах, частота виявлення яких є різною у групах хворих та здорових шахтарів, також присутній ген GSTM1. Причому, у генотипі GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A, частота виявлення якого більша серед хворих, він представлений нормальним алелем, а в генотипі GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G з частотою, більшою у контрольній групі — делетованим. Ці данні збігаються з результатами, що були отримані та проаналізовані нами для алелів GSTM1(-/-) і GSTM1(+)[6]. Роль генотипів TNF- α -308*G/A та TNF- α -308*G/G також вже розглядалася у попередній публікації [15]. Той факт, що TNF- α -308*G/A входить до генотипу GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A, який виявив себе у даному дослідженні, як чинник ризику розвитку ПК, пояснюється більшою кількістю білкового продукту, що синтезується при наявності алелю A і сприяє розвитку запальної реакції. І навпаки, у генотипі GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G ген TNF- α , що представлений двома алелями G, сприяє зниженню рівня синтезу білку і таким чином може запобігати надмірному утворенню фіброзної тканини у легенях. Але у процесі аналізу ролі поліморфних варіантів TNF- α генотип TNF- α -308*G/G не мав впливу на розвиток ПК. Для пояснення його функції у асоціації з генами GSTT1(-/-) та GSTM1(-/-) розглянемо роль GSTT1(-/-) у генотипах GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A та GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G. Білок θ , кодований геном GSTT1, є ефективним детоксикантом багатьох хімічних сполук. Серед них найбільш поширені — це полютанти навколишнього середовища, що утворюються при згоранні палива у двигунах внутрішнього згорання або потрапляють до організму у складі тютюнового диму. Родині генів глутатіон-S трансферази притаманний ряд важливих властивостей: субстратна специфічність, що може перекриватися, індукцйбельність та генетичний поліморфізм. Перше означає, що у багатьох випадках метаболізм одного ксенобіотика здійснюється кількома ізоферментами і серед них

перевагу має той, який в даних умовах здійснює метаболізм з найвищою швидкістю. Відомо, що, гени GSTM1 є головними в метаболізмі і детоксифікації поліароматичних сполук хінону та бензохінону, що входять до складу певних видів палива та тютюнового диму. GSTM1 активно експресуються в легенях людини. Якщо внаслідок делеції гену GSTT1 білок θ не синтезується, то ксенобіотики, які мають бути ним знешкоджені, по-перше викликають підвищення рівня експресії гену GSTM1. При цьому додатковий синтез білку μ має частково замінити нестачу білка θ . По-друге вказані ксенобіотики активують додаткове вивільнення макрофагів та експресію TNF- α у легенях. Отже, попри те, що сам по собі ген GSTT1(-/-) не впливає на розвиток ПК, його роль полягає у посиленні функції генів GSTM1 та TNF- α , яка залежно від алельного поліморфізму може бути протективною або навпаки сприяти захворюванню на ПК.

Висновки

1. Внаслідок аналізу частот розповсюдженості алелів M і Z та генотипів Pi*MM, Pi*MZ, Pi*ZZ гену Pi не було виявлено асоціацій із ризиком розвитку ПК.
2. Аналіз комбінацій алелів генів GSTT1, GSTM1, CC16, TNF- α та Pi дав змогу виявити статистично достовірну різницю між частотами розподілення у групі ПК та контрольній групі для наступних трьох генотипів: GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A, GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A та GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G. Причому, частота розподілення GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A та GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G була статистично достовірно більшою у групі шахтарів без патології бронхолегеневої системи (відповідно: Z = 2,13; P = 0,034 та Z = 1,99, P = 0,046), а генотипу GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A — у групі хворих на ПК (Z = 2,96; P = 0,003).
3. В українській популяції генотипи GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A та GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G можна розглядати як чинники стійкості до захворювання на ПК у шахтарів вугільних шахт, в той час, як генотип GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A може свідчити про схильність до даного захворювання.

Дане дослідження було виконане у рамках гранту Президента України для обдарованої молоді № 5 за 2005 рік.

Література

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика: Учебное пособие. – М.: Геотар-мед, 2002. – С.201–202.
2. Cherry N., Chen Y., Holt D.L., McDonald J.C., Meyer J.D. SWORD'99: surveillance of work-related and occupational respiratory diseases in the UK // *Occupational medicine.* – 2001. – Vol.51. – №3. – P.204–208.
3. Горовенко Н.Г., Басанец А.В., Жураховская Н.В. Генетические исследования в профессиональной патологии. // *Журн. АМН України.* – 2005. – т. 11. – № 2. – С. 346–360.
4. Schins R.P., Borm P.J. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are increased in coal miners with pneumoconiosis // *Eur. Respir. J.* – 1995. – Vol. 8. – №10. – P.1658–1663.
5. Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A. Glutathione-S-transferase: genetics and role in toxicology – a review // *Toxicol Lett* – 2000. – Vol. 112–113. – P. 357–363.
6. Горовенко Н.Г., Басанец А.В., Жураховська Н.В. Вивчення ролі деяких біомаркерів спадкової схильності та резистентності до пневмоконіозу від впливу вугільного пилу // *Український журнал з проблем медицини праці* – 2007. – № 1. – С. 3–8.
7. Zhai R., Jetten M., Schins R.P.F., Franssen H., Borm P.J.A. Polymorphisms in promoter of the tumor necrosis factor- α gene in coal miners // *Am. J. Ind. Med.* 1998. – Vol.34. – P. 318–324.
8. Kim K.A., Lim Y., Kim J.H., Kim E.K., Chang H.S., Park Y.M., Ahn B.Y. Potential biomarker of coal workers' pneumoconiosis // *Toxicology letters.* – 1999. – Vol. 108. – P. 297–302
9. Yucesoy B., Van Vallyathan, Douglas P., Landsittel, Dan I Sharp, Ainsley Weston, Gary R. Bursleson, Petia Simeonova, Michael McKinstry, Michael I. Luster. Association of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 Gene Polymorphisms with Silicosis // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 2001. – №173- P.75–82.
10. Zhai R., Liu G., Ge X., Bao W., Wu C., Yang C., Liang D. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis // *Respir Med.* – 2002- Vol.96. – №10. – P. 829–34.
11. Yucesoy B., Vallyathan V., Landsittel D.P., Simeonova P., Luster M.I. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses // *Mol Cell Biochem.* – 2002- Vol. 234–235. – №1–2. – P. 219– 224.
12. Vanhee D., Molet S., Gosset P., Tillie-Leblond I., Boitelle A., Wallaert Tonnel A.B. Expression of leucocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) // *Clin. Exp. Immunol.* – 1996- Vol. 106. – №3. – P. 541–548.
13. Kim K.A., Cho Y.Y., Cho J.S., Yang K.H., Lee W.K., Lee K.H., Kim Y.S., Lim Y. Tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphism in coal workers' pneumoconiosis // *Mol Cell Biochem.* – 2002- Vol. 234–235. – № 1–2. – P. 205–209.
14. Nadif R., Jedlicka A., Mintz M., Bertrand J.P., Kleeburger S., Kauffmann F. Effect of TNF and LTA polymorphisms on biological markers of response to oxidative stimuli in coal miners: a model of gene-environment interaction. Tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha // *J Med Genet.* – 2003 – Vol. 40. – № 2. – P. 96–103.
15. Горовенко Н.Г., Басанец А.В., Жураховська Н.В. Поліморфізм гену TNF- α -308*G/A як біомаркер ризику розвитку пневмоконіозу у шахтарів вугільних шахт // *Український журнал з проблем медицини праці* – 2007. – № 2. – С. 15–20.
16. Lesurr O., Alfred M., Bern Bernard O. Clara Cell Protein (CC-16) and Surfactant-Associated Protein A (SP-A) in Asbestos-Exposed Workers // *Clinical Investigations* – 1996 – Vol. 109. – P. 467–474.
17. Albrecht C., Weishaupt C., Steinfartz Y., Friemann J., Borm P.J.A. Clara-cell hyperplasia induced by intratracheal instillation of various particulates // *Inhalation Toxicology* – 2001. – Vol. 13. – P. 101–115.
18. Bodo M., Conte C., Abbritti G., D Alessandro A., Bellocchio S., Baro Calvitti M., Muzi G., Lumare A. Silica and its Antagonistic Effects on Transforming Growth Factor-beta Fibroblast Extracellular Matrix Production // *Journal of investigative of medicine.* – 2001. – Vol. 49. – № 2. – P. 146–156.
19. Любченко П.Н. Пневмоконіоз в сучасному світі. // *Мед. труда и пром. экология.* – 2004. – № 6. – С. 1–5.
20. Huang X., Zhang Q. Coal-induced interleukin-6 gene expression is mediated through ERKs and p38 MAPK pathways // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2003. – Vol.192. – №1. – P.40–47.
21. Zhai R. The G to C polymorphism at -174 of the interleukin-6 gene is rare in a southern Chinese population // *Pharmacogenetics.* – 2001. – Vol. 11. – № 8. – P. 699–702.
22. Huaux F., Arras M., Tomasi D., Barbarin V., Delos M., Coutelier J.P., Vink A., Phan S.H., Renaud J.C., Lison D. A profibrotic function of IL-12p40 in experimental pulmonary fibrosis // *J. Immunol.* – 2002. – Vol.169. – №5. – P.2653–2661.
23. Кузьмина Л.П. Медицина труда. Введение в специальность. – М. – 2002. – С. 152–183.
24. Izmerov N.F., Kuzmina L.P., Tarasova L.A. Genetic-biochemical criteria for individual sensitivity in development of occupational bronchopulmonary diseases // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 2002. – Vol.10. – № 1–2. – P.35–41.
25. Awad M.R., El Gamel A., Hasleton P., Sinnott P., Hutchinson I.V. Polymorphism in transforming growth factor-beta 1 gene and its correlation to TGF-beta 1 production, allograft fibrosis and fibrotic lung diseases // *Eur J Immunogenet.* – 1998. – Vol. 25. – P. 70.
26. Awad M.R., El Gamel A., Hasleton P., Turner D.M., Sinnott P.J., Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene: association with transforming growth factor- β 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation // *Transplantation.* – 1998- Vol. 66. – P. 1014–1020.

27. King J., Sinnott P., Swindell R., Pickering C., Thatcher N., Hasleton P. Transforming Growth factor-1 DNA polymorphisms in asbestos-related pulmonary fibrosis // *Eur Respir J*-2000.- Vol. 16.- № 13.- P. 526.
28. Yao W.N., Wang M.Z., Wang Z.M., Hao C.F., Wang N. The relationship between the concentration of TGF-beta1 in serum and its gene polymorphisms in CWP // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Dan*-2005.- Vol. 36.- № 6.- P.827-829.
29. Zhou X., Tan F.K., Stivers D.N., Arvett F.C. Microsatellites and intragenic polymorphisms of TGF- and PDGF and their receptor genes in native Americans with systemic sclerosis. A preliminary analysis showing no association // *Arthritis Rheum.*-2000.- Vol. 43.- P. 1068-1073.
30. Castranova V., Valiyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis // *Environmental health perspectives.*-2000.- Vol. 108.- № 4.- P. 675-684.
31. Castranova V. From coal mine dust to quartz: Mechanisms of Pulmonary Pathogenicity // *Inhalation toxicology.*-2000.- Vol. 2.- № 10.- P. 7-14.
32. Горovenко Н.Г., Жураховська Н.В., Басанець А.В., Подольська С.В. Роль поліморфізму гену CC16 у розвитку пневмокніозу шахтарів вугільних шахт України // *Збірник наукових праць «Актуальні проблеми акушерства і гінекології клінічної імунології та медичної генетики».*-2007.- № 14.- С. 241-248.
33. Sandford A.J., Chagani T., Spinelli J.J., Pare P.D. α_1 -Antitrypsin Genotypes and acute-phase Response to Open Heart Surgery // *Am J Respir Crit Care Med.*-1999.- Vol. 159.- P. 1624-1628.
34. Бабич П.Н., Лапач С.Н., Чубенко А.В. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия хи-квадрат // *Український медичний часопис.*-2003.- № 2.- С. 138-144.
35. Чубенко А.В. Бабич П.Н., Лапач С.Н., Ефимцева Т.К. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение первое. Сравнение двух пропорций // *Український медичний часопис.*-2003.- № 4.- С. 139-143.
36. Lomas D.A., Parfrey H. 1-Antitrypsin deficiency 4: Molecular pathophysiology // *Thorax.*-2004.- Vol. 59.- P. 529-535.
37. Serres F.J. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys // *Chest.*-2002.- Vol. 122.- P. 1818-1829.
38. Senn O., Russi E.W., Imboden M., Probst-Hensch N.M. Alpha1-antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environmental inhalants // *Eur. Respir. J.*-2005.- Vol. 26.- P. 909-917.

Горovenко Н.Г.², Жураховская Н.В.^{1,2}, Басанец А.В.¹, Подольская С.В.²

АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ GSTT1, GSTM1, CC16, TNF- α , P1 И РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПНЕВМОКОНИОЗА У ШАХТЕРОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ

¹Национальная медицинская академия последиplomного образования им. П.Л. Шупика, г. Киев

²Институт медицины труда АМН Украины, г. Киев

Пневмокониоз (ПК) шахтеров угольных шахт — мультифакториальное заболевание, возникающее в результате совместного действия генетических и экзогенных факторов. Для профилактики развития ПК важное значение имеет оценка степени риска возникновения этого заболевания путем выявления группы лиц, которые имеют наследственную склонность к ПК. Исходя из механизмов патогенеза ПК, одними из наиболее реальных кандидатов на роль биомаркеров наследственной предрасположенности к этому заболеванию являются гены GST, TNF- α , CC16 и P1. Аллельные полиморфизмы генов GSTT1, GSTM1, TNF- α , CC16 и P1 были исследованы с помощью молекулярно-генетического метода у 112 больных ПК и 138 здоровых (контрольная группа) шахтеров со стажем работы под землей не менее 13 лет. Аллели генов GSTT1 и GSTM1 определялись с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции. Для изучения полиморфных участков генов TNF- α , CC16 и P1 применяли ПЦР с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов. Для статистической обработки результатов использовали стандартный метод хи-квадрата (χ^2) и метод Z-критерия.

Частоты выявления генотипов P1*MM и P1*MZ в группе здоровых шахтеров статистически не отличались от частот в группе больных ПК ($P = 0,19$). Гомозиготных носителей аллеля P1*Z не было в ни одной из исследованных групп. Анализ комбинаций аллелей генов GSTT1, GSTM1, CC16, P1 и TNF- α показал, что статистически достоверно большей частота выявления генотипов GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A ($Z=2,13$, $P = 0,034$) и GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G ($Z=1,99$, $P = 0,046$) была в контрольной группе. А частота генотипа GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A ($Z=2,96$; $P = 0,003$) была значительно выше в группе больных ПК.

Исходя из полученных результатов ни один из исследованных полиморфных вариантов гена P1 не влияет на развитие ПК у работников угольных шахт Украины. Установлено, что генотип GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A является фактором риска возникновения ПК у шахтеров угольных шахт Украины, а генотипы GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A и GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G ассоциируются с резистентностью к развитию данного заболевания.

Ключевые слова: пневмокониоз, полиморфизм, гены GSTT1, GSTM1, TNF- α , CC16, P1, метод Z-критерия

Gorovenko N.G.¹, Zhurakhovskaya N.V.^{1,2}, Basanets A.V.², Podolskaya S.V.¹

ASSOCIATION BETWEEN GSTT1, GSTM1, CC16, TNF- α , Pi GENETIC POLYMORPHISMS AND COAL WORKERS' PNEUMOCONIOSIS

¹National Medical Academy of Post-Graduate Education named after P.L. Shupyk, Kyiv

²Institute for Occupational Health, Kyiv

Coal Workers Pneumoconiosis (CWP) is a multifactorial disease arising as a result of the combined action of genetic and exogenous factors. Risk estimation of the origin of this disease by the detection of group of persons with the inherited susceptibility to CWP is important for prophylaxis of CWP development. Basing on mechanisms of CWP pathogenesis the most real candidates for the role of biomarkers of the inherited susceptibility to this disease are genes GST, TNF- α , CC16 and Pi. The polymorphic alleles of the genes GSTT1, GSTM1, TNF- α , CC16 and Pi were investigated by a molecular-genetic method in 112 miners with CWP and 138 healthy miners (control group), that have minimum 13 years of the underground work experience. The GSTM1 and GSTT1 alleles were analyzed by a multiplex PCR method. The polymorphism of TNF- α , CC16 and Pi genes was identified by restriction fragment-length polymorphism (RFLP). The statistical analysis of results was executed by the use of the χ^2 and Z-criterion methods.

The difference between frequency of the Pi*MM and Pi*MZ genotypes in the controls and in the CWP patients group was not statistically significant ($P = 0,19$). A ZZ homozygous variants were not found in the examined groups. The analysis of genes alleles combinations GSTT1, GSTM1, CC16, Pi and TNF- α shows that the frequency of distribution genotypes GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A ($Z=2,13$, $P = 0,034$) and GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G ($Z=1,99$, $P = 0,046$) was statistically significantly greater in the control group. A frequency of genotype GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A ($Z=2,96$; $P = 0,003$) was considerably higher in the CWP patients group.

The results of this study suggest that not one of the examined polymorphic variants of Pi gene influences on the development of CWP in Ukraine. The GSTT1(-/-);GSTM1(+);TNF- α -308*G/A genotype is a risk factor of CWP development in Ukrainian coal miners. GSTM1(-/-);CC16(A38G)*A/A and GSTT1(-/-);GSTM1(-/-);TNF- α -308*G/G genotypes are associated with the resistance to CWP development.

Надійшла: 18.07.2007

Контактна особа: Журахівська Наталія Веніамінівна, відділ професійної патології Інституту медицини праці АМН України, кафедра медичної генетики Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, молодший науковий співробітник, 01033, Київ-33, вул. Саксаганського, 75, тел.: (044) 284-34-37