

## ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD127<sup>-</sup> И CD95<sup>+</sup> И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА, ЭКСПОНИРОВАННЫХ ФЕНОЛОМ

© 2019 г. О. В. Долгих<sup>1,2,3\*</sup>, О. А. Казакова<sup>1</sup>, А. В. Кривцов<sup>1</sup>

\*E-mail: oleg@fcrisk.ru

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

<sup>2</sup>Пермский государственный научный исследовательский университет, Пермь, Россия;

<sup>3</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Поступила: 29.05.2019. Принята: 30.06.2019

В работе представлены результаты иммунологического и генетического исследования крови женщин репродуктивного возраста постоянно проживающих в условиях аэрогенной экспозиции фенолом и имеющих в анамнезе репродуктивные нарушения, проявляющиеся в виде невынашивания беременности. Исследованы иммунологические показатели — экспрессия Т-регуляторных CD127<sup>-</sup> лимфоцитов, и экспрессия CD95<sup>+</sup> лимфоцитов вовлеченных в процесс апоптоза. Проанализирован генетический профиль женщин с установлением полиморфных вариантов генов *FOXP3* T3499C rs3761547 и *FAS* C14405T rs1159120 участвующих в экспрессии кластеров. Установлено, что женщины имеющие репродуктивные нарушения и подверженные повышенной контаминации биосред фенолом имеют сниженный уровень экспрессии Т-регуляторных клеток CD127<sup>-</sup> относительно здоровых не экспонированных женщин, и более низкий уровень экспрессии CD95<sup>+</sup> клеток как относительно группы неэкспонированных женщин, так и относительно нормы, что на фоне генетической полиморфности создает условия для злокачественного течения процессов репродуктивных нарушений (невынашивания беременности).

**Ключевые слова:** репродуктивные нарушения, фенол, CD лимфоциты, ген *FAS*, ген *FOXP3*

DOI: 10.31857/S102872210007240-9

**Адрес:** Пермь, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Долгих Олег Владимирович. Тел.: +7 (342) 236-39-30. E-mail: oleg@fcrisk.ru

### Авторы:

**Долгих О. В.**, д.м.н., заведующий лабораторией иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

**Казакова О. А.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

**Кривцов А. В.**, к.м.н., заведующий лабораторией иммуногенетики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Сохранение женского репродуктивного здоровья приобретает особенную значимость в современных гигиенических и социально-экономических условиях, характеризующихся

повышенным уровнем опасности, как для развития женских репродуктивных органов, так и для развития беременности. Профилактика репродуктивных потерь неинфекционного генеза становится одним из приоритетных направлений, на фоне растущей заболеваемости репродуктивных органов в том числе в условиях техногенной экспозиции химическими факторами. Фенол относится ко 2-му классу опасности, поступает в объекты окружающей среды с пылегазовыми выбросами предприятий [1, 2, 4]

Органами мишенями фенола, при ингаляционном поступлении являются органы дыхания и сердечно-сосудистая система. При проникновении в клетку, фенол способен трансформироваться до более токсичных соединений, вызывающих повреждение ферментов и непосредственно ДНК. Экспозиция женщин вредными примесями, в том числе фенолом и его производными сопровождается нарушением

деятельности «критических» органов и систем (иммунитет, кровеносная система), что прямо или опосредовано влияет на способность выполнения репродуктивного потенциала, отягощенного негативной генетической полиморфностью кандидатных генов.

**Цель исследования** — изучить ассоциации полиморфного генетического профиля и уровней экспрессии CD лимфоцитов у женщин с репродуктивными нарушениями в условиях экспозиции фенолами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 129 женщин репродуктивного возраста ( $31,44 \pm 6,49$  лет) имеющих в анамнезе репродуктивные нарушения, проявляющиеся в виде невынашивания беременности. Все женщины постоянно проживают на территории, характеризующейся повышенной аэрогенной экспозицией фенолом и его производными превышающими нормативные уровни (более 1 ПДКс.с) [3].

Для исследуемых женщин проведено химическое, иммунологическое и генетическое тестирование на базе лабораторий ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» в г. Перми в период с 2013 по 2017 годы.

Уровень фенола в периферической крови пациентов определен методом капиллярной газовой хроматографии на приборе «Кристалл-5000» (Россия). Показатели клеточной дифференцировки T-регуляторных лимфоцитов CD127<sup>-</sup> и лимфоцитов вовлеченных в процесс апоптоза CD95 определялись на проточном цитометре FACSCalibur (США). Оценивались частоты полиморфных генов *FOXP3* T3499C rs3761547 и *FAS* C14405T rs1159120 регулирующих экспрессию соответственно CD127<sup>-</sup> и CD95 позитивных лимфоцитов на приборе BioRad CFX96 C1000 (Сингапур) в режиме реального времени.

Исследуемый контингент женщин был разделен на 4 группы: 1 группа — женщины с репродуктивными нарушениями, с содержанием фенола в пределах референтного диапазона ( $0-0,0016$  мг/см<sup>3</sup>), 2 группа — с содержанием фенола выше референтного диапазона ( $>0,0016$  мг/см<sup>3</sup>), 3 группа — условно здоровые, без репродуктивных нарушений, с содержанием фенола в пределах референтного диапазона и 4 группа — здоровые контаминированные фенолом выше референтного диапазона. Проведен ана-

лиз 6 парных сравнений показателей T-клеточного иммунитета между группами при помощи t-теста для выборочных средних, анализ средних относительно референтного значения при помощи одновыборочного t-теста. Проведен факторный дисперсионный анализ для условий наличия и отсутствия репродуктивных нарушений, одновременно — превышения референтного уровня фенола и отсутствие превышения. Факторный дисперсионный анализ связи уровня фенола (в пределах референтного диапазона/превышение референтного диапазона) и наличия репродуктивных нарушений (наличие/отсутствие) с имеющимся генетическим полиморфизмом кандидатных генов. Произведена оценка частот полиморфизмов генов на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Анализ средних исследуемых показателей относительно нормальных уровней представлен на диаграммах в виде  $x \pm SE$  (Диаграммы 1–2). Значимыми считались результаты с уровнем  $p < 0,05$ . Для парных сравнений также использовалась поправка Бонферони, устанавливающая уровень значимости  $p < 0,008$  (менее 1%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам оценки t-парного теста для независимых выборок установлены: между группами наблюдения (фенол выше нормы) ( $0,089 \pm 0,010 \times 10^9 / \text{дм}^3$  абсолютные лимфоциты,  $4,101 \pm 0,570\%$  относительные лимфоциты) и контроля (фенол в норме) ( $0,043 \pm 0,005 \times 10^9 / \text{дм}^3$  абсолютные лимфоциты,  $2,013 \pm 0,214\%$  относительные лимфоциты) значимые различия по показателю CD127<sup>-</sup> абсолютные и относительные лимфоциты  $p = 0,0015^{**}$  и  $p = 0,0009^{**}$  соответственно (\*\* — ниже, чем поправка Бонферони); между группами наблюдения (фенол в норме) и контроля (фенол в норме) также обнаружены значимые различия по показателю CD127<sup>-</sup> абсолютные и относительные лимфоциты  $p = 0,012$  ( $0,059 \pm 0,015 \times 10^9 / \text{дм}^3$  против  $0,089 \pm 0,010 \times 10^9 / \text{дм}^3$ ) и  $p = 0,002^{**}$  ( $2,140 \pm 0,533\%$  против  $4,101 \pm 0,570\%$ ) соответственно; между группами контроля (фенол в норме) и контроля (фенол выше нормы) значимые различия только по CD127<sup>-</sup> абсолютным лимфоцитам  $p = 0,044$  ( $0,089 \pm 0,010 \times 10^9 / \text{дм}^3$  против  $0,043 \pm 0,005 \times 10^9 / \text{дм}^3$ ); при сравнении групп наблюдения (фенол выше нормы) и контроля (фенол выше нормы), обнаружены значимые различия по показателю CD95<sup>+</sup> абсолютных лимфоцитов при  $p = 0,037$  ( $0,544 \pm 0,033 \times 10^9 / \text{дм}^3$  против  $0,713 \pm 0,049 \times 10^9 / \text{дм}^3$ ).

CD127<sup>-</sup> абсолютные и относительные лимфоциты

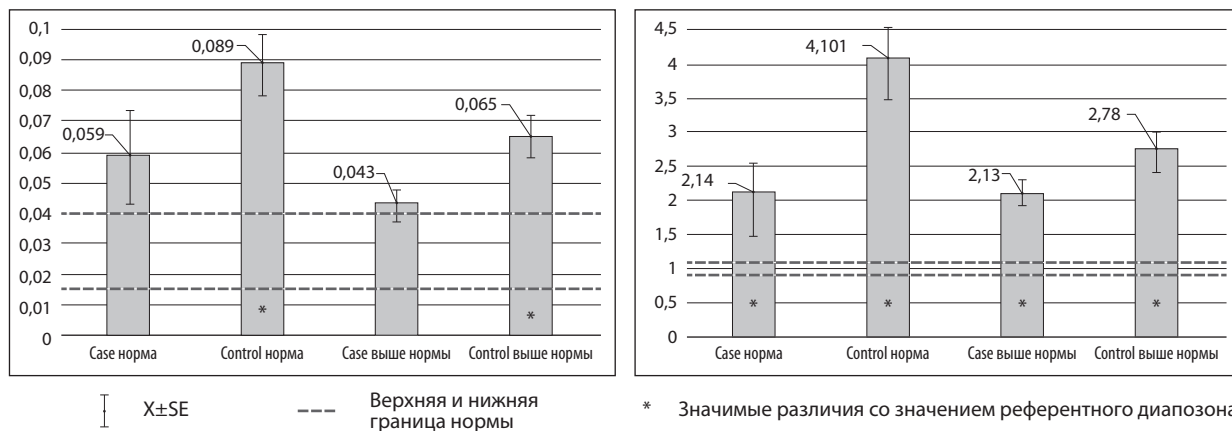


Диаграмма 1. Оценка экспрессии CD127<sup>-</sup> абсолютных (10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>) и относительных лимфоцитов (%) для исследуемых групп

CD95<sup>+</sup> абсолютные и относительные лимфоциты

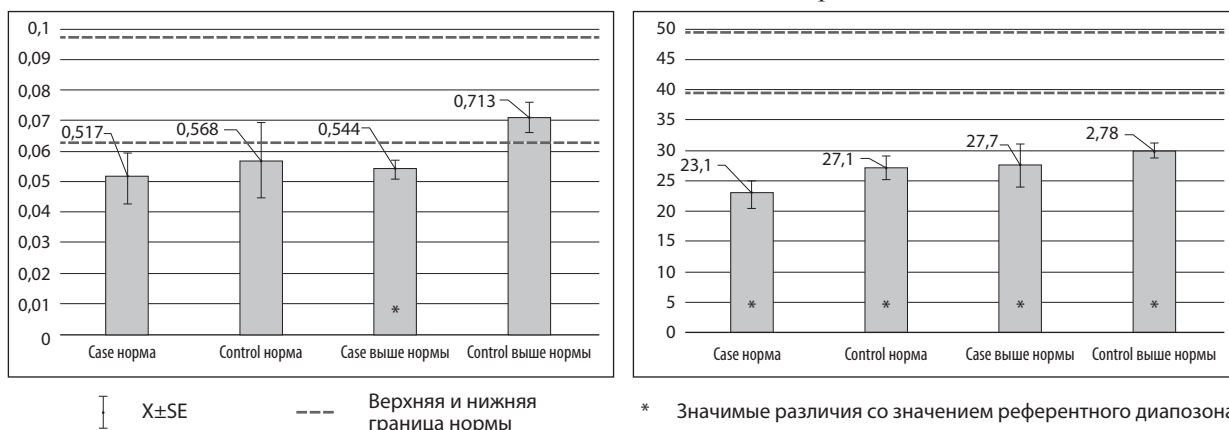


Диаграмма 2. Оценка экспрессии CD95<sup>+</sup> абсолютных (10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>) и относительных лимфоцитов (%) для исследуемых групп

Распределение показателей соответствует нормальному распределению в соответствии с критерием Шапиро-Уилка при  $p < 0,05$ . При выполнении одновыборочного t-теста относительно референтного диапазона для исследуемых показателей установлены значимые различия (Диаграммы 1–2) при  $p < 0,005^*$

Проведение однофакторного дисперсионного анализа для фактора наличия и отсутствия репродуктивных нарушений выявил связь фактора с уровнями экспрессии T-клеточного звена иммунитета CD127<sup>-</sup> абсолютных лимфоцитов  $F(1;109) = 9,48, p = 0,002$  и относительных лимфоцитов  $F(1,109) = 10,29, p = 0,0018$ . Распределение частот генотипов исследуемых генов по группам соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

Факторный дисперсионный анализ на поиск сочетанного действия уровня фенола и наличия

T/T гомозиготного варианта гена *FOXP3* установил связь факторов с уровнем экспрессии CD127<sup>-</sup> абсолютных лимфоцитов  $F(2,63) = 3,82, p = 0,027$ . Факторный анализ позволил обнаружить связь наличия репродуктивных нарушений при имеющемся C/T гетерозиготном полиморфизме гена *FAS* с уровнем экспрессии CD95<sup>+</sup>-относительных лимфоцитов  $F(2,63) = 4,59, p = 0,035$ .

### ВЫВОДЫ

Женщины, имеющие в анамнезе репродуктивные нарушения и подверженные высокому уровню контаминации биосред фенолом, характеризуются активацией экспрессии T-регуляторных CD4CD127<sup>-</sup> лимфоцитов относительно контрольной группы здоровых не экспонированных фенолами женщин. Также отмечается снижение

экспрессии вовлеченных в апоптоз CD3CD95<sup>+</sup> лимфоцитов как относительно контрольной группы, так и относительно референтного уровня, что ассоциируется с полиморфностью кандидатных генов (*FOXP3*, *FAS*), участвующих в регуляции экспрессии CD лимфоцитов.

Выявлена роль Т/Т гомозиготного варианта гена *FOXP3* в развитии повышенного уровня Т-клеточной супрессии CD127<sup>-</sup>, а также С/Т гетерозиготного варианта гена *FAS* в угнетении экспрессии CD95<sup>+</sup> относительных лимфоцитов, что на уровне транскрипта может характеризовать как проявления условий экспозиции фенолами.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцева Н. В., Устинова О. Ю., Землянова М. А. Оценка клиниколабораторных показателей здоровья работников предприятий по производству активированных углей // *Фундаментальные исследования*. 2010. № 11. С. 59–64. [Zaytseva N. V., Ustinova O. Yu., Zemlyanova M. A. Assessment the
2. Байравов Н. А., Жилыков Е. В. Антропогенная нагрузка как фактор, усугубляющий развитие и течение основных заболеваний беременных женщин и детей // *Фундаментальные исследования*. – № 4. – 2014. – С. 624–628. [Bayravov N. A., Zhilyakov E. V. Anthropogenic loading as the factor aggravating development and the course of the main diseases of pregnant women and children // *Basic researches*. – No. 4. – 2014. – P. 624-628.]
3. Автореферат диссертации на соискателя к.б.н. Предеиной Р. А. Гигиеническая оценка аэрогенного внешнесредового воздействия фенолов на иммунную регуляцию у детей (На примере Пермского края). – М, 2013. [The abstract of the thesis on the applicant to k. b. n. of Predeina R.A. Hygienic assessment of aerogenic externally environmental impact of phenols on immune regulation at children (On the example of Perm Krai). – М, 2013.]
4. Hansch C., McCarns S., Smith C., Dodittle D. Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem.Biol.Interact.* 2000, 127, 61.

## ASSESSMENT OF CD127<sup>-</sup> AND CD95<sup>+</sup> EXPRESSION AND GENETIC PROFILE OF WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE EXPOSED TO PHENOL

© 2019 О. В. Dolgikh<sup>1,2,3\*</sup>, О. А. Kazakova<sup>1</sup>, А. В. Krivtsov<sup>1</sup>

\*E-mail: oleg@fcrisk.ru

<sup>1</sup>FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI HPE “Perm State National Research University”, Perm, Russia;

<sup>3</sup>FSBEI HPO “Perm State National Research Polytechnic University”, Perm, Russia

Received: 29.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The paper presents the results of immunological and genetic blood studies of women of reproductive age living permanently under aerogenic exposure to phenol and having reproductive disorders as recurrent pregnancy loss. Immunological values – expression of T-regulatory CD127 lymphocytes and expression of CD95<sup>+</sup> lymphocytes involved in apoptosis were studied. The genetic profile of women was analyzed and the polymorphic variants of genes *FOXP3* T3499C rs3761547 and *FAS* C14405T rs1159120 participating in the expression of clusters were determined. It was found out that women having reproductive disorders and living under increased contamination of biological media with phenol have reduced level of expression of T-regulatory cells CD127 relative to healthy and unexposed women, and a lower level of CD95<sup>+</sup> cells relative to the unexposed women and the norms. It results in malignant course of processes of reproductive disorders (recurrent pregnancy loss).

*Key words:* reproductive disorders, phenol, CD lymphocytes, *FAS* gene, *FOXP3* gene

#### Authors:

**Dolgikh O. V.**, ✉ MD, Professor, Head of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.

Perm, FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”.

Phone: +7 (342) 236-39-30. E-mail: oleg@fcrisk.ru;

**Kazakova O. A.**, postgraduate student, junior researcher of Immunogenetics Laboratory of FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia;

**Krivtsov A. V.**, Candidate of Medical Sciences, Head of Immunogenetics Laboratory of FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.