

*Л.П.Кузьмина*

## Биохимические и молекулярно-генетические механизмы развития профессиональной бронхолегочной патологии

ГУ НИИ медицины труда РАМН, Москва

*L.P.Kuzmina*

## Biochemical and molecular mechanisms of occurrence of occupational bronchopulmonary pathology

Использование новых достижений молекулярной медицины и внедрение современных лабораторных технологий на современном этапе развития медицины труда существенно расширяет подходы к изучению патогенетических механизмов развития профессиональных и производственно-обусловленных заболеваний, способствует разработке и внедрению биомаркеров экспозиции, эффекта и индивидуальной чувствительности к воздействию факторов производственной и окружающей среды, установлению взаимосвязи между действующим производственным фактором, генотипом и клиническим фенотипом. Среди методов, применяемых в этом направлении, — определение наиболее значимых генов-триггеров профессиональных и производственно-обусловленных заболеваний и генов биотрансформации при воздействии вредных и опасных производственных факторов, установление характера и функциональной значимости мутации с разработкой тест-систем ДНК-диагностики генетического биохимического полиморфизма, протеомные исследования, включающие изучение взаимоотношений между полиморфизмом, существующим в ДНК, и аминокислотным полиморфизмом, т. е. анализ белков-продуктов этих генов и выяснение взаимодействия между патологическими мутациями генов и их биохимическим и клиническим фенотипом.

Высокая распространенность бронхолегочной патологии в структуре профессиональной заболеваемости, тенденция к продолжающемуся росту обуславливают актуальность дальнейшего изучения особенностей формирования воспалительно-деструктивных изменений в легочной ткани и выявления биохимических и генетических маркеров предрасположенности к этой патологии [1].

В соответствии с современными тенденциями развития одного из наиболее перспективных направлений молекулярной медицины — протеомики, учения о структурно-функциональных свойствах белков, — все большее внимание привлекают протеолитические процессы, играющие ключевую роль в формировании и модификации биологических функций белков, а также их нарушении при патологии. Как известно, протеолиз — это особая форма биологического контроля, занимающая централь-

ные позиции в реализации многообразных биологических процессов и быстром физиологическом ответе организма на изменяющиеся условия окружающей среды [2, 3].

Нарушение механизмов регуляции протеолиза вызывает нерегулируемое протеолитическое расщепление функционально важных белков и пептидов, приводящих к повреждению основных систем защиты организма, расстройству процессов адаптации и развитию различных патологических состояний, включая структурные изменения, например эмфизему легких [2].

Сегодня известно большое количество генов, кодирующих самые разнообразные белковые структуры, которые являются пусковыми факторами воспаления и формируют весь комплекс патологических изменений и обуславливают специфику патологического процесса. Известно, что вдыхание промышленной пыли способствует активации альвеолярных макрофагов и нейтрофилов и выработке ими ферментов с мощным деструктивным действием, таких как эластаза, катепсины В, С и G, коллагеназа, металлопротеиназы. При этом разрушается эластичский каркас тканей и нарушается нормальная архитектура легких, причем тонкие эластические волокна межальвеолярных перегородок разрушаются быстрее, чем их пучки в стенках, — формируется эмфизема легких. Возникает обструктивный синдром, в основе которого лежит нарушение равновесия эластического натяжения между легочной паренхимой и бронхами. Вместе с тем на всех этапах развития воспаления высвобождаются антимедиаторы, предупреждающие избыточное накопление медиаторов воспаления. Соотношение медиаторов и антимедиаторов во многом определяет формирование и индивидуальные особенности течения воспаления. В группе антипротеиназ —  $\alpha$ -1-ингибитор протеиназ ( $\alpha$ 1-ИП),  $\alpha$ -2-макроглобулин,  $\alpha$ -1-антихимотрипсин, тканевые ингибиторы металлопротеиназ и другие.

Анализ данных последних лет позволил сформировать современные представления о физиологической и патогенетической роли общего и ограниченного протеолиза и определить важность оценки активности протеиназ и их ингибиторов в клинической практике при заболеваниях воспалительной

природы. Доказана несомненная связь дефицита  $\alpha 1$ -ИП с ранним возникновением хронического обструктивного бронхита и эмфиземы, показана важная роль системы "протеиназы—ингибиторы" в развитии профессиональных заболеваний органов дыхания.

Однако, несмотря на многочисленные исследования системы "протеолиз—антипротеолиз", данные являются неоднозначными и порой противоречивыми, что затрудняет интерпретацию результатов в каждом конкретном клиническом случае. Результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют, что 90 % от всех генетических вариантов ZZ не идентифицируются при рутинном обследовании этого белка в крови [4]. Это свидетельствует о необходимости внедрения в клинику медицины труда комплексных исследований протеиназно-ингибиторной системы на молекулярно-генетическом и биохимическом уровнях с исследованием количества и активности протеолитических ферментов и их ингибиторов, с определением гипосекреторных мутаций гена ингибитора протеиназ методом ДНК-диагностики.

В связи с этим были проанализированы все имеющиеся методы генотипирования  $\alpha 1$ -ИП, выполнено изоэлектрофокусирование в полиакриламидном геле, определены мутации гена  $\alpha 1$ -ИП методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестриктазным расщеплением.

Был проведен поиск имеющихся в специальной литературе данных о нуклеотидной последовательности гена, кодирующего  $\alpha 1$ -ИП и об аминокислотной последовательности белка — продукта данного гена, затем подобраны праймеры, отработаны условия амплификации и разработана тест-система для выявления наиболее распространенных мутаций в Z- и S-аллелях с точковыми аминокислотными заменами методом аллельспецифичной ПЦР (рисунк). Данная тест-система внедрена в клинику ГУ НИИ медицины труда РАМН, Москва.

Предполагается, что варианты P1\*S и P1\*Z содержат меньшее количество сиаловой кислоты, чем варианты P1\*M (нормальный аллель, при котором активность ингибитора принята за 100 %). С другой стороны, показано, что недостаток сиаловой кислоты в молекуле тормозит секрецию гепатоцитов и ускоряет выведение из плазмы. Эти структурные особенности обуславливают разный уровень  $\alpha 1$ -ИП в сыворотке крови лиц с различными фенотипами.

В группе больных профессиональными заболеваниями легких, вызванных воздействием промышленных аэрозолей, дефицитные генотипы (Z) выявлены в 5 %, среди больных бронхолегочными заболеваниями непрофессионального генеза — в 10 % случаев. Более низкая распространенность дефицитных вариантов белка при профессиональной патологии объясняется элиминацией лиц с подобным генетическим дефектом в начале профессиональной деятельности в связи с развитием заболеваний органов дыхания с тяжелым клиническим течением.

При исследовании генетического полиморфизма  $\alpha 1$ -ИП обращает на себя внимание группа больных профессиональной бронхиальной астмой (БА), в которой наиболее часто встречаются гетерозиготные дефицитные варианты P1 MZ (10,8 % случаев). Таким образом, формирование БА в группе обследованных больных с дефицитным вариантом  $\alpha 1$ -ИП имело генетически детерминированный характер, реализованный под воздействием производственных факторов — аэрозолей цветных металлов.

Сопоставление результатов генетического полиморфизма  $\alpha 1$ -ИП с клиническими проявлениями показало, что наличие гомозиготного дефицитного варианта (ZZ) гена  $\alpha 1$ -ИП характеризуется формированием быстро прогрессирующего, хронического профессионального бронхита тяжелого течения даже при небольшом (5–7 лет) стаже работы в условиях воздействия промышленных аэрозолей, незначительно превышающих предельно допустимую концентрацию.

Система ингибитора протеиназ регулируется несколькими генами и в зависимости от их соотношения в одних случаях может в большей степени страдать антипротеиназная система, а в других — происходит наследственно обусловленное увеличение синтеза лейкоцитарной эластазы, коллагеназы, катепсина В, G. Генетический полиморфизм протеолитических ферментов на сегодняшний день остается неизученным.

Комплексные исследования активности протеиназ (эластазы, катепсина G) и генетического полиморфизма  $\alpha 1$ -ИП позволили выявить выраженный дисбаланс в системе "протеолиз—антипротеолиз" у пациентов с профессиональными заболеваниями органов дыхания. Следует отметить, что высокий уровень протеолитических ферментов у таких больных в сравнении с группой лиц с заболеваниями органов дыхания непрофессионального генеза даже при отсутствии генетически детерминированного дефицита  $\alpha 1$ -ИП и достаточно высоких или нормальных количественных уровнях данного белка способствует развитию декомпенсации системы

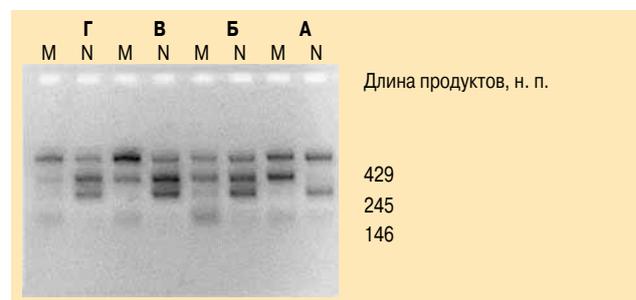


Рисунок. Электрофореграмма продуктов ПЦР при определении S- и Z-мутаций у 4 пациентов А, В, Б и Г. Во всех случаях дорожка М соответствует анализу мутации, дорожка N — анализу нормы. Цифры справа указывают длину продуктов в н. п. Сигнал маркерного гена виден как фрагмент длиной 429 н. п., сигнал по точке Z — 245 н. п., сигналы по точке S — 146 н. п. Примечание: наличие во всех пробах сигнала маркерного гена подтверждает эффективность выделения ДНК и ПЦР. Сигналы аллель-специфичной ПЦР показывают, что у пациента Г нуклеотидные звенья в точках Z и S соответствуют норме, пациенты Б и В гетерозиготны по Z и имеют норму по S, пациент А гомозиготен по Z и имеет норму по S.

"протеолиз—антипротеолиз", что приводит к повреждению компонентов паренхимы легких и развитию патологии.

В связи с этим нами разработаны критерии оценки биологического баланса в системе "протеиназы—ингибиторы", которые могут служить маркерами воспалительных и деструктивных процессов в легочной ткани, критериями воздействия промышленных аэрозолей на течение патологического процесса, и индивидуального риска развития профессиональных заболеваний органов дыхания. Так, одновременное повышение протеиназ и их ингибиторов свидетельствует о напряжении компенсаторных возможностей организма и является критерием воздействия вредных производственных факторов — промышленных аэрозолей. Снижение уровня ингибитора при одновременном повышении протеиназ свидетельствует либо о генетически обусловленном дефиците  $\alpha$ 1-ИП, либо о дисбалансе и срыве компенсаторных механизмов, приводящих к развитию обструктивного синдрома, в основе которого лежит нарушение равновесия эластического натяжения между легочной паренхимой и бронхами. Повышение уровня  $\alpha$ 1-ИП при нормальных значениях активности протеиназ при воздействии промышленных аэрозолей может свидетельствовать о благоприятном прогнозе и служить критерием индивидуального реагирования на воздействие пыли.

В ответных реакциях организма на воздействие факторов производственной среды и при выявлении биомаркеров индивидуальной восприимчивости представляется важным изучение полиморфизма генов предрасположенности, к которым относят гены детоксикации ксенобиотиков. Функционально неполноценные аллельные варианты этих генов при воздействии вредных факторов производственной среды могут быть причиной развития патологических процессов в организме.

Наибольший интерес при изучении механизмов развития профессиональных и производственно-обусловленных заболеваний представляют гены цитохрома P450, ген глутатионтрансферазы (GST), которые играют важную роль в биотрансформации химических веществ, входящих в состав промышленных аэрозолей; полиморфизм этих генов может способствовать развитию профессиональных заболеваний бронхолегочной системы [5, 6].

Глутатион-опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и в предотвращении поломок ДНК. Синтез GST контролируется генами разных хромосом. Молекулярная структура этих генов хорошо изучена. В каждом из них выявлены полиморфизмы, существенно влияющие на их функции.

GSTM1 существует в 3 аллельных вариантах, два из которых, GSTM1A и GSTM1B, кодируют белки, несколько различающиеся по своей энзиматической активности. При 3-м аллельном варианте, GSTM10, вследствие протяженной (около 10 тыс. п. о.) деле-

ции РНК и белковый продукт вообще не синтезируются.

Представляются актуальными исследования по выявлению мутаций гена GSTM1 у больных бронхолегочной патологией профессионального генеза, установлению ассоциаций между мутациями указанных генов и клиническим фенотипом для оценки риска развития профессиональной и производственно-обусловленной патологии.

Методом ПЦР-анализа была изучена частота гомозиготных носителей делеции гена GSTM1 размером около 10 тыс. п. о., сопровождающейся полным отсутствием белкового продукта и формирующей нулевой генотип GSTM1 0/0. Наличие гомозигот по нормальному аллелю — генотип GSTM1 +/+ (гетерозиготные носители данной тест-системой не идентифицировались и типировались как вариант +/+ ) — определялось присутствием на электрофореграммах фрагмента амплификации размером 213 п. н. Его отсутствие (0/0) указывало на гомозиготное состояние по делеции данного участка гена.

Проведенные исследования показали, что частота встречаемости нулевого варианта GSTM1 у таких больных (пневмокониозы и профессиональный бронхит) значительно превышает таковую в контрольной выборке, и различия между ними являются статистически достоверными ( $\chi^2 = 4,41$ ;  $p < 0,05$ ). В качестве контроля в данном случае использовались результаты, полученные при обследовании адекватной популяционной выборки лиц преимущественно русской национальности (297 человек).

При сравнении выборки пациентов с бронхолегочной патологией непрофессионального генеза с контрольной группой обращает на себя внимание отсутствие различий между ними в частотах генотипов GSTM1 0/0 ( $\chi^2 = 1,89$ ;  $p > 0,1$ ). Пропорция делеции, полученная в контроле (0,468), оказывается сопоставима с данными исследований в русских популяциях — 42 % [7], а также соответствует распределению этой мутации в европейских популяциях — 39–62 %. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу большей подверженности лиц-носителей GSTM1 0/0 риску заболеть бронхолегочными заболеваниями, обусловленными воздействием промышленных аэрозолей (в частности, кварцосодержащей пыли).

Система глутатиона является важной антиоксидантной системой, препятствующей образованию и накоплению в организме активных форм кислорода, избыток которых приводит к гибели фагоцитирующих клеток, оксидантному повреждению окружающих тканей, обуславливает развитие морфологических, патофизиологических и иммунологических изменений, лежащих в основе клинических проявлений пылевых заболеваний, и в итоге — прогрессирующего фиброза легочной паренхимы.

При анализе клинического течения заболевания в зависимости от генотипа GSTM1 явно просматривается связь между более тяжелым течением бронхолегочной патологии у больных (гипоксемия и дыхательная недостаточность II и III степени) и нулевым

аллелем гена GSTM1. Процент лиц в группе носителей генотипа GSTM1 0 / 0 статистически значимо выше ( $\chi^2 = 7,0$ ;  $p \leq 0,01$ ) по сравнению с группой больных с генотипом GSTM1 + / + . Обращает на себя внимание и тот факт, что в группе с нулевым аллелем гена GSTM1 выше доля лиц, имеющих в анамнезе пороки развития бронхолегочной системы и страдающих туберкулезом легких. Особо следует отметить, что заболеваниям верхних дыхательных путей в большей степени оказываются подвержены лица с нормальным аллелем гена GSTM1. Предположительно таким образом реализуется механизм защитной компенсации у лиц с генотипом GSTM1 + / + при агрессивном воздействии промышленных аэрозолей и кварцсодержащей пыли.

Установлена корреляция между частотой хромосомных aberrаций, мутагенной активностью и наличием GSTM1 0 / 0 генотипа. У таких индивидуумов, если они курят, мутагенный и канцерогенный риск выражены особенно сильно.

### Заключение

Геномные и протеомные исследования открывают новые возможности для медицины труда: позволяют разработать новые подходы к оценке риска развития профессиональных и производственно-обусловленных заболеваний, уточнить их патогенез, выявить

причины клинического полиморфизма, определить протективные генетические системы, расширяющие норму реакции человека в поддержании гомеостаза при воздействии факторов производственной среды и трудового процесса.

### Литература

1. Измеров Н.Ф., Каспаров А.А. Медицина труда. Введение в специальность. М.: Медицина; 2002.
2. Соловьева Н.И., Елисеева Ю.А., Локишина Л.А. Протеолитические ферменты и их биологические функции. Вестн. РАМН 1995; 2: 3–9.
3. Katunuma N., Suzuki K., Tranis J., Fritz H., eds. Biological function of proteases and inhibitors. Basel: Japan Scientific Societies Press; Karger; 1994.
4. Hutchinson D. The epidemiology of alpha-1-antitrypsin deficiency. Lung 1990; 168 (suppl.): 535–542.
5. Liska D.G. The detoxification enzyme systems. Altern. Med. Rev. 1998; 3 (3): 187–198.
6. Nakachi K., Imai K., Hayashi S., Kawajiri K. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer. In relation to cigarette dose in a Japanese population. Cancer Res. 1993; 53: 2994–2999.
7. Sram R.G. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphism on biomarkers of exposure. Environ. Hlth. Perspect. 1998; 106: 231–239.

Поступила 14.04.08  
© Кузьмина Л.П., 2008

УДК [616.233 + 616.24]-057-092