

Гугович А.М., Долгих О.В., Кривцов А.В.

Иммунные и генетические маркеры контаминации бенз(а)пиреном у детей Пермского края

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

Gugovich A.M., Dolgikh O.V., Krivtsov A.V.

Immune and genetic markers of benzo(a)pyrene contamination in children of the Perm region

Резюме

Представлены особенности распределения генов TNF- α и CYP 1A1 детского населения Пермского края в условиях контаминации крови бенз(а)пиреном. Установлены достоверные изменения иммунологических показателей в сравнении с референтными значениями, что свидетельствует о дестабилизации регуляторных механизмов у обследованных детей. Выявлена ассоциация специфического иммунного ответа на гаптен с контаминацией биосред бенз(а)пиреном.

Ключевые слова: бенз(а)пирен, контаминация, полиморфизм генов, иммунный ответ

Summary

This article presents the distribution features of TNF- α and CYP 1A1 genes in children of the Perm region under the conditions of blood contamination with benzo(a)pyrene. Significant changes of immunological parameters in comparison with the reference values have been revealed, this fact indicates the destabilization of regulatory mechanisms in the examinees. The study has identified association of specific immune response to the hapten with benzo(a)pyrene contamination of biological media.

Keywords: benzo(a)pyrene, contamination, gene polymorphism, immune response

Введение

В настоящее время тема здоровья детей в связи с воздействием техногенных факторов актуальна во всем мире. Наибольшую актуальность принимает она в крупных промышленных городах, вокруг которых сформировались устойчивые очаги социально-экологической напряженности и патологии населения, обусловленной состоянием окружающей среды. Дети, наиболее чувствительные к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, являются наиболее универсальным объектом для исследований техногенно обусловленных патологий [1, 2, 3].

Течение иммунного ответа обуславливают не только многие гены, но и факторы окружающей среды [4]. Поступление в организм широкого спектра токсических веществ химической природы вызывает нарушение иммунного ответа, оказывая прямые токсические и эпигенетические эффекты на клетки иммунной системы. В последние годы идентифицированы также соединения, которые приобретают иммуномодифицирующие свойства уже вследствие метаболизма *in vivo* [5, 6].

Целью настоящей работы являлась оценка особенностей воздействия бенз(а)пирена на иммунологические и генетические показатели детей, проживающих на территории Пермского края.

Материалы и методы

При углубленном изучении состояния здоровья обследовано 188 детей дошкольного возраста ($5,81 \pm 0,16$ лет, из них 89 девочек и 99 мальчиков), проживающих на территории г. Губаха Пермского края, на которой идентифицированы различные по уровню и спектру токсические соединения в воздухе и питьевой воде: фенол, бенз(а)пирен, формальдегид, метанол. В контрольную группу вошли 93 ребенка ($5,13 \pm 0,12$ лет, из них 44 девочки и 49 мальчиков), проживающих на территории экологически «чистой» зоны. Проводимые исследования соответствовали этическим стандартам, прописанным в Хельсинской декларации 1975 г. и в ее пересмотренном варианте 1983 г. Дети исследуемых групп относились к европеоидам, что исключало влияние этнического фактора на распределение полиморфных признаков.

У всех обследуемых детей проводили анализ содержания бенз(а)пирена в крови методом ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series (Agilent, USA). Уровень специфического иммуноглобулина класса G (IgG) к бенз(а)пирену изучали твердофазным методом иммуноферментного анализа, основанном на принципе «сэндвича» с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) на анализаторе «Eix808IU»

(«Biotek», USA). Иммунофенотипирование проводили на лазерном проточном цитометре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). При регистрации результатов в каждой пробе просчитывали не менее 10.000 событий, попавших в выделенный регион.

Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию и детекцию осуществляли с помощью амплификатора CFX96 (BioRad, USA), используя в качестве праймеров участок ДНК генов цитохрома P-450 CYP1A1 (rs4646421), промоторной области гена фактора некроза опухолей TNFA (rs1800629) (ЗАО «Синтол», Россия). Обработку полученных результатов проводили, используя аллельную дискриминацию.

Статистический анализ данных проводился методами описательной статистики и сравнения выборок (с использованием t-критерия Стьюдента), методов математического моделирования (оценка отношения шансов). Достоверными считались данные при $p < 0,05$. Количественные признаки представлены как $M \pm \sigma$ (среднее \pm стандартное отклонение).

Результаты и обсуждение

Среднее значение содержания бенз(а)пирена в крови у детей основной группы достоверно ($p < 0,05$) превышало уровень в контрольной группе в 4,91 раза.

Выявленные изменения в сравнении с референтными значениями свидетельствуют о дестабилизации регуляторных механизмов у обследованных детей: активация системы фагоцитоза; разнонаправленные изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов А, М и G с преимущественным дефицитом IgA; повышенный по сравнению с возрастной нормой уровень общей сенсибилизации; превышение референтного уровня содержания IgG к бенз(а)пирену.

Данные по изменению иммунологических показателей в сравнении с группой контроля представлены в таблице 1. Было обнаружено: высокий уровень абсолютного количества фагоцитов; дефицит содержания IgA; снижение относительного числа общей популяции Т-лимфоцитов (CD3+-лимфоциты), CD4+-клеток (Т-хелперная популяция) и CD8+-клеток (цитотоксические лимфоциты); снижение продукции цитокина TNF- α ; повышение концентрации IgG к бенз(а)пирену у обследуемого контингента.

Результаты математического моделирования с использованием методического приема оценки отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации загрязнителей в биологических средах позволили установить достоверное ($p < 0,05$) повышение абсолютного и относительного фагоцитоза и фагоцитарного числа при увеличении концентрации бенз(а)пирена, формальдегида, фенола и метанола в крови; снижение содержания IgA в сыворотке крови при увеличении концентрации в крови бенз(а)пирена ($r^2=0,72$ при $p < 0,05$) и метанола; повышение концентрации IgG к бенз(а)пирену при увеличении концентрации бенз(а)пирена в крови ($r^2=0,11$ при $p < 0,05$).

Данные по генотипированию представлены в таблице 2. Анализ состояния гена детоксикации (CYP1A1) выявил наличие патологической гомозиготы у 2% детей основной группы при отсутствии таковой в контроле. Состояние гена специфического белка, отвечающего за иммунный ответ (TNF), у детей основной группы характеризовалась следующим полиморфизмом: встречаемость минорной гомозиготы – 2% (1% в контроле); распространенность мутантного аллеля – 12% против 11% в контроле.

Таблица 1. Иммунологические показатели детей, проживающих на территории Пермского края.

Показатели	Референтные значения	Группа наблюдения (n=188)	Группа контроля (n=93)
IgG, г/дм ³	8,22-11,18	10,28 \pm 0,200	10,20 \pm 0,268
IgM, г/дм ³	1,11-1,82	1,22 \pm 0,023	1,24 \pm 0,034
IgA, г/дм ³	0,68-1,44	1,23 \pm 0,040*	1,33 \pm 0,063
Абсолютный фагоцитоз, 10 ⁹ /дм ³	0,964-2,988	2,6 \pm 0,152*	2,199 \pm 0,233
Процент фагоцитоза, %	35-60	61,81 \pm 1,26	59,19 \pm 2,658
Фагоцитарное число, у.е.	0,8-1,2	1,12 \pm 0,037	1,1 \pm 0,064
Фагоцитарный индекс, у.е.	1,5-2	1,8 \pm 0,030	1,85 \pm 0,048
CD3 ⁺ -лимфоциты, %	55-84	67,08 \pm 2,996*	72,8 \pm 1,399
CD3 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,69-2,54	1,71 \pm 0,158	1,83 \pm 0,121
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -лимфоциты, %	31-60	36,33 \pm 2,687*	40,49 \pm 1,91
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,41-1,59	0,93 \pm 0,104	1,01 \pm 0,079
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -лимфоциты, %	13-41	23,96 \pm 1,849*	26,31 \pm 1,373
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,19-1,14	0,61 \pm 0,076	0,67 \pm 0,063
CD19 ⁺ -лимфоциты, %	6-25	14,79 \pm 1,585	13,85 \pm 0,941
CD19 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,09-0,66	0,38 \pm 0,046	0,35 \pm 0,037
CD16 ⁺ 56 ⁺ -лимфоциты, %	5-27	10,13 \pm 2,204	11,25 \pm 1,367
CD16 ⁺ 56 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,09-0,59	0,25 \pm 0,054	0,29 \pm 0,044
IgG к бенз(а)пирену, у.е.	0-0,3	0,64 \pm 0,127*	0,073 \pm 0,021
Фактор некроза опухолей, пг/см ³	0-6	0,42 \pm 0,182*	2,33 \pm 1,306

Примечание: * - достоверность различий при $p < 0,05$.

Таблица 2. Распределение частот генов у детей, проживающих в зоне влияния углеперерабатывающего комбината.

Ген (ОНП)	Генотип /аллель	Группа наблюдения (n=188)	Группа контроля (n=93)
TNF (G308A)	GG	78 % (147)	80 % (74)
	AG	20 % (38)	19 % (18)
	AA	2 % (3)	1 % (1)
	G	88 %	89 %
	A	12 %	11 %
CYP1A1 (9893A/G)	G/G	81 % (153)	77 % (72)
	A/G	17 % (32)	23 % (21)
	A/A	2 % (3)	0 % (0)
	G	90 %	89 %
	A	10 %	11 %

Заключение

Таким образом, по результатам иммунологического исследования выявлены нарушения: клеточного (активация фагоцитоза, угнетение экспрессии Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток) и гуморального (угнетение содержания IgA и продукции проапоптотического цитокина TNF- α) звеньев иммунитета, специфической чувствительности к компонентам факторной нагрузки (повышение содержания антител к бенз(а)пирену). Оценка результатов изучения полиморфизма генов, отвечающих за детоксикацию, и генов универсальных белков, которые модифицируют иммунный ответ в условиях воздействия индукторов, выявила особенности генетического полиморфизма гена CYP 1A1 и гена TNF в виде высокой распространенности минорного аллеля и патологической

гомозиготы по сравнению с группой контроля. Выявленная ассоциация специфического иммунного ответа с контаминацией биосред бенз(а)пиреном, а также негативный генетический фон создают условия для истощения возможностей адекватного иммунного ответа.■

Гугович А.М., м.н.с. лаборатории методов клеточной диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Долгих О.В., д.м.н., профессор, зав. отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Кривцов А.В., к.м.н., зав. лабораторией иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Автор, ответственный за переписку – Гугович А.М., 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, д. 82, тел.: 8 (964) 19 77 491. E-mail: gugovich@yandex.ru

Литература:

1. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Гугович А.М., Кривцов А.В. Оценка иммунологического статуса в условиях воздействия химических факторов // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2010; 2/1(29): 124-125.
2. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности иммунных нарушений в условиях производства активированных углей // Мед труда и пром. экология. 2011; 2: 21-23.
3. Ванюхина М.А., Пухляк В.П. Анализ состояния здоровья детского населения г. Череповца. Экология человека. 2006; 6: 34-36.
4. Sandford A, Weir T, Pare P. The genetics of asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 153: 1749-1765.
5. Mulder G.J. Metabolic activation of industrial chemicals and implications for toxicity. Toxicology of industrial compounds. Eds London: Taylor and Fransis, 1995: 37-44.
6. Van Bladeren P.J., van Ommen B. Metabolism of reactive chemicals. Toxicology of industrial compounds. Eds. London: Taylor and Fransis, 1995: 61-72.