

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических
технологий управления рисками здоровью населения»
Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека по Пермскому краю
Отделение медицинских наук Российской академии наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Пермский государственный национальный исследовательский университет»
Государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера»

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БЕЗОПАСНОСТИ И АНАЛИЗА РИСКА ЗДОРОВЬЮ НАСЕЛЕНИЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФАКТОРОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Материалы
VI Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

(Пермь, 13–15 мая 2015 г.)

*Под редакцией профессора А.Ю. Поповой,
академика РАН Н.В. Зайцевой*

Пермь 2015

<i>О.А. Бубнова, О.В. Долгих</i> Маркеры генетической предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям у женщин, проживающих в условиях экспозиции фенолами	486
<i>О.В. Долгих, К.Г. Старкова</i> Особенности изменения иммунных медиаторов у детей в условиях повышенного содержания стронция в питьевой воде	489
<i>О.В. Долгих, К.Г. Старкова, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова</i> Иммунные и генетические особенности у детей в условиях повышенного содержания в питьевой воде хлорорганических соединений	492
<i>О.В. Долгих, К.Г. Старкова, А.В. Кривцов, А.С. Сбоев, О.А. Бубнова, Д.Г. Дианова, Е.А. Пирогова, Н.А. Вдовина, Н.В. Безрученко, В.А. Лучникова</i> Гены детоксикации и иммунологические маркеры эффекта у детей в условиях воздействия хлороформа при поступлении с питьевой водой	497
<i>О.В. Долгих, К.Г. Старкова, А.В. Кривцов, А.С. Сбоев, О.А. Бубнова, Д.Г. Дианова, Е.А. Пирогова, Н.А. Вдовина, Н.В. Безрученко, В.А. Лучникова</i> Генетические особенности адаптивности иммунологического статуса у детей, проживающих в условиях водной экспозиции марганцем	501
<i>В.Н. Звездин</i> Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у мышечной линии BALB/С в условиях подострого внутрижелудочного поступления водного раствора кластерного серебра «Арговит»	504
<i>М.А. Землянова, Д.Л. Мазунина</i> Особенности негативного влияния повышенного содержания металлов природно-антропогенного происхождения (марганца, никеля, хрома) в питьевой воде на биохимические и гематологические показатели процессов кроветворения у детей	508
<i>М.А. Землянова, Д.Л. Мазунина, А.С. Сбоев</i> Биомаркеры неканцерогенных эффектов при экспозиции хлорорганических соединений с питьевой водой для доказательства причинения вреда здоровью	513
<i>М.А. Землянова, А.В. Тарантин</i> Гигиеническая оценка нарушений протеомного профиля плазмы крови детей при поступлении стронция, марганца с питьевой водой	519
<i>Ю.А. Ивашова, В.Э. Белицкая, К.П. Лужецкий, О.Ю. Устинова</i> Особенности тиреоидного профиля и ультразвуковых изменений щитовидной железы у детей в условиях природного йоддефицита и пероральной экспозиции продуктами гиперхлорирования (хлороформ, тетрахлорметан)	524
<i>В. Калабрезе (V. Calabrese)</i> Регуляция окислительно-восстановительного потенциала клеточной реакции на стресс в процессе старения и при нейродегенеративных расстройствах: роль витагенов и модуляция антиоксидантов	529

Гены детоксикации и иммунологические маркеры эффекта у детей в условиях воздействия хлороформа при поступлении с питьевой водой

О.В. Долгих^{1,2}, К.Г. Старкова¹, А.В. Кривцов¹,
А.С. Сбоев³, О.А. Бубнова^{1,2}, Д.Г. Дианова¹,
Е.А. Пирогова¹, Н.А. Вдовина¹, Н.В. Безрученко^{1,2},
В.А. Лучникова¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия,

²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия,

³Управление Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Пермскому краю, г. Пермь, Россия

Использование современных диагностических иммунологических и молекулярно-генетических технологий, в частности ПЦР, позволяет провести объективную и достоверную оценку иммунного ответа и полиморфизма генов у населения в условиях повышенной внешнесредовой химической нагрузки. Нарушения здоровья, обусловленные факторами водной среды, измененной продуктами хлорирования, диктуют целесообразность научно-исследовательских работ по определению индивидуальной чувствительности организма к действию хлорорганических соединений и функционального состояния систем генетической и иммунной регуляции гомеостаза.

Цель работы – анализ изменения иммунологических и генетических маркеров у детского населения в условиях контаминации водной среды хлороформом (на примере Пермского края).

Материалы и методы. Выполнено комплексное обследование 89 детей в возрасте от 3 до 7 лет, которые постоянно проживают и посещают детские сады на территории Пермского края, где отмечается повышенное содержание хлороформа в питьевой воде. Группу сравнения составили 46 детей, проживающие на экологически благополучной территории. Группы были сопоставимы по соматической заболеваемости и этнической принадлежности.

Исследования биосред (кровь) на содержание хлорорганических углеводов (хлороформ) выполнялось методом анализа равновесной паровой фазы на газовом хроматографе «Кристалл-5000» с капиллярной колонкой DB-624 и селективным детектором электронного захвата (ДЭЗ) в соответствии с методическими указаниями МУК 4.1.2115-06. Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuestPro. Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD25+, CD95+) осуществляли методом мембранной иммунофлюо-

ресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам («Becton Dickinson», USA), при этом регистрировали суммарно не менее 10 000 событий.

Маркеры пролиферативных реакций (CA 72-4, CA 19-9) определялись с помощью иммуноферментного анализа на анализаторе «Elx808IU».

Специфические к хлороформу IgG определяли методом модифицированного конкурентного иммуноферментного анализа на анализаторе «Elx808IU» (США) согласно МР 111-14/55-04-02 [3].

Материал для ПЦР получали с помощью взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Для определения генотипов использовали вариант ПЦР в режиме реального времени и метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров. Проведено изучение полиморфизма генов детоксикации: CYP1A1 (цитохром), GSTA4 (глутатионтрансфераза), SOD2 (супероксиддисмутаза), ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), TERT (теломераза), MMP9 (металлопротеиназа).

Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета программ Microsoft Office и дополнительной программы Statistica 6.0. Достоверность различий между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт». Данная программа служит для расчета статистических параметров для исследований «случай–контроль», использующих SNP (диагностику однонуклеотидных полиморфизмов). Применялись статистические методы для описания равновесия частот генотипов и аллелей генов по равновесию Харди–Вайнберга.

Результаты и их обсуждение. Средние концентрации хлороформа в пробах воды исследуемой территории превосходили примерно в 2,5 раза аналогичные в пробах воды территории сравнения ($p < 0,05$). Проведенное химико-аналитическое исследование выявило повышенные уровни хлороформа в биосредах обследуемых детей – в 2,0 раза выше, чем в крови детей территории сравнения.

Установлен достоверно повышенный относительно референтных значений уровень специфической сенсибилизации к хлороформу по критерию IgG у 41,8 % детей, с достоверным различием от нормальных значений.

Анализ отношения шансов изменения маркеров специфической сенсибилизации при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах позволил установить достоверное ($p < 0,05$) повышение концентрации IgG к хлороформу при увеличении концентрации четыреххлористого углерода в крови ($R^2 = 0,50$ при $p < 0,05$).

Повышенный уровень фетальных белков зафиксирован в сыворотке крови 2,2 % детей – CA 199 и у 3,2 % детей – CA 724, проживающих на территории наблюдения. Причем отклонения показателей CA 199 по отношению к группе сравнения были достоверными ($p < 0,05$).

Наблюдаются достоверные отклонения показателей CD-иммунограммы в сравнении с референтным уровнем – снижение активационного маркера CD25+, а также CD95+ (у 26,7 – 63,3 % детей). Результаты моделирования отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах позволило установить достоверное ($p < 0,05$) понижение CD4+, CD25+, CD95+ при увеличении концентрации хлороформа ($R^2 = 0,68–0,87$ при $p < 0,05$).

В процессе генетического анализа исследовали полиморфизм генов ферментов 1-й и 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков – как одних из важнейших маркеров в измененных условиях среды обитания (таблица). Ген цитохрома P-450 CYP1A1 обеспечивает метаболизм 1-й фазы детоксикации и промежуточный обмен многих эндогенных метаболитов; ген GSTA4 играет ключевую роль в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов. В результате была выявлена достоверно повышенная ($p < 0,05$) в 3,0 раза распространенность патологического аллеля гена цитохрома, а также в 4,0 раза – гетерозиготного генотипа гена глутатион-S-трансферазы у обследуемых детей относительно группы сравнения. Аллельный полиморфизм гена металлопротеиназы (MMP9) характеризуется наличием достоверных различий группы наблюдения с группой сравнения (повышение распространенности мутантного аллеля MMP9 в 2,5 раза). Повышены распространенность вариантного гомозиготного генотипа гена SOD2 и гетерозиготного варианта гена теломеразы TERT по отношению к группе сравнения. Причем наблюдается достоверная взаимосвязь содержания ключевых ферментов и ответственных за них кандидатных генов ($p < 0,05$).

Особенности генетического полиморфизма у детей,
потребляющих воду с повышенным содержанием хлороформа (%)

Ген	Генотип	Группа сравнения ($n = 46$)	Группа наблюдения ($n = 89$)
CYP1A1	AA	96	88
	GA	4	12
	GG	0	0
	A	98	94
	G	2	6
MMP9	CC	72	44
	GC	28	47
	GG	0	9
	C	86	67
	G	14	33
TERT	CC	48	3
	CG	28	97
	GG	24	0
	C	62	52
	G	38	48
GSTA4	TT	88	78
	TC	4	16
	CC	8	6
	T	90	86
	C	10	14
SOD2	CC	52	47
	CA	28	28
	AA	20	25
	C	66	61
	A	34	39
ZMPSTE	TT	84	81
	TC	16	13
	CC	0	6
	T	92	88
	C	8	12

Выводы. Проведенное обследование детского контингента, проживающего в условиях контаминации питьевой воды хлороформом, выявило повышение экспрессии онкопролиферативных белков (CA 72-4, CA 19-9) и специфической чувствительности к компонентам факторной нагрузки (повышение содержания IgG к хлороформу), а также генетические нарушения детоксикации контаминантов, ассоциированные с полиморфизмом генов детоксикации и оксигенации CYP1A1 (цитохром), GSTA4 (глутатионтрансфераза), SOD2 (супероксиддисмутаза), ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), TERT (теломераза), MMP9 (металлопротеиназа), характеризующих специфические различия между анализируемыми группами.

Список литературы

1. Долгих О.В., Предеина Р.А., Дианова Д.Г. Экспериментальная оценка влияния фенолов на иммунорегуляцию *ex vivo* // Анализ риска здоровью. – 2014. – № 1. – С. 83–87.
2. Измеров Н.Ф. Профессиональный отбор в медицине труда // Медицина труда и промышленная экология. – 2006. – № 3. – С. 1–5.
3. Иммунологические и генетические маркеры внешнесредовой экспозиции стронцием / К.Г. Горшкова, О.А. Бубнова, Е.Д. Маерова, О.В. Долгих // Санитарный врач. – 2014. – № 3. – С. 72–74.
4. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Долгих О.В. Особенности апоптоза у детей при хроническом аэрогенном воздействии фенола // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 2. – С. 56–59.
5. Особенности генетического полиморфизма у женщин с угрозой невынашивания в условиях хронической аэрогенной экспозиции фенолами / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, В.Б. Алексеев // Анализ риска здоровью. – 2013. – № 4. – С. 77–81.
6. Патогенетические закономерности каскадного механизма развития хронических гастродуоденальных заболеваний у детей, обусловленных потреблением питьевой воды ненадлежащего качества по содержанию продуктов гиперхлорирования и марганца / О.Ю. Устинова, К.П. Лужецкий, О.А. Маклакова, М.А. Землянова, О.В. Долгих, Т.С. Уланова // Анализ риска здоровью. – 2014. – № 3. – С. 61–70.
7. Mulder G.J. Metabolic activation of industrial chemicals and implications for toxicity // Toxicology of industrial compounds. Taylor & Francis Ltd. UK. – 1995. – P. 37–44.
8. State of cell regulation in children exposed to phenols / O.V. Dolgikh, R.A. Kharakhorina, D.G. Dianova, A.M. Gugovich // Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies». – 2013 – С. 149–152.
9. Van Bladeren P.J., Van Ommen B. Metabolism of reactive chemicals // Toxicology of industrial compounds. Taylor & Francis Ltd. – 1995. – P. 61–72.
10. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa / P.G. Gervasi, V. Longo, F. Naldi, G. Panattoni, F. Ursino // Biochem Pharmacol. – 1991. – Vol. 41. – P. 177–184.
11. Zaitseva N.V., Dianova D.G., Dolgykh O.V. Effects of cellular immunity in conditions of surplus supply of strontium with consumed water // European journal of natural history. – 2014. – № 1. – С. 7–8.