

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 613.64: 616.717 – 057

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА У ЖЕНЩИН С УГРОЗОЙ НЕВЫНАШИВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЭРОГЕННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ ФЕНОЛАМИ

О.В. Долгих^{1, 2, 3}, А.В. Кривцов¹, О.А. Бубнова³, В.Б. Алексеев^{1, 3}

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

² ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»,
Россия, 614990, г. Пермь, Комсомольский проспект, д. 29,

³ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Проведенная оценка результатов генодиагностики выявила особенности генетического полиморфизма генов детоксикации и репродукции CYP1A1, CPOX, SULT1A1, ESR1. Установленные генетические особенности у женщин группы исследования представлены преимущественно мутациями генов, отвечающих за ферментсвязывающую активность детоксикации и характеризуются в основном гетерозиготными различиями. Представленные данные свидетельствуют о негативных генетических ассоциациях экспозиции фенолами с угрозой невынашивания.

Ключевые слова: фенолы, угроза невынашивания, гены детоксикации, ген рецептора эстрогена 1.

Состояние репродуктивного здоровья женщин детородного возраста является одним из наиболее социально значимых показателей, характеризующих здоровье общества, и во многом зависит от неблагоприятного воздействия факторов среды [3, 4, 5].

Актуальным является выделение маркерных генетических показателей, которые могут быть использованы в качестве критериев оценки состояния репродуктивной функции и характеризовать особенности невынашивания у женщин фер-

тильного возраста в измененных условиях среды обитания [3, 4].

Применение современных диагностических иммунологических и молекулярно-генетических технологий, в частности, точной цитометрии и ПЦР, позволяет провести объективную и достоверную оценку иммунного ответа и полиморфизма его генов у женщин с невынашиванием в условиях повышенной техногенной химической нагрузки. Анализ и использование в дальнейшем современных диагностических критериев расширяет доказательную базу по

© Долгих О.В., Кривцов А.В., Бубнова О.А., Алексеев В.Б., 2013

Долгих Олег Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики, профессор кафедры охраны окружающей среды, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности (e-mail: oleg@fcrisk.ru, тел.: 8 (342) 236-39-30).

Кривцов Александр Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики (e-mail: oleg@fcrisk.ru, тел.: 8 (342) 236-39-30).

Бубнова Ольга Алексеевна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики (e-mail: oleg@fcrisk.ru, тел.: 8 (342) 236-39-30).

Алексеев Вадим Борисович – доктор медицинских наук, заместитель директора, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности (e-mail: root@fcrisk.ru, тел.: 8 (342) 237-25-34).

выявлению причинно-следственных связей патологических и преморбидных состояний, обусловленных воздействием химических факторов среды обитания [2–4, 6].

Цель исследования – оценка особенностей однонуклеотидных полиморфизмов у женщин с угрозой невынашивания в условиях хронической аэрогенной экспозиции фенолами.

Материалы и методы. Выполнено иммунологическое диагностическое обследование женщин с угрозой прерывания беременности, проживающих в г. Перми: из них 22 женщины (группа наблюдения) находились в зоне воздействия химической нагрузки, 24 – вне зоны воздействия (группа сравнения).

Забор материала для ПЦР проводился методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Затем выделяли ДНК с помощью сорбентного метода, в основе которого лежит разрушение клеток с дальнейшей сорбцией нуклеиновых кислот на сорбент.

Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику ПЦР, основанную на реакции амплификации и детекции продуктов этой реакции в режиме реального времени с помощью флюоресцентных меток, которыми предварительно помечают используемые для реакции амплификации праймеры. Для одновременной детекции нескольких продуктов реакции применяют разные флюоресцентные метки и зонды (мультиплексная ПЦР). В качестве праймеров использовали участок ДНК генов CYP1A1, CPOX, SULT1A1, ESR1. Для определения генотипа человека применялся метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров.

Маркером экспозиции был уровень содержания в крови химических веществ, обладающих репротоксичностью (фенолы). Определение органических соединений (мг/л) выполнялось в соответствии с МУК 4.1.2102-4.1.2116-06 на газовом хроматографе [7].

Для статистической обработки результатов исследования применялись современные методы математической статистики (параметрический критерий Стьюдента с учётом нормального распределения переменных в сравниваемых группах; коэффициент корреляции Спирмена). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [1].

Результаты и их обсуждение. Исследования качества атмосферного воздуха были проведены на содержание 15 соединений (фенола, крезолов, формальдегида, бенз(а)пирена, мелкодисперсной фракции пыли PM_{2,5} и PM₁₀, хрома, никеля, марганца и его соединений, свинца, ванадия пятиоксида, меди оксида, оксида кремния). Однако приоритет при анализе был отдан фенолу и крезолом как веществам, специфическим для данного промышленно узла, постоянно присутствующим в атмосферном воздухе и относящимся к репротоксикантам.

Результаты натурных исследований качества атмосферного воздуха позволили установить наличие превышений разовых и среднесуточных гигиенических нормативов в атмосфере: по фенолу – до 2,3 ПДК_{сс}; по п-, м-крезолу – до 2,0 ПДК_{сс}, до 7,4 ПДК_{мр}; по о-крезолу – до 2,0 ПДК_{мр}.

В результате проведенного химико-аналитического анализа содержания загрязнителей в крови женщин группы наблюдения установлено достоверное превышение регионального фонового уровня трикрезола, содержание крезолов отличалось от фоновой концентрации, соответствующей нулевому значению (табл. 1).

Обнаружено достоверное повышение содержания о-крезола и п-, м-крезола в 3,2 и 2,6 раза соответственно в крови женщин, проживающих в условиях внешнесредового воздействия фенолов, по отношению к группе сравнения.

Результаты генетического анализа ДНК и выявленные нарушения представлены в табл. 2. Полиморфизм генов детоксикации и репродукции CYP1A1, CPOX, SULT1A1, ESR1 (гены цитохрома и копропорфириногенаксидазы) характеризует основные раз-

Таблица 1

Содержание трикрезола в крови женщин с угрозой невынашивания ($n = 46$), мкг/см³

Показатель	Основная группа ($n=22$)	Группа сравнения ($n=24$)	Фоновые концентрации	Кратность различий с группой сравнения
П,-м-крезол	0,0097±0,0030*	0,0038±0,004	0	2,6
О-крезол	0,0165±0,005*	0,0052±0,0039	0	3,2

Примечание: * – достоверные различия с группой сравнения и фоном ($p<0,05$).

Таблица 2

Распределение частот генов у женщин с угрозой невынашивания

Ген (ОНП)	Генотип/ аллель	Основная группа, %	Группа сравнения, %
Цитохром Р-450 (CYP1A1)	GG	68,2	82,4
	AG	4,5	5,9
	AA	27,3*	11,8
	G	70	89
	A	30*	11/10
Копропорфириногенокси- даза (CPOX)	GG	54,5	78,3
	AG	40,9*	21,7
	AA	4,5	0
	G	75	89
	A	25*	11/15
Сульфотрансминаза (SULT1A1)	GG	27,3	34,8
	AG	54,5*	39,1
	AA	18,2	26,1
	G	54,5	54
	A	45,5	46/31
Эстрогеновый рецептор (ESR1)	GG	73,7	75
	AG	26,3	25
	AA	0	0
	G	87	87,5
	A	13	12,5/10

Примечание: * – достоверные различия с группой сравнения ($p<0,05$).

личия между двумя группами женщин. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 у основной группы в 2,5 раза достоверно ($p<0,05$) превышает аналогичную в группе сравнения.

Установлено негативное распределение частот генов детоксикации (CYP1A1, CPOX, SULT1A1), характеризующееся достоверно повышенной по отношению к данным группы сравнения ($p<0,05$) распространенностью гетерозиготного варианта генов CPOX, SULT1A1 – в 2,0 и 1,5 раза соответственно (см. табл. 1). Выявленные ассоциации усугубляются тем, что у женщин, находящихся в зоне экспозиции фенолами, повышена частота минорной гомозиготы гена CYP1A1

(в 2,5 раза), а также гетерозиготы генов CPOX, SULT1A1, что указывает на наличие негативной генетической вариабельности с предрасположенностью к онкологическим заболеваниям. Ген SULT1A1 (термостабильная фенолсульфотрансфераза), который катализирует не только конъюгацию с сульфатом фенола, нитрофенола и другими простыми производными фенола, но и метаболизм эстрогенов, имеет достоверно высокий полиморфизм, превышающий цитируемый.

По результатам генетического обследования можно сделать вывод, что в группе женщин, проживающих вне зоны риска, иммунологическая толерантность к вынашиванию плода развивается по стандартным

канонам развития интрагенитальной патологии. В то же время изменения и особенности генетического полиморфизма и формирования патологии у женщин, проживающих в зоне экспозиции, указывают на наличие дополнительных факторов, которые приводят к аналогичному результату – невынашиванию беременности, но детерминированной генетической поломкой ферментов детоксикации фенолов. Установлены генетические особенности у женщин основной группы, характеризующиеся мутациями генов, отвечающих за ферментредуцирующую и ферментсвязывающую активность детоксикации – цитохрома, копропорфириногенаксидазы, сульфотрансминазы.

Выводы. Таким образом, оценка результатов анализа полиморфизма генов выявила особенности генетического полиморфизма генов детоксикации CYP1A1, CYP2D6, SULT1A1 и гена эстрогенового рецептора а также их ассоциацию с контаминацией биосред фенолами. Представленные данные свидетельствуют о негативных иммуногенетических ассоциациях экспозиции фенолами с угрозой невынашивания. Маркирование чувствительных генетических показателей послужит основой создания критериев комплексной оценки формирования экстра- и интрагенитальной патологии в условиях воздействия фенола и его производных о-, м- и п-крезолов.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / под ред. Н.Е. Бузикашвили и соавт. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Зайцева Н.В., Устинова О.Ю., Аминова А.И. Гигиенические аспекты нарушения здоровья детей при воздействии химических факторов среды обитания. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 489 с.
3. Иммуные и ДНК-маркеры воздействия техногенной нагрузки / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Р.А. Харахорина, Д.В. Ланин // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 240–241.
4. Куценко С.А. Основы токсикологии. – СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2002. – 395 с.
5. Ланин Д.В. Анализ корегуляции иммунной и нейроэндокринной систем в условиях воздействия факторов риска // Анализ риска здоровью. – 2013. – № 1. – С. 73–81.
6. Рахманин Ю.А., Новиков С.М., Иванов С.И. Современные научные проблемы совершенствования методологии оценки риска здоровью населения // Гигиена и санитария. – 2005. – № 2. – С. 3–8.
7. Сборник методик по определению химических соединений в биологических средах / МУК МЗ РФ № 763-99-4.1.779-99. – М., 1999.

References

1. Glanc S. Mediko-biologicheskaja statistika [Biomedical statistics]. Ed. N.E. Buzikashvili i soavt. Moscow: Praktika, 1998. 459 p.
2. Zajceva N.V., Ustinova O.Ju., Aminova A.I. Gigenicheskie aspekty narushenija zdorov'ja detej pri vozdejstvii himicheskikh faktorov sredy obitaniya [Environmental health aspects of medical disorders in children exposed to environmental chemical factors]. Perm': Knizhnyj format, 2011. 489 p.
3. Dolgih O.V., Krivcov A.V., Harahorina R.A., Lanin D.V. Immunnye i DNK-markery vozdejstvija tehnogennoj nagruzki [Immune and DNA markers of technogenic exposure]. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki*, Moscow, 2012, no. 4, pp. 240–241.
4. Kucenko S.A. Osnovy toksikologii [Basics of toxicology]. – SPb.: Voenno-medicinskaja akademija im. S.M. Kirova, 2002. 395 p.
5. Lanin D.V. Analiz koreguljacji immunnoj i nejroendokrinnoj sistem v uslovijah vozdejstvija faktorov riska [The analysis of the co-regulation between the immune and neuroendocrine systems under exposure to risk factors]. *Analiz riska zdorov'ju*, 2013, no. 1, pp. 73–81.
6. Rahmanin Ju.A., Novikov S.M., Ivanov S.I. Sovremennye nauchnye problemy sovershenstvovaniya metodologii ocenki riska zdorov'ju naselenija [Current scientific issues of improving the health risk assessment methodology]. *Gigiena i sanitarija*, 2005, no. 2, pp. 3–8.
7. Sbornik metodik po opredeleniju himicheskikh soedinenij v biologicheskikh sredah. MUK MZ RF № 763-99-4.1.779-99 [A digest of methods for the determination of chemical compounds in biological media. Methodical guidelines of the Russian Federation Ministry of Health no. 763-99-4.1.779-99]. Moscow, 1999.

CHARACTERISTICS OF GENE POLYMORPHISM IN WOMEN WITH A THREAT OF MISCARRIAGE AND AIRBORNE EXPOSURE TO PHENOLS

O.V. Dolgikh^{1,2,3}, A.V. Krivtsov¹, O.A. Bubnova³, V.B. Alexeyev^{1,3}

¹FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies», Russian Federation, Perm, 82 Monastyrskaya St., 614045,

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education «Perm National Research Polytechnic University», Russian Federation, Perm, 29 Komsomolskiy Ave, 614990,

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education «Perm State National Research University», Russian Federation, Perm, 15 Bukireva St., 614990

The performed assessment of the results of gene diagnostics revealed characteristics of gene polymorphism of detoxification genes and of CYP1A1, CPOX, SULT1A1 and ESR1 reproduction. The determined genetic characteristics include mostly mutations of genes responsible for enzyme detoxification and are defined mainly by differences in the frequency of heterozygotes. The presented data suggest an association between genes and a threat of miscarriage under exposure to phenols.

Key words: phenols, threat of miscarriage, detoxification genes, estrogen receptor 1 gene.

© Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Alexeyev V.B., 2013

Dolgikh Oleg Vladimirovich – Professor, DSc in Medicine, Head of the Department of Immunobiological Diagnostics (e-mail: oleg@fcrisk.ru, tel.: 8 (342) 236-39-30).

Krivtsov Alexandr Vladimirovich – PhD in Medicine, Head of the Immunogenetics Laboratory (e-mail: oleg@fcrisk.ru, tel.: 8 (342) 236-39-30).

Bubnova Olga Alexeyevna – PhD in Medicine, Junior Researcher, the Immunogenetics Laboratory (e-mail: oleg@fcrisk.ru, tel.: 8 (342) 236-39-30).

Alexeyev Vadim Borisovich – DSc in Medicine, Deputy Director for Organizational and Methodical Work (e-mail: vadim@fcrisk.ru, tel.: +7 (342) 237-25-34).