

© Долгих О.В., Старкова К.Г., Казакова О.А., Кривцов А.В., Отавина Е.А., Мазунина А.А., 2018
УДК 616.24:575

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ВНЕШНЕСРЕДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ВАНАДИЯ

О.В. Долгих^{1,2,3}, К.Г. Старкова¹, О.А. Казакова¹, А.В. Кривцов¹, Е.А. Отавина¹, А.А. Мазунина¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская, 82, г. Пермь, Пермский край, 614045, Россия

²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», ул. Букирева, 15, г. Пермь, Пермский край, 614990, Россия

³ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Комсомольский пр., 29, г. Пермь, Пермский край, 614990, Россия

Проведено обследование взрослого населения ($n = 37$) в возрасте ($33,82 \pm 0,82$) лет, проживающего в экологически неблагоприятных условиях (зона влияния промышленных выбросов) города Чусового (Пермский край). Группа сравнения включала 25 человек из района с допустимыми санитарно-гигиеническими показателями качества атмосферного воздуха. Средний возраст обследованных группы сравнения составлял ($35,25 \pm 1,24$) лет. Особенности иммунного статуса обследованных, подверженных внешнесредовому воздействию мелкодисперсной пыли ванадия, показали снижение фагоцитоза, экспрессию уровня интерлейкина-10 и продукции сывороточного иммуноглобулина класса А (IgA). Как анализ отношения шансов, так и математическое моделирование показали достоверное увеличение содержания иммуноглобулина класса G (IgG) и иммуноглобулина класса М (IgM) ($R^2 = 0,67-0,70$, $p < 0,05$) при повышении концентрации ванадия в крови. В то же время исследование содержания металла в крови наблюдаемой группы в сравнении с допустимым уровнем показало более высокие концентрации. Выявлены особенности полиморфизма генов, которые связаны с возрастанием распространенности минорного гомозиготного генотипа по генам SULT1A1 и CYP1A1*3 – гены иммунной регуляции (MTHFR), детоксикации и эндотелиальной регуляции (VEGFA). Результаты анализа двадцати девяти полиморфных генов выявили ключевые гены мужской и женской подгрупп основной группы, распространенность полиморфизмов которых достоверно различалась с аналогичным показателем группы сравнения ($p < 0,05$). При этом генотипы работающих мужчин основной группы характеризовались достоверным преобладанием вариантного аллеля относительно группы контроля (HTR2A, MTHFR, CYP1A1, FAS, CPOX, TNF). Генотипы работающих женщин характеризовались доминированием таких полиморфных генов, как MTHFR, MMP, ANKK1, ZMPSTE, TNF.

Ключевые слова: иммунная регуляция, генетический полиморфизм, гены детоксикации, гомозиготный генотип, ванадий, внешнесредовое загрязнение, взрослое население.

O.V. Dolgikh, K.G. Starkova, O.A. Kazakova, A.V. Krivtsov, E.A. Otavina, A.A. Mazunina □
PECULIARITIES OF IMMUNE REGULATION AND GENETIC POLYMORPHISM OF ADULT POPULATION LIVING IN THE CONDITIONS OF VANADIUM EXTERNAL EXPOSURE □ Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, 82, str. Monastyrskaya, Perm, 614045, Russia; Perm State National Research University, 15, str. Bukireva, Perm, 614990, Russia; Perm National Research Polytechnic University, 29, Komsomolskii Avenue, Perm, 614990, Russia.

We conducted the survey of the adult population ($n = 37$) at age of 33.82 ± 0.82 years, living in ecologically unfavorable conditions (influence zone of industrial emissions) of Chusovoy (Perm Territory). The comparison group included 25 people from the area with acceptable sanitary and hygienic indicators of atmospheric air quality. The average age of the comparison groups surveyed was 35.25 ± 1.24 years. The study of features of the immune status of the examined individuals exposed to the external effects of vanadium fine dust have been showed a decrease in phagocytosis, expression of the level of interleukin-10 and production of serum immunoglobulin A class (IgA). Both the odds ratio analysis and mathematical modeling showed a significant increase in the content of class G immunoglobulin (IgG) and class M immunoglobulin (IgM) ($R^2 = 0.67-0.70$, $p < 0.05$) with an increase of vanadium concentration in the blood. At the same time, the study of the metal content in the blood of the observed group as compared with the permissible level showed higher concentrations. We revealed the features of gene polymorphism associated with an increase in the prevalence of the minor homozygous genotype for the SULT1A1 and CYP1A1*3 genes – the immune regulation (MTHFR), detoxification and endothelial regulation (VEGFA) genes. The results of the analysis of twenty-nine polymorphic genes revealed the key genes of the male and female subgroups of the main group, which prevalence of polymorphisms was significantly different from that of the comparison group ($p < 0.05$). At the same time, the genotypes of working men of the main group were characterized by a significant predominance of the variant allele compared to the control group (HTR2A, MTHFR, CYP1A1, FAS, CPOX, TNF). The genotypes of working women were characterized by the dominance of such polymorphic genes as MTHFR, MMP, ANKK1, ZMPSTE, TNF.
Key words: immune regulation, genetic polymorphism, detoxification genes, homozygous genotype, vanadium, external environmental pollution, adult population.

Изменение условий среды обитания актуализирует необходимость исследования адаптационных возможностей и функциональных резервов регуляторных систем, в том числе механизмов и особенностей реа-

гирования иммунитета, а также индивидуальной генетической вариабельности, определяющей особенности индивидуальной устойчивости организма в условиях факторной экспозиции [1–3, 5–15].

Цель исследования – дать оценку особенностей иммунологических показателей и частоты полиморфизма генов у взрослого городского населения, проживающего в условиях аэрогенной экспозиции ванадием.

Материалы и методы. В процессе исследования выполнено обследование шестидесяти двух человек (г. Чусовой, Пермский край). В группу наблюдения ($n = 37$) были включены обследуемые, проживающие в экологически неблагоприятных условиях (зона влияния промышленных выбросов мелкодисперсной пыли, которая содержит ванадий). Средний возраст обследуемых составил ($33,8 \pm 0,8$) лет. В группу сравнения были включены люди из района с допустимыми санитарно-гигиеническими показателями качества атмосферного воздуха в количестве 25 человек, средний возраст обследуемых составил ($35,3 \pm 1,2$) лет. Группа наблюдения и группа сравнения были сопоставимы по возрасту, полу и соматическим болезням.

Анализ биосред на содержание металла выполняли в соответствии с МУК [4] при помощи масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Определение иммуноглобулинов различных классов (IgA, IgG и IgM) в сыворотке крови проводили при помощи реакции радиальной иммунодиффузии (реакция Манчини), исследование фагоцитарно активных клеток проводили с использованием формализированных эритроцитов барана в качестве объектов фагоцитоза. Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном. Методом ИФА (иммуноферментный анализ), который основан на специфическом связывании антитела с антигеном, определяли содержание IgE общего, интерлейкина-10, интерлейкина-17, фактора некроза опухолей, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Определяли изменение содержания специфических к поллютанту IgG в аллгосорбентном тесте с ферментной меткой (IgG к ванадию). Идентифицировали специфические реагены, используя конъюгированные с пероксидазой антитела.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием «Microsoft Office Excel 2010» и многофункционального программного обеспечения (Statistica 6.0). Данные обрабатывали методом вариационной статистики с расчетом среднего арифметического, его стандартной ошибки. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента, оценку зависимостей между признаками проводили, используя корреляционно-регрессионный анализ, критерий Фишера и коэффициент детерминации (R^2). При $p < 0,05$ различия между группами считались достоверными.

Полиморфизм исследуемых генов (SULT1A1 (rs9282861), CYP1A1*3 (rs4646421), MTHFR (rs1801133), VEGFA (rs2010963)) изучали методом Real-Time PCR (polymerase chain reaction) с анализом формы кинетической кривой. С его помощью можно обнаружить фрагменты ДНК путем выявления изменений меченных флуорофором олигонуклеотидных зондов на этапе денатурации и дальнейшего построения графика кинетической кривой. Генетический материал был получен со слизистой оболочки ротоглотки. Выделение ДНК прово-

дилось сорбентным методом. Обработка данных по генотипированию была проведена на основе диагностики однонуклеотидных полиморфизмов с использованием «Ген Эксперт».

Результаты исследования. При исследовании проб атмосферного воздуха на наблюдаемой территории обнаружилось присутствие мелкодисперсной пыли PM_{2,5} и PM₁₀, которая включала в себя ванадий. Однако превышения предельно допустимых концентраций (ПДК) зарегистрировано не было. Тем не менее содержание ванадия в крови обследуемой группы имело более высокую концентрацию относительно фонового допустимого уровня более чем в 3 раза: ($0,00043 \pm 0,00022$) мкг/см³ и ($0,00013 \pm 0,00012$) мкг/см³ соответственно.

Во время клинико-лабораторного обследования состояния здоровья населения были выявлены патологические изменения со стороны иммунной системы. Таким образом, при сравнении с физиологической нормой наблюдалось угнетение фагоцитарной активности в 43 и 60 % случаев по критериям «процент фагоцитоза» и «фагоцитарное число» соответственно ($p < 0,05$), различия достоверны по критерию кратности превышения нормы. Также отмечалось снижение параметров фагоцитоза относительно группы сравнения, однако различия достоверными не были.

Анализ сывороточных иммуноглобулинов показал повышенный уровень IgA у 76 % обследованных ($p < 0,05$), однако различий с группой сравнения обнаружено не было. Содержание IgG и IgM находилось в пределах нормы. Тем не менее математическое моделирование и анализ отношения шансов показал достоверное увеличение содержания IgG и IgM ($R^2 = 0,67-0,70$, $p < 0,05$) при повышении концентрации ванадия в крови.

Содержание специфических антител к ванадию в группе наблюдения составило ($0,62 \pm 1,10$) у.е., что в 1,7 раза выше относительно референтного интервала (референтный уровень $< 0,38$ у.е.) и аналогичного показателя группы сравнения ($0,058 \pm 0,048$ у.е.), однако достоверных различий выявить не удалось. Тем не менее показатель общей сенсibilизации обследованных находился в пределах физиологической нормы (содержание IgE общего составляет ($32,9 \pm 12,5$) МЕ/см³ при норме $< 150,0$ МЕ/см³). Также прослеживается тенденция к повышению показателей IgE общего и IgG к ванадию при увеличении концентрации ванадия в крови ($R^2 = 0,77-0,99$; $p < 0,05$).

Установлено, что содержание цитокиновых медиаторов оставалось на референтном уровне ($p < 0,05$), кроме интерлейкина-10, концентрация которого достоверно превысила показатели сравниваемой группы более чем в 2 раза. Так, повышенная концентрация ванадия в крови приводит к вероятности возрастания уровня VEGF, TNF, интерлейкина-17 ($R^2 = 0,77-0,97$, $p < 0,05$).

Был выполнен генетический анализ, который выявил изменение в распределении частот аллелей и генотипов у группы наблюдения по генам детоксикации, иммунной и эндотелиальной регуляции (табл. 1). Наблюдалось превышение частоты вариантного аллеля фермента

детоксикации сульфотрансминазы SULT1A1 в 1,3 раза, связанное с возрастанием распространенности гетерозиготного и мутантного гомозиготного генотипов. Установлено появление в обследуемой группе минорного генотипа по гену P450 CYP1A1*3 (цитохром), однако в группе контроля данный генотип отсутствовал. Также отмечается повышение частоты вариантного гомозиготного генотипа TT гена MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза) (18 % против 9 % у группы контроля) и генотипа CC гена VEGFA (сосудистый эндотелиальный фактор роста) в 1,7 раза, в то время как частота минорного аллеля VEGFA возросла в 2 раза относительно группы контроля за счет гомозиготного и гетерозиготного вариантов генотипа.

В табл. 1 представлены результаты анализа полиморфизма генов детоксикации, нервной и иммунной регуляции.

По результатам анализа двадцати девяти полиморфных генов были обнаружены ключевые гены женской и мужской подгрупп основной группы. Данная распространенность полиморфизмов подгрупп была достоверной относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

В генотипе женщин был отмечен повышенный полиморфизм следующих генов: метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), рецептор

дофамина (ANKK1), металлопротеиназа (MMP), цинк-металлопептидаза (ZMPSTE) и рецептор фактора некроза опухоли (TNF). Представленные гены отвечают за регуляцию иммунитета, детоксикацию, нервную и эндокринную регуляцию.

У мужчин основной группы наблюдалось достоверное доминирование вариантного аллеля относительно показателей группы контроля по таким полиморфизмам генов, как: метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), копропирогеноксидаза (CPOX), рецептор серотонина (HTR2A), цитохром (CYP1A1), рецепторы запуска процедуры апоптоза (FAS и TNF). Эти гены отвечают за детоксикацию, эндокринную и нервную регуляцию, энергетический и жировой обмен в организме.

По данным из табл. 2 и 3, где приведены результаты анализа SNP гена TNF-альфа между наблюдаемой группой («случаи») и группой сравнения («контроли»), выявлены достоверные различия между анализируемыми группами по генетическим маркерам апоптоза и иммунной регуляции, которые указывают на вероятность нарушений в иммунитете в условиях влияния промышленных выбросов. Данные различия можно описать как аддитивной, так и мультипликативной моделями.

Таблица 1. Особенности полиморфизма генов у городского населения в условиях аэрогенного воздействия ванадия

Table 1. Features of gene polymorphism in the urban population under the conditions of the aerogenic effects of vanadium

Ген (полиморфизм)	Генотип/аллель	Группа сравнения, %	Группа наблюдения, %
SULT1A1 (rs9282861)	GG	39	26
	GA	43	50
	AA	18	24
	G	61	51
	A	39	49
CYP1A1*3 (rs4646421)	CC	70	65
	CT	30	32
	TT	0	3
	C	85	81
	T	15	19
MTHFR (rs1801133)	CC	65	44
	CT	26	38
	TT	9	18
	C	78	63
	T	22	37
VEGFA (rs2010963)	GG	78	44
	GC	13	41
	CC	9	15
	G	85	65
	C	15	35

Таблица 2. SNP-различия гена TNF-альфа между группами наблюдения и сравнения (мультипликативная модель наследования – тест хи-квадрат, df = 1)

Table 2. SNP-differences of the TNF-alpha gene between the observation and comparison groups (multiplicative inheritance model – chi-square test, df = 1)

Аллели	Случаи	Контроли	χ^2	p	Коэффициент оценки шансов – OR	
	n = 29	n = 29			значения	95 % CI
Аллель G	0,816	0,970	14,51	0,0001	0,14	0,04–0,44
Аллель A	0,184	0,030			7,23	2,28–22,92

