

Иммуногенетические факторы при профессиональных заболеваниях легких

А. В. Жестков, А. И. Косов, Н. К. Игнатова, М. Е. Абдалкин,
С. Ю. Исаева, А. К. Письменный

ГОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет Росздрава, кафедра общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии
ГУЗ Самарская областная станция переливания крови, лаборатория иммунологического типирования тканей
ГУЗ Самарская областная больница им. М. И. Калинина

Резюме

Проведено иммунологическое обследование 154 пациентов с профессиональными заболеваниями легких и 209 здоровых людей. Результаты иммуногенетического типирования HLA-специфичностей II класса позволили выделить в русской популяции Среднего Поволжья маркеры предрасположенности и устойчивости к развитию профессиональных заболеваний легких. Определено диагностическое и прогностическое значение иммуногенетических показателей при профессиональных заболеваниях легких.

Ключевые слова: пневмокониоз, HLA-гены, факторы прогноза.

Введение

Из-за резких экологических изменений, расширения спектра вредно действующих факторов на организм человека болезни органов дыхания стали в последние годы одной из самых актуальных проблем экологической и профессиональной патологии.

Поражения легких пылевой этиологии занимают не только значительное место в общей структуре пульмонологической заболеваемости, но и лидируют среди профессиональных заболеваний (до 60%), приводя к значительным социально-экономическим потерям, связанным со снижением и утратой трудоспособности работающих [1].

В последние годы в Самарском регионе пылевые заболевания легких занимают первое место в структуре профессиональной заболеваемости. Значительную часть из них составляют пневмокониозы (ПКЗ) и хронический пылевой бронхит. Поражения легких от воздействия пылевых частиц различной степени фиброгенности характеризуются необра-

тимостью течения, приводят к снижению качественных параметров жизни и сокращают продолжительность жизни больных. Необратимость течения пылевых заболеваний легких и отсутствие специфических методов лечения делают особенно актуальной задачу их раннего выявления и прогнозирования течения [2].

Установление диагноза ПКЗ происходит чаще всего со значительным опозданием, так как морфологическими исследованиями было доказано опережающее развитие пылевого фиброза легких по сравнению с рентгенологическими изменениями [3]. Это оправдывает применение сложных технологий в диагностике пылевых заболеваний легких. К таким технологиям можно отнести иммуногенетические исследования [4].

В настоящее время является общепризнанным, что наследственность имеет подчас решающее значение в повышенной индивидуальной чувствительности некоторых людей к возникновению, течению и исходам заболеваний. Индивидуальные различия в ответных реакциях на действия токсических веществ, фиброгенных аэрозолей проявляются при высоких и низких уровнях их интенсивности, разной продолжительности воздействия на организм [5]. В профпатологии исследования по оценке фактора наследственности находятся лишь в начальной стадии изучения.

Изучение генетической предрасположенности или устойчивости у лиц, подвергающихся воздействию производственных вредностей, проводится с помощью анализа полиморфизма

А. В. Жестков — д. м. н., профессор, зав. каф. общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии;

А. И. Косов — к. м. н., доцент кафедры госпитальной терапии с курсом трансфузиологии, гл. врач Самарской областной станции переливания крови;

Н. К. Игнатова — зав. лабораторией Самарской областной станции переливания крови;

М. Е. Абдалкин — к. м. н., доцент кафедры патологической физиологии;

С. Ю. Исаева — клинический фармаколог Самарской областной клинической больницы им. М.И.Калинина;

А. К. Письменный — к. м. н.

по отдельным биохимическим системам или по их комплексу [6].

Высокий полиморфизм системы HLA (главного комплекса гистосовместимости) широко используется для изучения генетических основ предрасположенности к заболеваниям. Благодаря тесной связи между структурой и функцией HLA, ее роли в иммунном ответе, HLA-гены рассматриваются в качестве маркеров, имеющих патогенетическое значение при многих заболеваниях; в первую очередь при патологических процессах с нарушением иммунитета, к которым относятся и профессиональные заболевания легких [7, 8].

Переход на новые методы типирования, основанные на анализе ДНК, открыл большие возможности в изучении полиморфизма генов HLA, а также их роли в развитии заболеваний. В результате этого существенно изменились представления о структуре и функции локусов HLA [10]. Наиболее сложной является генетическая организация области HLA II-го класса (область HLA-D), представляющая в последнее время большой интерес при изучении иммуногенетической предрасположенности/резистентности к заболеваниям.

Цель настоящего исследования — оценить возможность генетического прогнозирования на основании изучения полиморфизма HLA-генов II класса у больных с пылевыми заболеваниями легких. В группу обследованных вошли пациенты с установленным диагнозом пневмококиоз (ПКЗ) от воздействия малофиброгенной смешанной пыли (ПДК — более 10 мг/м³). Рентгенологические изменения у этих пациентов соответствовали интерстициальной форме (от s1 до t2). Контрольную группу составили 209 здоровых доноров Самарской ОСПК.

Материал и методы исследования

Было обследовано 154 пациента с профессиональными заболеваниями легких (пневмококиозами). Среди обследованных преобладали мужчины — 131 (85%) человек. Диагноз у всех больных был установлен на основе комплексного клинико-лабораторного и рентгенологического исследования. Контрольную группу составили 209 здоровых доноров компонентов крови Самарской ОСПК. Все обследованные были представителями русской популяции Среднего Поволжья.

Генотипирование HLA-аллелей II класса локусов DR и DQ проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с сиквенс-специфическими праймерами в ДНК, полученной из ядерных клеток периферической крови (использовали набор реагентов НПФ «ДНК-Технология», Москва, для выделения ДНК, для

типирования гена HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DQA1). Амплификацию проводили на амплификаторе «ТЕРЦИК» той же фирмы по двухстадийной схеме амплификации.

Геномную ДНК для исследования выделяли из мононуклеарных клеток стабилизированной ЭДТА периферической крови, свежей или свежезамороженной и сохраняемой при -20°C, согласно инструкции по применению набора реагентов для выделения ДНК («НПФ ДНК-Технология», Москва).

Амплификация проводилась в II этапа: I этап — амплификация II экзона HLA-DRB1-гена, HLA-DQA1-гена и HLA-DQB1-гена из выделенной ДНК в температурно-временном режиме по прилагаемой к набору реактивов инструкции; II этап — амплификация со специфическими праймерами также в соответствующем температурно-временном режиме: типирование аллелей HLA-DRB1-гена проводили с использованием набора сиквенс-специфических праймеров, позволяющих определить 13 групп аллелей (базовое разрешение): DRB1*01, 03, 04, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16; типирование аллелей HLA-DQA1 гена проводили с использованием набора сиквенс-специфических праймеров, позволяющих определять 8 аллелей: DQA1*0101, 0102, 0103, 0201, 0301, 0401, 0501, 0601; типирование аллелей HLA-DQB1-гена проводили с использованием набора сиквенс-специфических праймеров, позволяющих определить 11 аллелей: DQB1* 0201, 0301, 0302, 0303, 0304, 0401/02, 0501, 0502/04, 0503, 0601, 0602-0608.

Продукт, полученный в ходе амплификации, на всех этапах определяли методом горизонтального электрофореза в 3,3% агарозном геле в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (310 нм). Специфичность продукта амплификации оценивали в соотношении со стандартным маркером длин ДНК (PUC-19) в соответствии длин продукта (п.н.) специфичностям DRB1*, DQA1* и DQB1*.

Статистическая обработка результатов типирования включала в себя расчет и анализ следующих показателей:

- 1) Величина относительного риска:

$$RR = a \times d / b \times c,$$

где a — число больных, носителей антигена;
b — число больных, не несущих антиген;
c — число здоровых лиц;
d — число здоровых лиц, не несущих антиген.

- 2) Этиологическая фракция:

$$EF = (RR - 1) / RR \times hp,$$

где $hp = a / (a + b)$, которая характеризует силу положительной HLA-ассоциации и рассчитывается при значении величины относительного риска более 2,0.

3) Превентивная фракция:

$$PF=(1-RR)hp/[RR(1-hp)+hp],$$

которая характеризует силу отрицательной ассоциации HLA-ассоциации и рассчитывается при значении относительного риска менее 1,0.

4) Критерий χ^2 -квадрат использовался для оценки достоверности различий встречаемости определенных признаков между контрольной группой и группами больных с заболеваниями легких [11].

$$\chi^2=\{(a \times d - b \times c) - 0,5 \times n\}^2 \times n / (a+b) \times (c+d) \times (a+c) \times (b+d),$$

где а — количество носителей признака в группе контроля;

б — количество индивидов без данного признака в группе контроля;

с — количество носителей признака в группе пациентов;

д — количество индивидов без данного признака в группе пациентов;

п — общая численность группы; 0,5×п — поправка на непрерывность.

Учитывая, что система HLA является полиаллельной, при оценке достоверности различий в распределении признака велся расчет «р-коррективного»:

$$P(\text{корр.})=n \times p(1-p)^{-1},$$

где п — исследованное количество признаков [12].

5) Величина абсолютного риска (AR), отражающая риск развития заболевания у пациента, имеющего данный аллель, в течение всей жизни. Ее вычисляли по следующей формуле:

$$AR=F_x(fp/fc),$$

где F — частота развития заболевания в общей популяции;

fp — частота встречаемости аллеля у пациентов;

fc — частота встречаемости аллеля в контроле.

Результаты исследования и их обсуждение

В соответствующих таблицах отражено распределение аллелей HLA II класса (DRB1, DQA1, DQB1) у больных с пылевыми заболеваниями легких (пневмокониозами) по сравнению с популяционным контролем (табл. 1-3).

Таблица 1. Частота аллелей DRB1 HLA II класса у больных с заболеваниями легких проф. этиологии (%)

Аллель DRB1	Контрольная группа, (n=209)	Больные с забол. л-х, (n=154)	χ^2	RR	EF, (%)	PF, (%)
DRB1*01	7,97	8,71	0,22	1,11	0,008	—
DRB1*03(17)	6,94	11,92	2,76	2,05	0,046	—
DRB1*04	5,41	21,22	21,95*	5,84	0,174	—
DRB1*07	16,99	11,86	1,43	0,63	—	0,061
DRB1*08	4,15	2,62	0,12	0,66	—	0,010
DRB1*09	5,66	0,86	5,26*	0,15	—	0,046
DRB1*10	2,91	3,77	0,70	1,31	0,007	—
DRB1*11	10,50	20,75	8,19*	2,23	0,056	—
DRB1*12	5,16	3,51	0,44	0,71	—	0,014
DRB1*13	14,44	5,31	6,98	0,34	—	0,093
DRB1*14	1,45	0,86	0,04	0,63	—	0,005
DRB1*15	18,74	19,06	0,03	1,14	0,023	—
DRB1*16	3,90	2,62	0,12	0,71	—	0,011

Примечание. * — различия достоверны ($p < 0,01$).

Таблица 2. Частота аллелей DRQA1 HLA II класса у больных с заболеваниями легких проф. этиологии (%)

Аллель DQA1	Контрольная группа, (n=209)	Больные с забол. л-х, (n=154)	χ^2	RR	EF, (%)	PF, (%)
DQA1*0101	8,71	10,56	0,57	1,42	0,059	—
DQA1*0102	22,54	42,27	17,10*	3,01	0,267	—
DQA1*0103	10,56	14,36	1,56	1,45	0,062	—
DQA1*0201	14,85	6,91	4,40	0,41	—	0,283
DQA1*0301	9,17	31,68	28,61*	5,39	0,143	—
DQA1*0401	2,53	6,91	19,02*	2,92	0,032	—
DQA1*0501	29,28	18,36	5,22	0,50	—	0,332
DQA1*0601	0	0	—	—	—	—

Примечание. * — различия достоверны ($p < 0,01$).

Таблица 3. Частота аллелей DRQB1 HLA II класса у больных с заболеваниями легких проф. этиологии (%)

Аллель DQB1	Контрольная группа, (n=209)	Больные с забол. л-х, (n=154)	χ^2	RR	EF, (%)	PF, (%)
DQB1*0201	20,83	9,73	7,52*	0,38	—	0,263
DQB1*0301	17,57	18,35	0,07	1,06	0,028	—
DQB1*0302	9,81	6,71	1,02	0,65	—	0,070
DQB1*0303	8,23	5,72	0,40	0,67	—	0,057
DQB1*0401	1,69	1,87	0,17	1,10	0,003	—
DQB1*0501	11,15	23,02	9,97*	2,58	0,420	—
DQB1*0502	6,17	11,81	4,13*	2,10	0,149	—
DQB1*0503	3,41	3,77	0,32	1,11	0,007	—
DQB1*0601	4,15	2,82	0,34	0,90	—	0,008
DQB1*0602	25,82	27,99	0,31	1,14	0,113	—

Примечание. * — различия достоверны ($p < 0,01$).

Представлены значения относительного риска (RR), χ^2 , этиологической фракции (FF), вычисляемой в случае $RR > 1$, а также превентивной фракции (PF), вычисляемой в случае $RR < 1$.

В ходе проведенного HLA-генотипирования выявлены следующие особенности: статистически достоверно было повышено при пневмоконокозах носительство HLA-DRB1*04, *11 (DQA1*0102, *0301; DQB1*0501, *0502 ($p \leq 0,01$) (табл. 1).

При этом частота встречаемости HLA-DRB1*04 составила 21,22% (RR=5,84), DRB1*11 — 20,75% (RR=2,23), DQA1*0102 — 42,27% (RR=3,01), DQA*0301 — 31,68% (RR=5,39), DQA*0401 — 6,91% (RR=2,92); DQB1*0501 — 23,02% (RR=2,58), DQB1*0502 — 11,81% (RR=2,10) (табл. 2).

Присутствие данной комбинации аллелей, т.е. сочетания двух групп аллелей HLA-DRB1*04,*11 и сцепленных с ними аллелей DQA1*0102, *0301; DQB1*0501, *0502, вероятно, приводит к значительному увеличению риска развития заболевания, по крайней мере, вдвое.

Анализ частоты HLA-аллелей в обследованной группе больных, для которых установлена отрицательная ассоциация, показал, что наличие DRB1*09 с частотой встречаемости 0,86% и $RR=0,15$, а также DQB1*0201 — с частотой встречаемости 9,73% и $RR=0,38$ в генотипе имеет протективное значение при профессиональных поражениях легких — пневмоконокозах (табл. 3).

Так как этиологическая фракция характеризует силу положительной HLA-ассоциации и определяет влияние того или иного гена на развитие болезни, то риск развития заболевания (ПКЗ) установлен для носителей DQB1*0501 (RR=2,58) с наиболее высоким показателем EF=0,420, а также для носителей DQA1*0301 (RR=5,39; EF=0,143).

Высокие показатели этиологической фракции ассоциировались и с DQA1*0102 (RR=3,01; EF=0,267), а, следовательно, эти аллели, присутствующие у данного индивидуума, значительно повышают риск развития патологии.

Силу отрицательной HLA-ассоциации характеризует превентивная фракция (PR), которая рассчитывается при значении относительного риска менее 1,0. В качестве протектора с наименьшим риском развития заболевания в локусе DRB1 оказался ген DRB1*09 (0,86%; $RR=0,15$; PF=0,046).

Ген DRB1*07 имел наиболее значимый протективный эффект (PF=0,061) на уровне популяции, хотя его носительство у больных пневмоконокозами было снижено незначительно по сравнению с популяционным контролем (16,99% и 11,86%).

Полученные результаты позволяют использовать HLA-генотипирование для выявления индивидуальной чувствительности и прогностических рисков развития профессиональных заболеваний легких.

Выводы

1. Результаты проведенного молекулярно-генетического типирования HLA II класса позволили выделить в русской популяции Среднего Поволжья маркеры иммуногенетической предрасположенности/резистентности к воздействию промышленных аэрозолей и развитию профессиональных заболеваний легких.

2. Для прогноза развития профессионального легочного фиброза предрасполагающими являются специфичности HLA-DRB1*04,11 и сцепленные с ними аллели DQA1*0102, *0301; DQB1*0501, *0502, наличие которых в генотипе, вероятно, ведет к увеличению риска развития пневмоконокозов у работающих в контакте с промышленными аэрозолями на предприятиях. Устойчивость к развитию пылевых заболеваний легких определяют специфичности HLA-DRB1*09, *07, а также HLA-DQB1*0201.

3. Достоверно повышенное в исследуемой группе больных с пневмоконокозом носительство HLA-DRB1*04, являющегося классическим маркером ряда аутоиммунных заболеваний в некоторых национальных группах, населяющих Российскую Федерацию, вероятно, связано с имеющимся аутоиммунным компонентом хронической асептической воспалительной реакции при пневмоконокозе.

4. Иммуногенетический скрининг индивидуальной чувствительности организма работающих к действию промышленных аэрозолей является моделью для разработки и внедрения концепции прогнозирования развития и первичной профилактики профессиональных заболеваний органов дыхания.

Литература

1. Siafakas N. M., Vermeire P., Pride N.B. et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). A consensus statement of the European Respiratory Society (ERS). Eur Respir J 1995; 8: 1398-1420.
2. Косарев В. В., Жестков А. В., Лебедин Ю. С. Диагностика ингаляционного воздействия промышленных аэрозолей. Пульмонология 2003; 1: 21-4.
3. Артамонова В. Г., Кузнецов Н. Ф., Гаджиев А. С. Пневмоконокозы. Актуальные проблемы профессиональной и экологической патологии. Курск. 1994. 108-9.
4. Яздовский В. В. HLA и аллергические заболевания. Пульмонология. 1994: 6-19.
5. Измеров Н. Ф., Ткачев В. В., Соболев В. В. Пневмоконокозы. Медицина труда и пром. экология. 1995; 5: 1-4.
6. Алексеев Л. П., Дедов И. И., Яздовский В. В. Генетические маркеры инсулинозависимого диабета (история проблемы, настоящее, перспективы). Клиническая медицина. 1992; 9-10: 5-10.

Полный список литературы см. на сайте urmj.ru