

ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИМОРФНЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПРОФИЛЕМ, У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАЕМ БЕРЕМЕННОСТИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ ГИДРОКСИБЕНЗОЛАМИ

Казакова О.А., Долгих О.В.

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

Резюме. Исследование проводилось на примере промышленного региона города Перми, где за счет пылегазовых выбросов предприятия цветной металлургии формируется избыточное содержание гидроксибензола, превышающее среднесуточные и максимально разовые предельно допустимые концентрации. Гидроксибензол и его производные являются гормоноподобными веществами и представляют угрозу для репродуктивной системы женщин. Цель исследования – проанализировать вариабельность иммунного статуса модифицированного полиморфным генетическим профилем женщин с невынашиванием беременности в условиях экспозиции гидроксибензолом.

Химический анализ качества атмосферного воздуха оценивался согласно МУК 4.1.617-96. За пятилетний период исследования собрана выборка из 129 женщин фертильного возраста с репродуктивными. Оценка уровня гидроксибензола в крови проведена методом газовой хроматографии с индуктивно связанной плазмой. Группа «Наблюдение 1» – женщины с наличием репродуктивной патологии и уровнем фенола в крови более референтного ($> 0,016$ мг/см³), «Наблюдение 2» женщины с наличием репродуктивной патологии и уровнем фенола в диапазоне нормы, «Контроль 1» – условно здоровые с уровнем фенола более $0,016$ мг/см³, «Контроль 2» – условно здоровые с содержанием фенола в крови в диапазоне нормы. Содержание сывороточного серотонина, как маркера катехоламиновой регуляции, оценивалось методом ИФА, IgG, специфического к фенолу – методом модифицированным конкурентным ИФА. Изучение полиморфизма гена *ACTN3* rs1815739, ассоциированного с катехоламиновым обменом, проведено методом ПЦР.

Установлено, что половина обследованных женщин живет в условиях экспозиции фенола и крезолов $> 1,0$ ПДК с. с. и м. р. Заболеваемость женского населения эндометриозом, процессом, участвующим в формировании невынашивания, в исследуемом районе за пятилетний период имела тенденцию к увеличению. По результатам химического анализа крови установлено, что все обследованные пациенты, но в различной степени, контаминированы фенолом. Регрессионный анализ установил значимую зависимость IgG специфического к фенолу от уровня фенола в крови, а также достоверную

Адрес для переписки:

Казакова Ольга Алексеевна
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (922) 646-56-87.
E-mail: chakina2011@yandex.ru

Address for correspondence:

Kazakova Olga A.
Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies
614045, Russian Federation, Perm, Monastyrskaya str., 82.
Phone: 7 (922) 646-56-87.
E-mail: chakina2011@yandex.ru

Образец цитирования:

О.А. Казакова, О.В. Долгих «Оценка вариабельности иммунного статуса, модифицированного полиморфным генетическим профилем, у женщин с невынашиваем беременностями в условиях экспозиции гидроксибензолами» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 1. С. 91-100.
doi: 10.46235/1028-7221-244-AVO

© Казакова О.А., Долгих О.В., 2021

For citation:

O.A. Kazakova, O.V. Dolgikh "Variability study of immune status modified by polymorphic genetic profile in women with pregnancy loss under hydroxybenzene exposure", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 91-100.
doi: 10.46235/1028-7221-244-AVO

DOI: 10.46235/1028-7221-244-AVO

зависимость содержания серотонина от уровня крезолов ($p < 0,05$). Тест Краскела–Уоллиса определил значимые различия между группами по уровню серотонина. Между группами «Наблюдение 1» и «Наблюдение 2» обнаружены значимые различия в уровнях серотонина (с учетом поправки Бонферрони, где $p < 0,0083$). Оценка частот генотипов гена *ACTN3* rs1815739 с использованием мультипликативной модели позволила отнести Т-аллель к факторам, формирующим вероятность репродуктивных потерь, запускаемых избыточной контаминацией биосред фенолом. Кросс-классификационный анализ определил наличие причинно-следственной взаимосвязи между уровнем серотонина и генотипами гена *ACTN3* rs1815739.

Ключевые слова: аэрогенная экспозиция, гидроксibenзол, репродукция, ген *ACTN*, медиаторы, серотонин

VARIABILITY STUDY OF IMMUNE STATUS MODIFIED BY POLYMORPHIC GENETIC PROFILE IN WOMEN WITH PREGNANCY LOSS UNDER HYDROXYBENZENE EXPOSURE

Kazakova O.A., Dolgikh O.V.

Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Abstract. The study was performed in Perm, an industrially developed Russian city where hydroxybenzene concentrations are excessive due to dust and gaseous emissions from non-ferrous metallurgic plants. Their concentrations exceed average daily and single maximally permissible amounts. Hydroxybenzene and its derivatives are hormone-like substances, thus being hazardous to female reproductive system. The goal of our study was to analyze variability of immune state influenced by polymorphic genetic profile of women with pregnancy loss under hydroxybenzene exposure. Chemical analysis of ambient air quality was performed according to MG 4.1.617-96 regulations. Biological samples were taken from 129 women with reproductive disorders at their fertile age during the five-year observation period. Hydroxybenzene contents in blood were detected with gas chromatography with inductively coupled plasma. The test group 1 included women with reproductive disorders and phenol contents in blood exceeding the reference level ($> 0.016 \text{ mg/cm}^3$). Test group 2 consisted of women with reproductive disorders and phenol contents in blood within standard ranges. The control group 1 consisted of conditionally healthy women with phenol contents in their blood being higher than 0.016 mg/cm^3 . Control group 2 included conditionally healthy women with phenol contents in their blood corresponding to the standard values. Serotonin content in blood serum considered catecholamine regulation marker was estimated with ELISA technique; phenol-specific IgG contents were measured by means of modified competitive ELISA method. PCR technique was used for detection of *ACTN3* rs1815739 gene polymorphism associated with catecholamine metabolism. We found that a half of the total study group were exposed to phenol and cresols at concentrations > 1.0 MPC average daily and single maximal dose. Incidence of endometriosis among them tended to increase over the examined 5-year period. This disorder is known to contribute to pregnancy loss. Chemical analysis of blood allowed us to reveal phenol contamination in all the women to varying degrees. Regression analysis allowed to reveal a significant dependence between phenol contents in blood and phenol-specific IgG, as well as significant correlation between blood serotonin contents and cresols concentrations ($p < 0.05$). Kruskal–Wallis test revealed significant intergroup differences by serotonin levels. There were significant differences between the test groups 1 and 2 by serotonin contents (at $p < 0.0083$ with Bonferroni correction). Frequencies of *ACTN3* rs1815739 genotypes, using a multiplicative model, allowed us to assign T allele to the factors contributing to risk of reproductive losses induced by biological media contaminated with phenol in excess. Cross-classification analysis revealed a causal relationship between serotonin contents and *ACTN3* rs1815739 genotype.

Keywords: aerogenic exposure, hydroxybenzene, reproduction, *ACTN* gene, mediators, serotonin

Введение

Состояние объектов окружающей среды современного города, характеризуется повышенным загрязнением наиболее распространенных экотоксикантов, таких как: оксид углерода, диоксид серы, аммиак, формальдегид, фенол, диоксид азота, взвешенные вещества, дигидросульфид, гидрохлорид и др. Источниками поступления экзогенных гаптенных являются как производственные предприятия, находящиеся в черте города, так и автотранспорт [1, 2, 5, 10].

Территория города Перми является зоной повышенного потенциала загрязнения атмосферного воздуха, что определяется особенностями расположения города, метеорологическими условиями, связанными с частыми застойными явлениями, штилями и инверсиями. Исследуемая территория города, где проживает около 115 тыс. человек, характеризуется присутствием в атмосферном воздухе специфических компонентов выбросов, наличие которых в воздухе селитебных зон недопустимо. К таким специфическим загрязняющим веществам относятся производные фенола (гидроксибензола) – крезолы (N CAS: 1319-77-3). Несмотря на их быструю биodeградацию в объектах окружающей среды в течение 1-2 дней, крезолы в высоких концентрациях способны оказывать раздражающий эффект носоглотки, а при длительном воздействии вызывает головные боли, рвоту, повышение артериального давления [14, 15]. Исследуемая территория, прилегающая к промышленному узлу, полностью перекрывается зоной рассеивания фенола > 1 ПДК (N CAS: 108-95-2). Гидроксибензол (фенол) – токсичное химическое соединения 2-го класса опасности и отличается как экзогенным, так и эндогенным происхождением. В организме фенол образуется в кишечнике в результате деятельности бактерий, но при этом концентрация такого фенола в крови не превышает референтный уровень и не оказывает негативного эффекта на системы организма. Гидроксибензол антропогенного происхождения, оказывает раздражающее действие на органы дыхания, а при проникновении в организм образует комплексы с кислородом, азотом, серосодержащими фрагментами аминокислот, белками и гормонами, выполняя функцию лиганда [16, 17]. За свою способность связываться с гормонами, фенолы получили название «гормоноподобные ксенобиотики». Влияние таких гормоноподобных веществ на репродуктивную функцию женщин характеризуется многообразием проявлений, что связано с полиморфностью механизмов регуляции в осуществлении репродуктивной функции, четкой цикличностью процесса и вовлеченностью звеньев «гипоталамус-гипофиз-яичники» [11, 12, 13, 18].

На сегодняшний день нет четких данных, подтверждающих негативные эффекты гормоноподобных ксенобиотиков – гидроксибензолов на репродуктивную функцию [17]. Однако репродуктивные исследования на экспериментальных животных не способны отобразить картину воздействия гидроксибензолов в силу короткого репродуктивного периода (21 день у белых крыс), поскольку для фенолов характерен отложенный эффект воздействия. На сегодня актуальны исследования на культурах клеток с использованием критических технологий (геномно-транскриптомный анализ, идентификация рецепторных, лигандных и внутриклеточных белков) по изучению механизма воздействия гидроксибензолов на репродуктивную функцию, в том числе через оценку влияния гидроксибензолов на медиаторы иммунной, нервной, эндокринной регуляции, ассоциированного с генетическим полиморфизмом кандидатных генов [3].

Таким образом, идентификация маркеров эффекта гидроксибензолов (регуляторных медиаторов) и маркеров чувствительности (полиморфность причинных генов) репродуктивной функции является весьма актуальной на сегодняшний день, требует разработки индикаторных показателей невынашивания беременности у женщин, экспонированных гидроксибензолами [3, 9].

Цель исследования – оценить вариабельность иммунного статуса, модифицированного полиморфным генетическим профилем, у женщин с невынашиванием беременности в условиях экспозиции гидроксибензолами.

Материалы и методы

Произведена оценка качества атмосферного воздуха исследуемой территории (Орджоникидзевский район) по материалам мониторинговых наблюдений Роспотребнадзора по Пермскому краю и натурным исследованиям ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» за период 2011-2012 годов. Максимально разовые и среднесуточные ПДК определены согласно ГН 2.1.6.3492-17 (от 31 мая 2018 г.).

Химический анализ атмосферного воздуха на содержание гидроксибензолов (фенолов и крезолов) проведен в отделе Химико-аналитических методов исследования ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» согласно МУК 4.1.617-96. Оценка уровня загрязнения атмосферного воздуха относительно ПДК выполнена согласно Р 2.1.10.1920-04.

Отобраны 324 усредненные пробы атмосферного воздуха по определению концентрации фенола, орто- и пара-крезола. Произведен расчет рассеивания фенола и крезолов при использовании УПРЗА «Эколог» 4.5, визуализация расчетов выполнена в программе ARC/View 3.2 в отделе

Системных методов санитарно-гигиенического анализа и мониторинга ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН».

За период с 2013 по 2017 год сформирована выборка женщин в количестве 129 человек, репродуктивно возраста (18–42 года), постоянно проживающих на территории исследуемого района. В выборку были включены как женщины, имеющие в анамнезе репродуктивные нарушения, проявляющиеся в невынашивании беременности, так и относительно здоровые женщины.

Для всех исследуемых пациентов проведен анализ биосред на содержание фенола и крезолов в отделе химико-аналитических методов исследования ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», методом газовой хроматографии с индуктивно связанной плазмой, согласно МУК 4.1.2.108-96, региональные фоновые уровни определены согласно МР 2.1.9.100-10.

Проведена оценка уровня заболеваемости населения города и исследуемого района по основным классам болезней, а также уровня заболеваемости женского населения по болезням репродуктивной сферы.

По результатам проведения химического анализа крови полученная выборка исследуемых женщин была распределена на четыре группы. Группа «Наблюдение 1» – 55 женщин, имеющих репродуктивные нарушения (имеются сопутствующие патологии – миома матки и эндометриоз) и уровень гидроксибензола (фенола) выше референтного диапазона $> 0,016$ мг/см³, группа «Наблюдение 2» – 57 женщин, имеющих репродуктивные нарушения и уровень фенола в крови в диапазоне нормы 0–0,016 мг/см³, группа «Контроль 1» – 10 условно здоровых женщин без репродуктивных нарушений и уровнем фенола выше референтного диапазона $> 0,016$ мг/см³, Группа «Контроль 2» – 7 условно здоровых женщин без репродуктивных нарушений и уровнем фенола в норме 0–0,016 мг/см³. К репродуктивным нарушениям (невынашивание беременности) были отнесены: самопроизвольный аборт, аборт в ходу, замершая беременность, несостоявшийся выкидыш, неразвивающаяся беременность. Все группы были сопоставимы по возрасту, материальному положению, этническому составу.

При оценке воздействия гидроксибензолов на системы организма, для всех исследуемых женщин были получены иммунологические и генетические показатели, являющиеся индикаторными для развития невынашивания беременности в условиях воздействия экзогенными фенолами.

Определялся уровень сывороточного серотонина в крови исследуемых групп методом иммуноферментного анализа крови на приборе ELx808IU, с использованием комплекта реаген-

тов компании «Вектор-Бест», а также определялся уровень специфической чувствительности IgG к фенолу, с помощью метода модифицированного конкурентного иммуноферментного анализа на приборе ELx808 согласно МР 111-14/55-04-02.

Для всех исследуемых пациентов был определен генетический полиморфизм гена кандидата – актинаина *ACTN3* rs1815739, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе BioRAD CFX96, с использованием комплекта реагентов по определению полиморфизма гена компании «Синтол», согласно МР 4.2.00.75-13.

Статистический анализ данных осуществлялся при использовании пакета программ Statistica 10.0, онлайн-программы SNPstats. Полученные данные представлены в виде: X – среднее, SE – стандартная ошибка. Распределение показателей в выборках оценивалось на нормальность согласно критерию W Шапиро–Уилка (ГОСТ Р ИСО 5479-2002), использовались параметрические (t-критерий Стьюдента) и не параметрические методы исследования (U Манна–Уитни, H Краскела–Уоллиса), использовалась поправка Бонферрони на множественные сравнения, устанавливающая уровень значимости $p = 0,0085$ ($p = 1 - 0,95^{(1/n)}$, где n – число парных сравнений), позволяющая исключить совершение ошибки первого рода (ГОСТ Р 50779.10-2000). Для оценки взаимосвязи фенола и IgG, специфического к фенолу, использовался регрессионный анализ.

Исследуемый генетический полиморфизм оценивался на соответствие выполнению закона Харди–Вайнберга, для оценки влияния наличия вариантного аллеля на развитие неблагоприятных исходов использовалась мультипликативная модель наследования с определением: χ^2 – критерия хи-квадрат, OR – оценки шансов и CI – доверительным интервалом. Для поиска ассоциаций генотипа и уровня иммунологического показателя использовался кросс-классификационный анализ в программе SNPstats, разработанный Каталонским институтом онкологии.

Результаты

По результатам оценки качества атмосферного воздуха согласно ГН 2.1.6.1338-003, установлено, что с января 2015 года среднесуточная ПДК по фенолу была ослаблена в 2 раза с 0,003 до 0,006 мг/м³, что отразилось на графике рассеивания гидроксибензолов, когда под аэрогенным воздействием оказывается около 50% исследуемых лиц, проживающих на исследуемой территории в условиях экпозиции от 1,0 ПДК с. с. и м. р., (тогда как ранее около 100%).

По результатам натуральных исследований, проводимых ФБУН «ФНЦ МПТУРЗН» с использованием химико-аналитических методов исследования, установлено: 13 случаев превышения 1,0 ПДК с. с. и 6 > 1,0 ПДК м. р. по гидроксibenзола (фенолу, крезолам) до 9,2 раза.

По результатам оценки заболеваемости населения по основным классам болезней относительно городского уровня, установлено, что за период с 2013 по 2018 год заболеваемость населения исследуемого района имела наибольшую частоту по классу заболеваний органов дыхания в масштабах города Перми. На втором месте по частоте заболеваемости в районе являются заболевания системы кровообращения; на третьем – заболевания мочеполовой системы, при этом их распространенность превышает городской уровень.

При исследовании заболеваемости женского населения «репродуктивной патологией», проживающего на исследуемой территории, за пе-

риод с 2013 по 2017 год установлено, что частота распространенности эндометриоза имела тенденцию к увеличению, при этом не превышала общегородской фон, а в 2018 году исследуемый район занимает первый ранг по распространению эндометриоза среди других территорий города. Частота распространения расстройств цикла за исследуемый период превышала таковую по городу, а в 2018 исследуемая территория заняла третье место среди районов. Распространенность женского бесплодия для исследуемого района за период с 2013 по 2017 год имела тенденцию к увеличению, при этом удерживая второй ранг среди семи районов в 2018 году.

По результатам химико-аналитического исследования биосред пациентов, установлено наличие гидроксibenзолов – фенолов и крезолов – специфичных для аэрогенной экспозиции на исследуемой территории. При распределении пациентов по группам исследования, по принципу превышения и не превышения референтно-

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ГИДРОКСИБЕНЗОЛА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. RESULTS OF COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONTENT OF HYDROXYBENZENE IN THE BLOOD OF PATIENTS

Показатель Indicator	Референтный диапазон, мг/см ³ Reference range, mg/cm ³	Наблюдение 1 Observation 1	Наблюдение 2 Observation 2
Фенол Phenol	0-0,016	0,070±0,008	0,0049±0,000
Показатель Indicator	Референтный диапазон, мг/см ³ Reference range, mg/cm ³	Контроль 1 Control 1	Контроль 2 Control 2
Фенол Phenol	0-0,016	0,045±0,009	0,012±0,001

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ПАРА- И ОРТО-КРЕЗОЛОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 2. RESULTS OF COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONTENT OF PARA- AND ORTHO-CRESOLS IN THE BLOOD OF PATIENTS

Показатель Indicator	Референтный диапазон, мг/см ³ Reference range, mg/cm ³	Наблюдение 1 Observation 1	Наблюдение 2 Observation 2
Орто-крезол Orto-cresol	0	0,13±0,03*	0,04±0,01*
Пара-крезол Para-cresol	0-0,034	0,16±0,05*	0,08±0,03*
Показатель Indicator	Референтный диапазон, мг/см ³ Reference range, mg/cm ³	Контроль 1 Control 1	Контроль 2 Control 2
Орто-крезол Orto-cresol	0	0,19±0,08*	0,05±0,01
Пара-крезол Para-cresol	0-0,034	0,11±0,05*	0,01±0,00

Примечание. * – соответствует нормальному распределению по критерию Шапиро–Уилка.

Note. *, corresponds to the normal distribution according to the Shapiro–Wilk criterion.

го диапазона фенола были получены значимые различия по показателям орто- и пара-крезолов между группами. Так, было установлено, что даже при уровне фенола в пределах нормы существует превышение уровня орто- и пара-крезолов во всех исследуемых группах, что свидетельствует в пользу того, что все проживающие на исследуемой территории находятся под воздействием специфичных выбросов производственных предприятий (табл. 1, 2).

Для оценки наличия ассоциаций гидроксibenзолов – фенола и крезолов с исследуемыми иммунологическими маркерами, был использован регрессионный анализ, который позволил установить наличие прямо пропорциональной модели зависимости специфического IgG к фенолу от уровня фенола в крови и аналогичной модели зависимости серотонина от концентраций орто- и пара-крезолов в крови пациентов (табл. 3, 4).

ТАБЛИЦА 3. РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ. МОДЕЛЬ ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgG ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ГИДРОКСИБЕНЗОЛА В КРОВИ

TABLE 3. REGRESSION ANALYSIS. MODEL OF THE DEPENDENCE OF THE SPECIFIC IgG LEVEL ON THE CONCENTRATION OF HYDROXYBENZENE IN THE BLOOD

Экспозиция Exposure	Эффект Effect	b0	b1	R2	r	N	p
Фенол Phenol	IgG, спец. к фенолу IgG specific to phenol	0,2852	1,1704	0,0475	0,2179	94	0,0348

ТАБЛИЦА 4. РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ. МОДЕЛЬ ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЯ СЕРОТОНИНА ОТ УРОВНЯ ОРТО- И ПАРА-КРЕЗОЛОВ В КРОВИ

TABLE 4. REGRESSION ANALYSIS. MODEL OF THE DEPENDENCE OF SEROTONIN LEVEL ON THE LEVEL OF ORTHO- AND PARA-CRESOLS IN THE BLOOD

Экспозиция Exposure	Эффект Effect	b0	b1	R2	r	N	p
О-крезол O-cresol	Серотонин Serotonin	274,3016	538,5	0,1307	0,3615	88	0,0008
П-крезол P-cresol	Серотонин Serotonin	239,376	122,38	0,0374	0,1933	88	0,0709

ТАБЛИЦА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНО-НЕЙРОРЕГУЛЯТОРНОГО ПРОФИЛЯ В ГРУППАХ НАБЛЮДЕНИЯ И КОНТРОЛЯ

TABLE 5. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE IMMUNO-NEUROREGULATORY PROFILE IN THE OBSERVATION AND CONTROL GROUPS

Показатель Indicator	Референтный диапазон Reference range	Наблюдение 1 Observation 1	Наблюдение 2 Observation 2
Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	80-450	120,38±15,52*	289,51±32,77*
IgG, спец. к фенолу, у. е. IgG specific to phenol, с. u.	0-0,13	0,17±0,04*	0,29±0,05*
Показатель Indicator	Референтный диапазон Reference range	Контроль 1 Control 1	Контроль 2 Control 2
Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	80-450	88,28±6,22	245,38±34,59
IgG, спец. к фенолу, у. е. IgG specific to phenol, с. u.	0-0,13	–	–

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 6. ПАРАМЕТРЫ ТЕСТА КРАСКЕЛА–УОЛЛИСА ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ СЕРОТОНИНА В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ («НАБЛЮДЕНИЕ 1», «НАБЛЮДЕНИЕ 2»)

TABLE 6. PARAMETERS OF THE KRUSKAL–WALLIS TEST FOR COMPARATIVE EVALUATION OF SEROTONIN CONTENT IN THE STUDY GROUPS (“OBSERVATION 1”, “OBSERVATION 2”)

df	N	H	p
3	106	22,13	0,0001

ТАБЛИЦА 7. ПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ И НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ РАЗЛИЧИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕЖДУ ИССЛЕДУЕМЫМИ ГРУППАМИ

TABLE 7. PARAMETRIC AND NONPARAMETRIC MODELS FOR INVESTIGATING DIFFERENCES IN IMMUNOLOGICAL PARAMETERS BETWEEN THE STUDY GROUPS

Наблюдение 1 / Наблюдение 2 Observation 1 / Observation 2						
Показатель Indicator	df	t	p	U	Z	p
Серотонин Serotonin	95	4,66	0,0000**	585,00	4,26	0,0000**
IgG, спец. к фенолу IgG specific to phenol	92	1,94	0,0558	861,00	1,79	0,0739
Контроль 1 / Контроль 2 Control 1 / Control 2						
	df	t	p	U	Z	p
Серотонин Serotonin	7	4,47	0,0029	0,00	2,45	0,0143*
Наблюдение 1 / Контроль 1 Observation 1 / Control 1						
	df	t	p	U	Z	p
Серотонин Serotonin	51	1,92	0,0605	119,00	-0,03	0,9757
Наблюдение 2 / Контроль 2 Observation 2 / Control 2)						
	df	t	p	U	Z	p
Серотонин Serotonin	51	0,93	0,3587	95,00	-0,10	0,9195
Наблюдение 2 / Контроль 1 Observation 2 / Control 1						
	df	t	p	U	Z	p
Серотонин Serotonin	52	6,30	0,0000	54,00	2,04	0,0409*
Наблюдение 1 / Контроль 2 Observation 1 / Control 2						
	df	t	p	U	Z	p
Серотонин Serotonin	50	3,30	0,0018	25,00	2,43	0,0147*

Примечание. * – значимые различия при $p < 0,05$, ** – значимые различия с учетом поправки Бонферрони.

Note. *, significant differences at $p < 0.05$; **, significant differences with the Bonferroni correction.

ТАБЛИЦА 8. МУЛЬТИПЛИКАТИВНАЯ МОДЕЛЬ НАСЛЕДОВАНИЯ ПО ГЕНУ АКТИНИНА АСТН3 rs1815739

TABLE 8. MULTIPLICATIVE INHERITANCE MODEL FOR THE ACTININ GENE ACTN3 rs1815739

Ген Gene	Генотип Genotype	Наблюдение 1 / Наблюдение 2 Observation 1 / Observation 2	Контроль 1 / Контроль 2 Control 1 / Control 2
АСТН3	C/C		
С/Т	C/T	0,1158	0,0577
1815739	T/T		
		Наблюдение 1 / Контроль 1 Observation 1 / Control 1	Наблюдение 2 / Контроль 2 Observation 2 / Control 2)
АСТН3	C/C		
С/Т	C/T	0,2026	0,9552
1815739	T/T		
		Наблюдение 1 / Контроль 2 Observation 1 / Control 2	Наблюдение 2 / Контроль 1 Observation 2 / Control 1
АСТН3	C/C		
С/Т	C/T	0,2326	0,0273*
1815739	T/T		OR = 3,86 (CI: 1,13-13,19)

Примечание. * – значимые различия между исследуемыми группами по р уровню значимости.

Note. *, significant differences between the groups under study according to the p-level of significance.

ТАБЛИЦА 9. КРОСС-КЛАССИФИКАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СВЯЗИ ЭКСПРЕССИИ СЕРОТОНИНА С ГЕНОТИПАМИ ГЕНА АСТН3 rs1815739 В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ КОНТАМИНАЦИИ БИОСРЕД ГИДРОКСИБЕНЗОЛОМ

TABLE 9. CROSS-CLASSIFICATION ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF SEROTONIN EXPRESSION WITH GENOTYPES OF THE ACTN3 rs1815739 GENE UNDER CONDITIONS OF VARIOUS CONTAMINATION OF THE BIOSENSOR WITH HYDROXYBENZENE

Генотип Genotype	Гидроксибензол в референтном диапазоне Hydroxybenzene in the reference range			Гидроксибензол за пределами референтного диапазона Hydroxybenzene outside the reference range		
	n	X (SE) нг/мл ng/ml	Разница Difference (CI)	n	X (SE) нг/мл ng/ml	Разница Difference (CI)
С/С	2	295,44 (29,54)	0,00	20	81,69 (10,85)	-192,81 (-275,20 – -110,42)
С/Т	9	127,98 (29,24)	-158,73 (-244,04 – -73,42)	15	76,46 (11,09)	-203,28 (-286,12 – -120,44)
Т/Т	3	91,27 (23,18)	-177,99 (-279,48 – -76,51)	7	124,65 (27,7)	-144,61 (-234,31 – -57,91)
p = 0,00028						

Примечание. X – среднее, SE – стандартная ошибка, CI – доверительный интервал.

Note. X, the average; SE, the standard error; CI, the confidence interval.

Для каждой исследуемой группы были определены соответствующие уровни иммунологических маркеров, с оценкой нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка, а также непараметрический тест Краскела–Уоллиса, являющийся аналогом однофакторного дисперсионного анализа, который позволил определить

наличие значимых различий между группами в показателе серотонина (табл. 5, 6).

Для более точного поиска конкретных различий между группами были использованы: параметрический тест t-Стьюдента для выборок с нормальным распределением и непараметрический тест U Манна–Уитни для выборок с отсутствием нормального распределения, а также

поправка Бонферрони на множественные сравнения (табл. 7).

Согласно t-критерию Стьюдента, были найдены значимые различия между исследуемыми группами «Наблюдение 1» и «Наблюдение 2» по показателю серотонина, удовлетворяющие условиям использования поправки Бонферрони.

Результаты изучения полиморфизма гена актинина *ACTN3* rs1815739 для каждой из групп позволили установить, что частоты генотипов в каждой из групп соответствуют равновесию Харди–Вайнберга, следовательно, корректна дальнейшая оценка при помощи мультипликативной модели наследования, которая позволила установить Т-аллель как фактор, увеличивающий вероятность негативных последствий в условиях избыточной контаминации биосред фенолом (табл. 8).

Кросс-классификационный анализ причинно-следственных взаимодействий – зависимость уровня серотонина от генотипов гена актинина *ACTN3* rs1815739 в условиях контаминации биосред гидроксибензолом, позволил установить, что рост экспрессии серотонина соответствует С/С-генотипу на фоне референтного диапазона гидроксибензола, тогда как Т/Т-генотип в условиях референтного диапазона гидроксибензола, ассоциирован с угнетением экспрессии серотонина, неуклонно приближая ее к нижней границе нормы. В условиях избыточности гидроксибензола, генотип Т/Т начинает выступать уже в качестве протекторного фактора уровню серото-

нина, в других случаях наблюдаем угнетение экспрессии серотонина (табл. 9).

Обсуждение

Установленный высокий уровень аэрогенной экспозиции гидроксибензолами исследуемой территории, избыточность гидроксибензола (экзогенного эстрогена) в биосредах женского населения, верифицированная высоким уровнем ответа – специфического иммуноглобулина IgG, высокая распространенность заболеваний репродуктивной сферы позволяют констатировать высокую вероятность формирования нарушений репродуктивной сферы избыточностью экспозиции гидроксибензолами.

Дальнейший анализ позволил установить прямо пропорциональную зависимость уровня специфического иммуноглобулина IgG от уровня фенола в крови, а уровень экспрессии сывороточного серотонина от концентраций в крови орто- и пара-крезолов.

Мультипликативная модель наследования определила аллель Т-гена *ACTN3* rs1815739 как фактор, ассоциированный с вероятностью формирования репродуктивных нарушений.

Кросс-классификационный анализ выявил генотип Т/Т гена *ACTN3* rs1815739 как супрессорный экспрессии серотонина на фоне референтного диапазона гидроксибензола и как протекторный экспрессии серотонина в условиях избыточной контаминации биосред гидроксибензолом.

Список литературы / References

1. Бадмаева С.Э., Циммерман В.И. Антропогенное загрязнение атмосферного воздуха городов красноярского края // Вестник КРАСГАУ, 2015. № 2 (101). С. 27-32. [Badmayeva S.E., Tsimmerman V.I. Anthropogenic pollution of the atmospheric air in the krasnoyarsk territory cities. *Vestnik KRASGAU = Bulletin of Krasnoyarsk State Agrarian University*, 2015, no. 2 (101), pp. 27-32. (In Russ.)]
2. Варгузина М.С., Бородкина Т.А. Основные источники загрязнения атмосферного воздуха в Воронежской области // Территория науки, 2014. № 1. С. 110-119. [Varguzina M.S., Borodkina T.A. The main sources of air pollution in Voronezh region. *Territoriya nauki = Territory of Science*, 2014, no. 1, pp. 110-119. (In Russ.)]
3. Долгих О.В., Казакова О.А., Кривцов А.В. Оценка экспрессии CD127⁻ и CD95⁺ и генетического профиля женщин репродуктивного возраста, экспонированных фенолом // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1125-1128. [Dolgikh O.V., Kazakova O.A., Krivtsov A.V. Assessment of CD127⁻ and CD95⁺ expression and genetic profile of women of reproductive age exposed to phenol. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1125-1128. (In Russ.)]
4. Клейн С.В., Вековшинина С.А., Криюлина Н.В. Гигиеническая оценка качества атмосферного воздуха в зоне воздействия источников выбросы фенола и крезолов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2012. Т. 14, № 5 (3). С. 600-603. [Klein S.V., Vekovshinina S.A., Kriulina N.V. Hygienic assessment of atmospheric air quality in the zone of exposure to sources of phenol and cresol emissions. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2012, Vol. 14, no. 5 (3), pp. 600-603. (In Russ.)]
5. Морозова Л.А., Родина С.А., Ведеева А.А. Анализ динамики источников загрязнения атмосферного воздуха Астраханской области // Конфликт природопользования: роль в эволюции ноосферы. Материалы Международной научно-практической конференции, 2019. С. 58-62. [Morozova L.A., Rodina S.A., Vedeeva A.A. Analysis of dynamics of atmospheric air pollution sources of the Atrakhan region. *Konflikt prirodopolzovaniya: Rol v evolyutsii noosfery. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii = Conflict of Nature Management:*

Role in the Evolution of the Noosphere. Materials of the International Scientific and Practical Conference, 2019, pp. 58-62. (In Russ.)

6. Никитин А.И. Гормоноподобные ксенобиотики и их роль в патологии репродуктивной функции человека // Экология человека, 2006. № 2. С. 17-23. [Nikitin A.I. Hormone-like xenobiotics and their role in pathology of human reproductive function. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2006, no. 2, pp. 17-23. (In Russ.)]

7. Никитин А.И. Гормоноподобные загрязнители биосферы и их влияние на репродуктивную функцию человека // Биосфера, 2009. С. 218-229. [Nikitin A.I. Hormone-like pollutants of the biosphere and their influence on human reproductive function. *Biosfera = Biosphere*, 2009, pp. 218-229. (In Russ.)]

8. Постников В.П. Прогнозирование загрязнения атмосферного воздуха города Перми // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Социально-экономические науки, 2014. № 22. С. 125-132. [Postnikov V.P. Forecast of atmospheric air pollution in the city of perm. *Vestnik Permskogo natsionalnogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Sotsialno-ekonomicheskie nauki = Bulletin of the Perm National Research Polytechnic University. Social and Economic Sciences*, 2014, no. 22, pp. 125-132. (In Russ.)]

9. Предеина Р.А., Бубнова О.А., Вдовина Н.А., Варанкина А.В. Иммунные и генетические механизмы невынашивания в условиях экспозиции гидроксированными бензолами // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17). № 3. С. 369-372. [Predeina R.A., Bubnova O.A., Vdovina N.A., Varankina A.V. Immune and genetic mechanisms of miscarriage under the exposure to hydroxylated benzene. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 369-372. (In Russ.)]

10. Рябченко О.И., Зачиняев Я.В. Охрана и мониторинг атмосферного воздуха-приоритетные направления сервиса экосистем Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Техничко-технологические проблемы сервиса, 2014. № 2 (28). С. 34-40. [Ryabchenko O.I., Zachinyaev Ya.V. Protection and monitoring of air – the priority directions of ecosystem service in St. Petersburg and Leningrad region. *Tekhniko-tehnologicheskie problemy servisa = Technical and Technological Problems of the Service*, 2014, no. 2 (28), pp. 34-40. (In Russ.)]

11. Чернов В.О., Артымук Н.В., Данилова Л.Н. Гормоноподобные ксенобиотики и гинекологические проблемы. Обзор литературы // Мать и дитя в Кузбассе, 2018. № 2 (73). С. 20-26. [Chernov V.O., Artymuk N.V., Danilova L.N. Hormone-Like xenobiotics and gynecological problems. Literature review. *Mat i ditya v Kuzbasse = Mother and Child in Kuzbass*, 2018, no. 2 (73), pp. 20-26. (In Russ.)]

12. Aker A.M., Ferquson K.K., Rosario Z.Y., Mukherjee B., Alshawabkeh A.N., Calafat A.M., Cordero J.F., Meeker J.D. A repeated measures study of phenol, paraben and Triclocarban urinary biomarkers and circulating maternal hormones during gestation in the Puerto Rico PROTECT cohort. *Environ. Health*, 2019, Vol. 18, no. 1, 28. doi: 10.1186/s12940-019-0459-5.

13. Amaro A.A., Esposito A.I., Mirisola V., Mehili A., Rosano C., Noonan D.M., Albinib A., Pfeffer U., Angelini G. Endocrine disruptor agent nonyl phenol exerts an estrogen-like transcriptional activity on estrogen receptor positive breast cancer cells. *Curr. Med. Chem.*, 2014, Vol. 21, no. 5, pp. 630-640.

14. Emoto Y., Yoshizawa K., Shikata N., Tsubura A., Nagasaki Y. Autopsy report for chemical burns cresol solution. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp. 99-102.

15. Fatihi S., Mols P. About a cresol intoxication. *Rev. Med. Brux.*, 2018, Vol. 39, no. 3, pp. 150-154.

16. Michalowicz J., Duda W. Phenols – sources and toxicity. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2007, Vol. 16, no. 3, pp. 347-362.

17. Toxicological review of phenol (Cas No.108-95-2) U.S. Environmental Protection Agency Washington D.C, 2002, 213 p. Available at: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0088tr.pdf.

18. Vernet C., Philippat C., Calafat A.M., Ye X., Lyon-Caen S., Siroux V., Schisterman E.F., Slama R. Within-Day, Between-Day, and Between-Week variability of urinary concentrations of phenol biomarkers in pregnant women. *Environ. Health Perspect.*, 2018, Vol. 126, no. 3, 037005. doi: 10.1289/EHP1994.

Авторы:

Казакова О.А. – младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Долгих О.В. – д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Authors:

Kazakova O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Dolgikh O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunological Methods of Diagnostics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Поступила 25.05.2020

Принята к печати 22.03.2021

Received 25.05.2020

Accepted 22.03.2021