

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

2012 г.

Регистрационный № 189-12-12

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ И  
ПРОИЗВОДСТВЕННО ОБУСЛОВЛЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У  
РАБОТНИКОВ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ  
АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ–РАЗРАБОТЧИКИ:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гигиены»

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

**АВТОРЫ:**

д.м.н., профессор С.В.Федорович, н.с. А.Г.Маркова, член корр. НАН Беларуси, профессор О.Г.Давыденко, к.б.н., доцент Н.Г.Даниленко, м.н.с. О.Д.Левданский, к.м.н. О.А.Цыганкова

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

20.12.2012

Регистрационный № 184-1212

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ  
И ПРОИЗВОДСТВЕННО ОБУСЛОВЛЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
У РАБОТНИКОВ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ  
АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С.В. Федорович, науч. сотр. А.Г. Маркова, д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О.Г. Давыденко, канд. биол. наук, доц. Н.Г. Даниленко, мл. науч. сотр. О.Д. Левданский, канд. мед. наук О.А. Цыганкова

Минск 2012

Настоящая Инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-профпатологов, врачей общей практики и врачей-акушеров-гинекологов.

Предложенные в инструкции мероприятия позволят вынести объективное заключение о наличии повышенного риска развития у пациента различных заболеваний репродуктивной системы и составить список рекомендаций и предписаний, выполнение которых позволит снизить негативное воздействие неблагоприятных химических факторов производственной среды на организм, что в конечном счете приведет к сохранению трудоспособности.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Амплификатор.
2. Миницентрифуга-вортекс.
3. Комплект пипеточных дозаторов (мкл): 0,5–10; 5–50; 20–1000.
4. Холодильник с морозильной камерой.
5. Хладоэлемент.

**Перечень оборудования для детекции результатов ПЦР путем электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов:**

1. рН-метр.
2. Водяная баня/СВЧ-печь.
3. Источник питания с постоянным током.
4. Камера для горизонтального электрофореза.
5. Комплект пипеточных дозаторов (мкл): 0,5–10; 5–50; 200–1000.
6. Набор пластиковых кювет для геля.
7. Набор гребенок.
8. Набор планшетов для смешивания образцов с краской.
9. Набор посуды для приготовления агарозного геля.
10. Трансиллюминатор.

**Перечень необходимых реактивов для проведения ПЦР** представлен в таблицах 1, 2.

Таблица 1 — Реактивы для проведения ПЦР

Наименование реактива	Назначение реактива	Кол-во на 1 исследование
10x буфер для taq-полимеразы	Смесь реактивов для создания оптимальных условий для taq-полимеразы	1,5 мкл
Taq-полимераза	Фермент, осуществляющий синтез ДНК	1,5 ед.
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	Донор ионов Mg <sup>2+</sup> , необходимых для работы taq-полимеразы	0,9 мкл
Смесь dNTP 25 mM (дезокси-рибонуклеотидтрифосфатов)	Мономер для синтеза ДНК	1,8 мкл
Олигонуклеотидные праймеры	«Затравка» для начала	По 0,75 мкл

10 pM	синтеза новой нити ДНК	каждого
Образец тотальной ДНК	Матрица для синтеза ДНК	1,2 мкл
ДМСО	Увеличивает вязкость смеси и денатурацию исходной ДНК-матрицы	0,6 мкл
Стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода	Растворитель	4,2 мкл

Таблица 2 — Реактивы для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации

Наименование реагента	Назначение реагента	Кол-во на 1 исследование
Агароза	Компонент агарозного геля	2 г
Трис-основание	Компонент ТАЕ-буфера	5,3 г
Ледяная уксусная кислота	Компонент ТАЕ-буфера	1,3 мл
ЭДТА	Компонент ТАЕ-буфера	2,2 мл
Водный раствор NaOH	Компонент ТАЕ-буфера	20 мкл
Бромфеноловый синий	Компонент загрузочного буфера	0,4 мг
Сахароза	Компонент загрузочного буфера	64 мг
Дистиллированная вода	Растворитель	20 мл
Маркер молекулярного веса	Набор фрагментов ДНК известного размера для определения размеров полученных ампликонов	0,075 мкл

Расходные материалы: резиновые перчатки, наконечники для дозаторов (до 10, 200, 1000 мкл), пробирки Eppendorf (1,5 мл), ПЦР-пробирки (0,2 мл), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. На предварительных и периодических медицинских осмотрах для работы в условиях контакта с полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ).
2. При наличии в анамнезе:
  - воспалительных заболеваний органов половой системы;
  - доброкачественных новообразований органов половой системы.
3. Для генетического скрининга наследственной предрасположенности к развитию патологий органов половой системы.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

#### **Материал для исследования**

В качестве материала для выделения ДНК и выявления мутаций генов GSTM1 и GSTT1 может использоваться пятно крови, высушенной на целлюлозном

носителе, или буккальный соскоб, высушенный или замороженный. Выделение ДНК проводится с использованием фенольного метода общепринятым способом.

### **Проведение полимеразной цепной реакции**

Диагностика аллельных состояний генов глутатион-S-трансфераз M1 и T1 включает определение 2 делеций в генах *GSTM1* и *GSTT1*. Анализ аллельного состояния генов *GSTM1* и *GSTT1* осуществляется методом мультиплексной ПЦР со специфическими праймерами (таблица 3) совместно с геном *CYP1A1*, который служит в качестве внутреннего контроля. Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать 1,5 мкл 10x буфера для taq-ДНК-полимеразы (750 ммоль/л Tris-HCl (pH = 8,8), 200 ммоль/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% Тритон X-100, 10 ммоль/л Тартразин, 5% Фикол 400), по 7,5 пкмоль каждого из праймеров (таблица 5), 0,6 мкл DMSO, 25 нмоль MgCl<sub>2</sub>, по 5 нмоль каждого из dNTP, 3 единицы taq-ДНК-полимеразы. Приготовление амплификационной смеси осуществляется в пробирке Eppendorf (1,5 мл).

В пробирки для ПЦР вносится по 1,2 мкл растворенной ДНК-матрицы и 13,8 мкл амплификационной смеси, после чего пробирки следует поместить в амплификатор. Программа амплификации должна включать следующие этапы: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, 33 цикла синтеза (денатурация при 95°C в течение 30 с, 30 с на отжиг праймеров при 60°C и 1 мин элонгации при 72°C), финальная элонгация — 4 мин при 72°C и охлаждение до 4°C.

Таблица 3 — Последовательности праймеров

Ген	Праймер
<i>GSTM1</i>	[F] - 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
	[R] - 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
<i>GSTT1</i>	[F] - 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
	[R] - 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<i>CYP1A1</i>	[F] - 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3'
	[R] - 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'

### **Проведение электрофоретического разделения продуктов амплификации**

Для детекции результатов амплификации фрагментов генов наиболее оптимальным является горизонтальное электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете.

### **Приготовление геля**

Для приготовления агарозного геля следует смешать необходимые объемы 50-кратного буфера TAE и дистиллированной воды (таблица 4) в мерном цилиндре. Затем перелить полученный буфер в колбу с соответствующим количеством агарозы. После чего нужно нагреть смесь на водяной бане или в СВЧ-печи до полного растворения агарозы и добавить бромистый этидий. Расплавленную агарозу залить в кювету с установленной гребенкой и подождать 10–15 мин до полного застывания геля. Полученный гель следует поместить в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную TAE 1x буфером.

Таблица 4 — Состав растворов для горизонтального агарозного гель-электрофореза

Раствор/компонент	Количество
<b>2% агароза</b>	
Агароза	2 г
ТАЕ буфер 50x	2 мл
Дистиллированная вода	До 100 мл
Бромистый этидий	До конечной концентрации 0,0001%
<b>Трис-ацетатный (ТАЕ) буфер 50x</b>	
Трис-основание	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
ЭДТА-Na <sub>2</sub> 0,5 моль/л (pH 8,0)	100 мл
Дистиллированная вода	До 1 л
<b>ЭДТА-Na<sub>2</sub> 0,5 моль/л (pH 8,0)</b>	
ЭДТА	186,1 г
Водный раствор NaOH	До pH = 8,0
Дистиллированная вода	До 1 л
<b>Загрузочный буфер</b>	
Бромфеноловый синий	0,125 г
Сахароза	20 г
Дистиллированная вода	До 50 мл

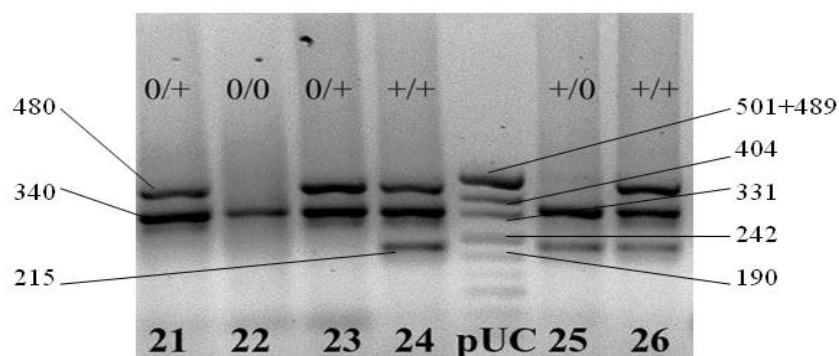
### **Внесение образцов в гель**

Перед внесением следует смешать 5–7 мкл продукта амплификации с 2 мкл загрузочного буфера. Внесение образцов в лунки геля осуществлять с помощью пипеточного дозатора, используя индивидуальные наконечники для каждого образца. Для определения размеров полученных фрагментов следует внести в одну из лунок геля маркер молекулярного веса. Наиболее удобными будут маркеры, содержащие фрагменты ДНК от 100 до 500 пар оснований с интервалом в 100 пар нуклеотидов.

Оптимальным напряжением является 100В. Электрофоретическое разделение продуктов осуществляется в течение 40–50 мин, после чего гель следует извлечь из камеры и промыть дистиллированной водой. Промытый гель поместить в проходящий УФ-свет.

### **Интерпретация данных *GSTM1* и *GSTT1***

Наличие гомозигот по нормальному аллелю «+» или гетерозигот определяется по наличию на электрофореграмме фрагмента длиной 215 п.н. для гена *GSTM1* и 480 п.н. для гена *GSTT1*. Отсутствие фрагментов свидетельствует о гомозиготности по нулевому аллелю (генотип 0/0) (рисунок 1).



21–26 — номера проб; M — маркер длин ДНК pUC/MspI; сверху — аллельное состояние генов *GSTM1/GSTT1*; слева — размеры амплифицированных фрагментов (215 п.н. для *GSTM1* и 480 п.н. для *GSTT1*); справа — размеры фрагментов маркера длин ДНК pUC19/MspI

**Рисунок 1 — Электрофореграмма продуктов амплификации аллелей генов *GSTM1* и *GSTT1***

Успешность прохождения амплификации определяется по присутствию фрагмента гена *CYP1A1* размером 340 п.н. Таким образом, гетерозиготные по мутациям в генах *GSTM1* и *GSTT1* лица (генотип +/0) рассматривались в одной группе с носителями нормальных генов *GST* в гомозиготном состоянии (генотип +/+).

#### **Оценка относительного риска (OR) развития заболеваний органов половой системы по результатам генотипирования**

Для определения относительного риска развития заболеваний органов половой системы следует иметь в виду, что основное влияние на данный показатель оказывает аллельное состояние гена *GSTT1*. Полиморфизм гена *GSTM1* вносит существенно меньший вклад (таблица 5), однако максимальный риск обуславливается отсутствием активности двух ферментов, кодируемых этими генами (генотип *GSTM1*«0»/*GSTT1*«0»).

Таблица 5 — Относительная вероятность развития заболеваний органов половой системы у работников, контактирующих с ПАУ

Генотип	Вероятность	OR (95% CI)*
<i>GSTM1</i> «+»/ <i>GSTT1</i> «+»	Минимальная	0,51 (0,3–0,87)
<i>GSTM1</i> «0»/ <i>GSTT1</i> «+»	Низкая	0,97 (0,59–1,6)
<i>GSTM1</i> «+»/ <i>GSTT1</i> «0»	Средняя	1,65 (0,77–3,54)
<i>GSTM1</i> «0»/ <i>GSTT1</i> «0»	Высокая	2,17 (1,11–4,27)

Примечание —\*OR (95% CI) — отношение шансов и 95% доверительный интервал.

При генотипах *GSTM1*«+»/*GSTT1*«+» или *GSTM1*«0»/*GSTT1*«+» риск развития заболеваний органов половой системы для индивидов, контактирующих с ПАУ, не превышает общепопуляционный.

В случае же выявления генотипов GSTM1«+»/GSTT1«0» или GSTM1«0»/GSTT1«0» можно сделать вывод об относительно высоком риске возникновения заболеваний органов половой системы.

При обнаружении делетированного аллельного состояния гена GSTT1 целесообразно рекомендовать индивидам, имеющим один из вышеуказанных генотипов, избегать контакта с ПАУ, например, предлагать выбор другой профессии, не связанной с воздействием вредных химических факторов.

Алгоритм оценки генетического риска заболеваний органов половой системы для работы в контакте с ПАУ с использованием метода ДНК-анализа представлены в приложении.

**На предварительных медицинских осмотрах** лицам, планирующим работать в контакте с ПАУ, помимо стандартного обследования следует проводить генотипирование по генам второй фазы биотрансформации ксенобиотиков GSTM1 и GSTT1.

При выявлении генотипа GSTM1«+»/GSTT1«0» или двойного делетированного генотипа GSTM1«0»/GSTT1«0», обуславливающих высокий риск развития заболеваний органов половой системы, необходимо рекомендовать работу в условиях отсутствия контакта с ПАУ. При отказе от смены условий труда осуществляется динамическое врачебное наблюдение.

При проведении **ежегодных периодических медицинских осмотров** у работников, контактирующих с ПАУ, при наличии в анамнезе заболеваний органов половой системы (воспалительных заболеваний и доброкачественных опухолей) следует настоятельно рекомендовать проведение генотипирования по локусам GSTM1 и GSTT1. Женщины, являющиеся носителями нулевых аллелей генов GSTM1 и GSTT1 в гомозиготном состоянии, должны проходить тщательный скрининг для раннего обнаружения заболеваний половой системы.

При выявлении генотипов GSTM1«+»/GSTT1«0» и GSTM1«0»/GSTT1«0» их носители включаются в группы риска. Лицам, имеющим данные генотипы, следует разъяснить их неблагоприятное влияние на предрасположенность к развитию заболеваний органов половой системы и рекомендовать работу в условиях отсутствия контакта с ПАУ.

При отказе от смены условий труда осуществляется динамическое наблюдение врача-акушера-гинеколога. При смене условий труда следует предлагать выбор другой профессии, не связанной с воздействием вредных химических факторов. При минимальном и низком риске проводится диспансерное наблюдение и лечение у врача-акушера-гинеколога.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Метод ПЦР требует строгого соблюдения правил при организации и проведении всех этапов анализа ПЦР-лаборатории. При нарушении проведения ПЦР могут быть неверные — ложноположительные или ложноотрицательные — результаты. Во избежание диагностических ошибок рекомендуется соблюдать правила работы в молекулярно-генетической лаборатории.



### Алгоритм оценки генетического риска заболеваний органов половой системы для работы в контакте с ПАУ

