

Долгих О. В., Старкова К. Г., Кривцов А. В.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭКСПОЗИЦИИ БЕНЗ(А)ПИРЕНА У ДЕТЕЙ

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»;

ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,

г. Пермь, Российская Федерация;

Резюме. Представлены результаты исследований особенностей распределения частот генов CYP1A1, TNFальфа, PT53, MMP9 у детей в условиях экспозиции бенз(а)пиреном. Выявлены особенности генетического полиморфизма генов, а также их ассоциация с контаминацией биосред химическими канцерогенами и специфическим иммунологическим ответом на гаптен. Выявлена вариабельная аллельность иммунокомпетентных генов и гена детоксикации преимущественно за счет частот гетерозиготных аллельных вариантов.

Ключевые слова: ген транскрипционного фактора p53, фактор некроза опухоли, IgG к бенз(а)пирену

Вследствие генетической гетерогенности популяции человека в ней присутствуют индивиды, генетические особенности которых обуславливают повышенную чувствительность к действию химических веществ, обладающих свойствами канцерогенов. Восприимчивость организма к воздействию техногенных химических факторов в значительной мере зависит от функциональных особенностей и генетических ассоциаций, определяющих состояние белков, отвечающих за детоксикацию, интенсивность и последовательность процессов апоптоза и активности состояния компонентов иммунного ответа, участвующих в реализации этого процесса [1–10]. К ключевым полиморфизмам, определяющим взаимодействие факторов окружающей среды и процессов иммунологического гомеостаза, относятся полиморфизмы генов цитохрома CYP1A1, транскрипционного фактора p53, фактора некроза опухоли альфа (TNFальфа) и металлопротеиназы [11, 12, 13]. Первая фаза дезактивации обеспечивается, главным образом, суперсемейством цитохрома P-450 (CYP). Их основные функции заключаются в присоединении к молекуле ксенобиотика гидрофильных групп, благодаря чему происходит детоксикация. CYP1A1 кодирует фермент арилуглеводородкарбоксилузу, который участвует в метаболизме эстрогенов, некоторых лекарственных средств и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) — основных компонентов табачного дыма и продуктов сжигания органического топлива. Этот фермент контролирует начальный метаболизм ПАУ и ряда других органических соединений, приводящий к образованию канцерогенов (например, бенз(а)пирена) [14]. Продукт гена TNFальфа — фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа, кахектин) — относится к цитокиновой системе и представляет собой клеточный медиатор макрофагов и лимфоцитов, играет важную роль в регуляции процессов дифференцировки, роста и метаболизма клеток, является медиатором воспалительных процессов, инициирует образование свободных радикалов и может способствовать развитию оксидативного стресса. Полиморфизм каждого из сайтов промоторной области гена TNFA снижали активность гена-репортера примерно в два раза. Ген p53 — онкосупрессор, его продукт белок p53 контролирует ответ клетки на различные виды стресса, включая повреждение ДНК химическими и физическими агентами, нарушения микротрубочек цитоскелета, активацию онкогенов, гипоксию, гипертермию и др. Активация гена p53 ведет к остановке пролиферации клетки и к включению в ней программы апоптоза — запрограммированной клеточной гибели. Металлопротеиназа MMP9 относится к семейству внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все

типы белков внеклеточного матрикса; играет роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей; задействована в расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптотных лигандов, таких как FAS, а также в активации и деактивации хемокинов и цитокинов.

Цель работы — анализ иммунологических и генетических маркеров у детского населения в условиях техногенного загрязнения среды обитания бенз(а)пиреном.

Материалы и методы

Проводили углубленное изучение состояния здоровья детского населения в возрасте от 3 до 7 лет, посещающего детские дошкольные учреждения в крупном промышленном центре. Ведущим фактором аэрогенной внешнесредовой нагрузки выступал бенз(а)пирен. Обследованы 90 детей (группа наблюдения), при этом группу сравнения составили 80 детей с условно-чистой территории с допустимым уровнем химического воздействия.

Содержание органических соединений в биосредах определяли с помощью высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Показатели гиперчувствительности (содержание IgG специфического к бенз(а)пирену) изучали методом аллгосорбентного тестирования. Медиаторы межклеточной иммунной регуляции (IL-10, IL-17, TNF-альфа), маркер эндотелиальной дисфункции VEGF, IgE общий идентифицировали в процессе иммуноферментного анализа. Забор материала для ПЦР проводили методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Для определения генотипов использовали вариант ПЦР в режиме реального времени и метод аллельной дискриминации. В ходе исследования проведено изучение полиморфизма шести патогномичных генов — CYP1A1, TNFальфа, PT53, MMP9.

Результаты и их обсуждение

Натурные исследования качественного состава атмосферного воздуха показали, что его состояние не соответствует установленным гигиеническим нормативам. Дети, проживающие в анализируемом районе, находятся под воздействием бенз(а)пирена в условиях превышения нормативных концентраций — до 1,9 ПДКс.с.

Анализ полученных концентраций органических соединений в крови детей группы наблюдения показало наличие достоверного превышения концентрации бенз(а)пирена в крови детей в 1,6 раза ($p < 0,05$) над его содержанием в крови детей, проживающих на территории сравнения.

Анализ заболеваемости населения, проживающего в исследуемых районах, проводился по классу болезней врожденные аномалии, деформации и хромосомные нарушения. Зафиксированы достоверно более высокие показатели распространенности заболеваний в группе наблюдения (20,0 на 1000 населения) по отношению к группе сравнения (10,0 на 1000 населения).

Анализ отношения шансов изменения показателей гуморального иммунитета при возрастании концентрации загрязнителей в биологических средах позволил установить достоверное ($p < 0,05$) повышение концентрации IgG при увеличении концентрации в крови бенз(а)пирена ($R2 = 0,92$ при $p < 0,05$).

Наблюдаются достоверные отклонения уровня общей сенсibilизации как в сравнении с возрастной нормой (содержание IgE общего — 114,6 ± 34,70 МЕ/мл при норме <50,0) (p < 0,05), так и с группой контроля. Достоверно увеличивается шанс возрастания IgE общего при повышении концентрации бенз(а)пирена — R2 = 0,74 при p < 0,05.

Выявлено достоверное снижение васкулярного эндотелиального фактора роста в сравнении с контрольным уровнем, p < 0,05. Наблюдались отклонения регуляторных показателей по отношению к группе сравнения, в частности, достоверно повышен уровень содержания медиаторов межклеточной иммунной регуляции (IL-17). Одновременно отмечалось достоверное снижение концентрации TNF-альфа у обследованных в среднем в 2 раза относительно группы сравнения (p < 0,05).

Установлен достоверно повышенный по сравнению с референтными значениями уровень специфической сенсibilизации к бенз(а)пирену по критерию IgG, достоверный по кратностям превышения нормы (кратность превышения нормы составила по IgG к бенз(а)пирену в 1,5 раза) (p < 0,05), а также относительно группы сравнения в 2,0 раза (p < 0,05).

Анализ отношения шансов изменения специфического ответа при возрастании концентрации контаминантов в крови позволил установить достоверное (p < 0,05) повышение концентрации IgG к бенз(а)пирену при увеличении концентрации бенз(а)пирена в крови (R2 = 0,73 при p < 0,05).

Генетический анализ выявил особенности полиморфизма приоритетных генов, участвующих в процессах адаптации к измененным условиям среды (Таблица 1).

Так, у детей группы наблюдения ген фермента детоксикации ксенобиотиков CYP1A1 отличался повышенной в 5,3 раза частотой минорного аллеля за счет гетерозиготных генотипов. Аллельный полиморфизм гена, отвечающего за иммунный ответ и апоптоз — TNFальфа — также характеризовался повышенной (в 1,3 раза) распространенностью у детей группы наблюдения за счет гетерозиготного варианта. Вариантный аллель гена транскрипционного фактора в основной группе достоверно наблюдался в 2,2 раза чаще группы сравнения. Анализ распространенности мутантного аллеля гена металлопротеиназы показал возрастание в 2,7 раза частоты минорного гомозиготного генотипа гена MMP9 в анализируемой группе по отношению к группе сравнения.

Таблица 1

Результаты генотипирования, дети, %

Ген/Аллель	CYP1A1		PT53		TNF		MMP9	
Группа наблюдения	GG	88	CC	40	GG	72	AA	28
	GA	12	CG	46	GA	28	AG	56
	AA	0	GG	14	AA	0	GG	16
	G	94	C	63	G	86	A	56
	A	16	G	37	A	14	G	44
Группа сравнения	GG	93	CC	66	GG	79	AA	60
	GA	7	CG	33	GA	21	AG	34
	AA	0	GG	1	AA	0	GG	6
	G	97	C	83	G	89	A	77
	A	3	G	17	A	11	G	23

Выводы

1. В результате обследования детского населения крупного промышленного центра, проживающего в условиях загрязнения среды обитания бенз(а)пиреном, выявлены существенные изменения функциональных показателей иммунной системы: повышение специфической чувствительности к компонентам факторной нагрузки организма (IgG к бенз(а)пирену); изменение уровня медиаторов им-

мунной регуляции TNF-альфа, ИЛ-17 (p < 0,05).

2. Показанные нарушения дополняются особенностями генетического полиморфизма с преимущественной распространенностью минорного аллеля генов цитохрома, фактора некроза опухоли, транскрипционного фактора и металлопротеиназы. При этом бенз(а)пирен выступает ведущим показателем факторной нагрузки, достоверно влияя на иммунный статус обследованных детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Вдовина Н.А. Оценка иммунного статуса женщин, работающих в условиях воздействия бенз(а)пирена. Академический журнал Западной Сибири. 2013; 6(49): 105-106.
2. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Лыхина Т.С., Кривцов А.В., Гугович А.М. Регуляция цитокинового профиля у работающих в условиях вредного производства. Цитокины и Воспаление. 2010; 9(3): 45-46.
3. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Харахорина Р.А. Особенности апоптоза в условиях экспозиции хлорорганических соединений и ванадия. Гигиена и санитария. 2012; 3: 15-17.
4. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Предеина Р.А. и соавт. Полиморфизм генов и особенности иммунной регуляции у работающих в условиях металлургического производства. Здоровье семьи – 21 век. 2013; 4(4): 27-39.
5. Измеров Н.Ф. Профессиональный отбор в медицине труда. Мед. труда и пром. экология. 2006; 3: 1-5.
6. Рахманин Ю.А., Новиков С.М., Иванов С.И. Современные научные проблемы совершенствования методологии оценки риска здоровью населения. Гигиена и санитария. 2005; 2: 3-8.
7. Dolgikh O.V., Kharakhorina R.A., Dianova D.G., Gugovich A.M. State of cell regulation in children exposed to phenols. Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies»; 2013 Aug 30v31; St. Louis, Missouri, USA; 2013.
8. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. Molecular markers of apoptosis in industrial workers. In vivo: International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. 2011; 25(3): 523-524.
9. Descotes J., Nicolas B., Vial T. Assessment of immunotoxic effects in humans. Clin. Chem. 1995; 41(12): 1870-1873.
10. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence. Toxicol. in Vitro. 1994; 8(5): 963-966.
11. Долгих О.В., Кривцов А.В., Дианова Д.Г., Гугович А.М., Харахорина Р.А. Полиморфизм гена фактора некроза опухоли и гена СРОХ у работающих в условиях химического производства. Мед. труда и пром. экология. 2011; 11: 29-32.
12. Долгих О.В., Гугович А.М., Кривцов А.В. Иммуногенетические маркеры пролиферативных реакций в условиях экспозиции бензолом и формальдегидом. Рос. иммун. журнал. 2013; 7(16): 196.
13. Долгих О.В., Бубнова О.А., Данилова Е.Д. и соавт. Полиморфизм генов белков ангиогенеза в условиях шумовой и химической техногенной экспозиции. Здоровье населения и среда обитания. 2013; 11(248): 42-44.
14. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2002.

Авторская справка

Долгих Олег Владимирович

ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

д. м. н., профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь

заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики
Российская Федерация, 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

Старкова Ксения Геннадьевна
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь.
к. б. н., заведующий лабораторией иммунологии и аллергологии ФБУН
Российская Федерация, 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

Кривцов Александр Владимирович
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь
к. м. н., заведующий лабораторией иммуногенетики
Российская Федерация, 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

Dolgikh O. V., Starkova K. G., Krivtsov A. V.
**IMMUNOGENETIC INDICATORS OF
THE EXPOSURE TO BENZO(A)PYRENE
IN CHILDREN**

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health
Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation;
Perm State National Research University, Perm, Russian
Federation

Abstract. This study describes the characteristics of frequencies' distribution of cytochrome genes, TNF α , PT53 and MMP9 genes in children under the conditions of exposure to benzo(a)pyrene. Specific features of the genetic polymorphism and the genes association accompanied by the biological media contamination with a chemical mutagen and the specific immunological response to the hapten were found. The variable allelism of the detoxification gene and the immunocompetent genes was revealed owing to the frequency of heterozygous allelic variants.

Key words: gene of the transcription factor p53, tumor necrosis factor, IgG to benzo(a)pyrene

REFERENCES

1. Dolgih O.V., Zajceva N.V., Dianova D.G., Vdovina N.A. Ocenka immunnogo statusa zhenshin, rabotajushhih v usloviyah vozdeystvija benz(a)pirena. Akademicheskij zhurnal Zapadnoj Sibiri. 2013; 6(49): 105-106.
2. Dolgih O.V., Zajceva N.V., Dianova D.G., Lyhina T.S., Krivcov A.V., Gugovich A.M. Reguljacija citokinovogo profilja u rabotajushhih v usloviyah vrednogo proizvodstva. Citokiny i Vospalenie. 2010; 9(3): 45-46.
3. Dolgih O.V., Zajceva N.V., Dianova D.G., Harahorina R.A. Osobennosti apoptoza v usloviyah jekspozicii hlororganicheskikh soedinenij i vanadija. Gigiena i sanitarija. 2012; 3: 15-17.
4. Zajceva N.V., Dolgih O.V., Predeina R.A. i soavt. Polimorfizm genov i osobennosti immunnnoj reguljacji u rabotajushhih v usloviyah metallurgicheskogo proizvodstva. Zdorov'e sem'i – 21 vek. 2013; 4(4): 27-39.
5. Izmerov N.F. Professional'nyj otbor v medicene truda. Med. truda i prom. jekologija. 2006; 3: 1-5.
6. Rahmanin Ju.A., Novikov S.M., Ivanov S.I. Sovremennye nauchnye problemy sovershenstvovanija metodologii ocenki riska zdorov'ju naselenija. Gigiena i sanitarija. 2005; 2: 3-8.
7. Dolgikh O.V., Kharahorina R.A., Dianova D.G., Gugovich A.M. State of cell regulation in children exposed to phenols. Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies»; 2013 Aug 30v31; St. Louis, Missouri, USA; 2013.
8. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. Molecular markers of apoptosis in industrial workers. In vivo: International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. 2011; 25(3): 523-524.
9. Descotes J., Nicolas B., Vial T. Assessment of immunotoxic effects in humans. Clin. Chem. 1995; 41(12): 1870-1873.
10. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in

humans: A review of current evidence. Toxicol. in Vitro. 1994; 8(5): 963-966.

11. Dolgih O.V., Krivcov A.V., Dianova D.G., Gugovich A.M., Harahorina R.A. Polimorfizm gena faktora nekroza opuholi i gena SROH u rabotajushhih v usloviyah himicheskogo proizvodstva. Med. truda i prom. jekologija. 2011; 11: 29-32.

12. Dolgih O.V., Gugovich A.M., Krivcov A.V. Immunogeneticheskie markery proliferativnyh reakcij v usloviyah jekspozicii benzolom i formal'degidom. Ros. immun. zhurnal. 2013; 7(16): 196.

13. Dolgih O.V., Bubnova O.A., Danilova E.D. i soavt. Polimorfizm genov belkov angiogeneza v usloviyah shumovoj i himicheskoy tehnogennoj jekspozicii. Zdorov'e naselenija i sreda obitaniya. 2013; 11(248): 42-44.

14. Kucenko S.A. Osnovy toksikologii. SPb.: Voenno-meditsinskaja akademija im. S.M. Kirova, 2002.

Authors

Dolgikh Oleg V.
Perm State National Research University
MD, Professor of Human Ecology and Life Safety Department
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management
Technologies
Head of Immunobiological Diagnostics Department
Monastyrskaya St., 82, 614045 Perm, Russian Federation
oleg@fcrisk.ru

Starkova Kseniya G.
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management
Technologies
PhD, Head of Allergy and Immunology Laboratory
Monastyrskaya St., 82, 614045 Perm, Russian Federation

Krivtsov Aleksandr V.
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management
Technologies
PhD, Head of Immunogenetics Laboratory
Monastyrskaya St., 82, 614045 Perm, Russian Federation