

## ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ ЮГА СИБИРИ

© 2019 г. О. В. Долгих<sup>1,2,3\*</sup>, А. А. Мазунина<sup>1</sup>, А. В. Кривцов<sup>1</sup>,  
М. А. Гусельников<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>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 26.06.2019

Проведен анализ особенностей иммунорегуляторных и биохимических показателей детского населения, проживающего в зоне аэрогенного загрязнения алюминием. По результатам исследований состояния здоровья детского населения выявлено наличие ранних изменений со стороны иммунной системы, которые проявляются в повышении содержания специфических иммуноглобулинов G к алюминию ( $p < 0,05$ ). Изучена сравнительная полиморфность гена *eNOS* (rs1799983). Установлена избыточная частотность аллеля T гена *eNOS* (rs1799983), что в условиях техногенной «алюминиевой» провинции может обуславливать возникновение заболеваний сердечно-сосудистой системы у детей.

**Ключевые слова:** алюминий, детское население, полиморфизм гена *eNOS*, риск, заболевания сердечно-сосудистой системы

DOI: 10.31857/S102872210007241-0

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., профессор, доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия;

Мазунина А. А., младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия;

Кривцов А. В., кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия;

Гусельников М. А., аспирант ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Антропогенное изменение окружающей среды приводит, как известно, к увеличению риска здоровью населения. Характер отклика на воздействие окружающей среды зависит не только от специфики факторов, уров-

ня экспозиции, но и от наследственных, генетических особенностей организма [1].

На территории Иркутской области расположены крупнейшие предприятия теплоэнергетики, переработки нефти, цветной металлургии, химической и нефтехимической, лесной, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной, легкой и пищевой промышленности, которые определяют количественный и качественный состав выбрасываемых загрязняющих веществ в атмосферу. В семи промышленных городах области уровень загрязнения атмосферного воздуха в период 2016–2017 гг. оценивается как высокий и очень высокий [2].

Алюминий относится к иммуно- и генотоксичным элементам. Он кумулируется и подавляет функцию макрофагов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. При этом алюминий вызывает не только супрессию клеточных реакций, но и митогенный эффект лимфоцитов. Предполагают,

что алюминий может быть одной из причин старческого клеточного иммунодефицита. Кроме того, алюминий может вызывать аллергию, что обусловлено супрессивным влиянием этого микроэлемента на мутаген-опосредованный иммунный ответ. В то же время алюминий способствует обострению целого ряда аутоиммунных заболеваний в пожилом и старческом возрасте [9].

**Цель.** Изучить особенности индикаторных показателей иммунной регуляции и полиморфизма генов у детей, выявить риски заболеваний детского населения Сибири в условиях внешнесредового аэрогенного воздействия алюминия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На территории юга Сибири (Иркутская область) обследовано 332 ребенка в возрасте от 4 до 9 лет – далее группа наблюдения, «случай». На территории Красноярского края обследовано 90 детей в возрасте от 5 до 8 лет – далее группа сравнения, «контроли». Группы сопоставимы по этническому, гендерному и возрастному составу, социальному статусу.

У всех обследуемых проведено химическое, биохимическое и генетическое тестирование.

Химико-аналитическое исследование на содержание алюминия в биосредах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500cx («Agilent Technologies Inc.», США) в соответствии с МУК 4.1.3230–14 «Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой» [4].

Изменение содержания специфического к алюминию иммуноглобулина класса G (IgG) определяли в аллергосорбентном тесте с ферментной меткой. Определение содержания оксида азота, фактора эндотелия сосудов (VEGF) и интерлейкина-17 (IL-17) проводили методом иммуноферментного анализа.

У всех обследуемых был изучен полиморфизм однонуклеотидных замен (SNP) генов эндотелиальной синтазы оксида азота *eNOS*, интер-

лейкина-17 *IL17F* и фактора эндотелия сосудов *VEGFA*. Генетический материал был выделен из периферической крови сорбентным методом. Для определения полиморфизма исследуемых генов использовали тест-системы «Синтол», Россия – набор реагентов для определения полиморфизма *Glu298Asp* гена *eNOS* (rs1799983), набор реагентов для определения полиморфизма *C/G* гена *IL17F* (rs 612242) и реагентов для определения полиморфизма *G634C* гена *VEGFA* (rs 2010963).

Оценка генетического полиморфизма осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе BioRAD CFX96™ Real-Time System (США) с последующей детекцией продуктов реакции методом аллельной дискриминации.

Расчет распределения частот генотипов и аллелей в группах проводился с помощью Online-программы «Ген Эксперт», используемой для расчета статистических параметров для исследований «случай-контроль», использующих SNP (диагностику однонуклеотидных полиморфизмов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Химико-аналитический анализ биосред показал, что у наблюдаемой группы детей достоверно повышено содержание алюминия в моче по отношению к группе сравнения в 1,7 раз ( $p < 0,05$ ) (Таблица 1).

По результатам иммунобиохимического анализа крови детей установлено, что содержание специфического иммуноглобулина G к алюминию у группы наблюдения выше референтного значения в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), у группы сравнения – в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2).

Также было выявлено снижение уровня оксида азота у группы наблюдения в 1,25 раз относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2).

К ключевым полиморфизмам, реализующим взаимодействие антропогенных химических факторов и процессов иммунологического гомеостаза, относится полиморфизм *Glu298Asp*

**Таблица 1.** Сравнительная оценка содержания алюминия в биосредах

Показатель	Референтное значение, мкг/см <sup>3</sup> (по Тицу)	Группа наблюдения, (n=332) M±m	Группа сравнения, (n=90) M±m
Алюминий [моча], мг/дм <sup>3</sup>	0–0,007	0,0212±0,0029*	0,0122±0,0042

**Примечание:** \* -разница достоверна относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ )

**Таблица 2.** Иммунобиохимические показатели детского населения экспонированного алюминием

Показатель	Референтное значение	Группа наблюдения, (n=332) M±m	Группа сравнения, (n=90) M±m
IgG к алюминию, у.е.	0–0,1	0,159±0,02*/**	0,233±0,03
Оксид азота, мкмоль/дм <sup>3</sup>	39–116,8	64,41±4,873**	80,514±14,995
VEGF, пг/мл	10–700	143,92±32,954	175,066±28,564
Интерлейкин-17, пг/мл	0–5	6,68±1,775	4,68±1,775

**Примечание:** \* - разница достоверна относительно референтного значения ( $p < 0,05$ ); \*\* - разница достоверна относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ )

**Таблица 3.** Мультипликативная модель наследования (тест хи-квадрат,  $df=1$ ) по гену *eNOS*

Аллели	Случаи n=332	Контроли n=90	$\chi^2$	p	OR	
					знач.	95% CI
Аллель G	0,827	0,717	10,87	0,001	1,89	1,29–2,76
Аллель T	0,173	0,283			0,53	0,36–0,78

**Таблица 4.** Аддитивная модель наследования (тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов,  $\chi^2=[0,1,2]$ ,  $df=1$ ) по гену *eNOS*

Генотипы	Случаи n=332	Контроли n=90	$\chi^2$	p	OR	
					знач.	95% CI
Генотип G/G	0,696	0,533	9,88	0,002	2,00	1,24–3,22
Генотип G/T	0,262	0,367			0,61	0,37–1,00
Генотип T/T	0,042	0,100			0,40	0,17–0,95

патогенетического гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) [3].

По результатам генотипирования установлено, что «случаи» и «контроли» в анализируемых выборках детского населения Иркутской области и Красноярского края находятся в равновесии по критерию Харди-Вайнберга для гена *eNOS* ( $p=0,12$  для «случаев»;  $p=0,36$  для «контролей»), в таком случае исследуемые генетические различия у населения двух регионов могут быть проанализированы с применением как мультипликативной так и аддитивной моделей.

По результатам анализа полиморфизма генов детского населения отмечается достоверное ( $p < 0,05$ ) различие G-аллеля и T-аллеля (Таблица 3) и различие по генотипам (Таблица 4) гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) между группами различных территорий.

Установлено, что достоверность различия двух выборок детского населения по *eNOS* (rs1799983) формирует частотность генотипов G/G и T/T.

Следует отметить, что при обработке данных по генам *IL17F* и *VEGFA* результаты не соответствовали равновесию Харди-Вайнберга.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Продукт экспрессии гена *eNOS* фермент – эндотелиальная NO-синтаза, ответственный за синтез в сосудистой стенке оксида азота – важнейшего вазодилатора, антиагреганта, антимиогена и антиоксиданта [14]. Наличие T-аллеля определяет высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний: ишемической болезни сердца [12], стенокардии, инфаркта миокарда [7], артериальной гипертензии [5], атеросклероза [10], лакунарного инсульта [8], ишемического инсульта [11], венозной тромбоэмболии [15], ревматоидного артрита [13].

Кроме этого, одной из основных функций сосудистого эндотелия в организме является участие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета. Эндотелиоциты способны исполнять роль антигенпредставляющих клеток,

экспрессируя на своей поверхности антигены, представлять их Т-лимфоцитам и секретировать интерлейкин-1 [6], что предполагает генетическую предрасположенность к развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы у населения юга Сибири.

## ВЫВОДЫ

По результатам исследований состояния иммунитета и полиморфизма генов детского населения, проживающего в зоне аэрогенного загрязнения алюминием, выявлено наличие ранних изменений иммунного статуса, которые проявляются в повышении содержания специфических иммуноглобулинов G к алюминию ( $p < 0,05$ ). По результатам изучения генетического полиморфизма двух регионов юга Сибири было установлено, что у детского населения экспонированной алюминием территории наблюдаются достоверные различия по встречаемости аллелей и генотипов для гена *eNOS* (Glu298Asp, rs1799983) генотипы *G/G* и *T/T* и характеризуется достоверным снижением экспрессии оксида азота у группы наблюдения на 25% относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ ), что указывает на раннюю реализацию предрасположенности к развитию патологии сердечно-сосудистой системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Долгих В. В., Рычкова Л. В., Мандзяк Т. В., Маторова Н. И., Сахипова Г. Р., Давыдов А. В. Особенности физического развития и состояния здоровья детей дошкольного и младшего школьного возраста в зависимости от уровня артериального давления в промышленных центрах Иркутской области // *Acta Biomedica Scientifica*. 2006. № 3 (49). С. 191–193. [Dolgikh V. V., Rychkova L. V., Mandzyak T. V., Matorova N. I., Sakhipova G. R., Davydov A. V. Features of physical development and health status of children of preschool and primary school age, depending on the level of blood pressure in the industrial centers of the Irkutsk region // *Acta Biomedica Scientifica*. 2006. № 3 (49). p. 191–193.]
2. Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутской области в 2016 году. – Министерство природных ресурсов и экологии Иркутской области. – Иркутск, 2017. [State report on the state and environmental protection of the Irkutsk region in 2016. – The Ministry of Natural Resources and Ecology of the Irkutsk Region. – Irkutsk, 2017.]
3. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Горшкова К. Г., Дианова Д. Г., Вдовина Н. А., Пирогова Е. А., Безденежных В. А. Особенности генетического полиморфизма и иммунного статуса у детей, экспонированных бенз(а)пиреном // *Вестник Пермского университета. Серия: биология*. 2014. Вып. 4. С. 97–100. [Dolgikh O. V., Krivtsov A. V., Bubnova O. A., Gorshkova K. G., Dianova D. G., Vdovina N. A., Pirogova E. A., Bezdenezhnykh V. A. Features of genetic polymorphism and immune status in children exposed to benzo (a) pyrene // *Perm University Bulletin. Series: biology*. 2014. Issue 4. P. 97–100.]
4. Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [Электронный ресурс]. – МУК 4.1.3230–14. [Measurement of mass concentrations of chemical elements in biological media (blood, urine) by mass spectrometry with inductively coupled plasma [Electronic resource]. – МУК 4.1.3230–14.]
5. Кузнецова Т. Ю. и др. Влияние полиморфизма Glu298Asp гена эндотелиальной NO-синтазы на развитие поражений органов-мишеней при установлении артериальной гипертензии в молодом возрасте // *Сибирский медицинский журнал*. 2010. Vol. 25. № 2–1. [Kuznetsova T. Yu. and others. Influence of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial NO synthase gene on the development of target organ lesions in establishing arterial hypertension at a young age // *Siberian Medical Journal*. 2010. Vol. 25. No. 2–1.]
6. Локтионова И. Л., Покровский М. В., Рагулина В. А., Титарева Л. В., Денисюк Т. А., Ступакова Е. В., Сытник М. В., Сароян К. В., Лосенок С. А. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2012. № 4 (123), вып. 17/1. С. 20–31. [Loktionova I. L., Pokrovsky M. V., Ragulina V. A., Titareva L. V., Denisjuk T. A., Stupakova E. V., Sytnik M. V., Saroyan K. V., Losenok S. A. The state of the function of the vascular endothelium in infectious diseases of various etiologies // *Scientific Gazette of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2012. № 4 (123), vol. 17/1. P. 20–31.]
7. Поздняков Н. О., Мирошников А. Е., Поздняков С. О. К вопросу о клиническом значении полиморфизмов генов *eNOS* и *AGTR2* у пациентов с инфарктом миокарда, стабильной и нестабильной формами стенокардии // *Universum: медицина и фармакология*. 2016. № 1–2. P. 24. [Pozdnyakov N. O., Miroshnikov A. E., Pozdnyakov S. O. On the issue of the clinical significance of *eNOS* and *AGTR2* gene polymorphisms in patients with myocardial infarction, stable and unstable forms of angina pectoris // *Universum: medicine and pharmacology*. 2016. No. 1–2. P. 24.]
8. Топузова М. П. и др. Дисфункция эндотелия у больных с лакунарным инсультом // *Лечение и профилактика*. 2013. № 3. С. 37–45. [Topuzova M. P. and others. Endothelial dysfunction in patients with lacunar stroke // *Treatment and prevention*. 2013. No. 3. pp. 37–45.]

9. Шугалей И. В., Гарабаджиу А. В., Илюшин М. А., Судариков А. М. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы // Экологическая химия. 2012. Т. 21, № 3. С. 172–186. [Shugaley I. V., Garabadzhi A. V., Ilyushin M. A., Sudarikov A. M. Some aspects of the influence of aluminum and its compounds on living organisms // Ecological chemistry. 2012. Vol. 21, No. 3. P. 172–186.]
10. Campedelli F. L. et al. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis // Genetics and molecular research: GMR. 2017. Vol. 16. № 2.
11. Kumar A. et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta-analysis // Neurology India. 2017. Vol. 65. № 1. P. 22.
12. Mahmoodi K. et al. Association of nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with coronary artery disease in the Iranian population // Vascular specialist international. 2016. Vol. 32. № 3. P. 105.
13. Pehlivan S. et al. The functional variants of endothelial nitric oxide synthase gene associated with rheumatoid arthritis in Turkish adults // Clinical rheumatology. 2016. Vol. 36 (3). P. 537–540.
14. Tenero L., Piazza M., Zannoni L. et al. Antioxidant supplementation and exhaled nitric oxide in children with asthma // Allergy and asthma proceedings. 2016. Vol. 37. P. 8–13.
15. Zhao L. et al. Risk indicators for venous thrombosis in first-degree relatives of patients with recurrent venous thromboembolism in Chinese // Medicine. 2016. Vol. 95. № 41.

## IMMUNOBIOCHEMICAL INDICATORS AND COMPARATIVE EVALUATION OF POLYMORPHISM OF CHILDREN'S POPULATION GENES IN SOUTH SIBERIA

© 2019 O. V. Dolgikh<sup>1,2,3\*</sup>, A. A. Mazunina<sup>1</sup>, A. V. Krivtsov<sup>1</sup>,  
M. A. Guselnikov<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>Perm State National Research University, Perm, Russia;

<sup>3</sup>Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

**Received:** 18.05.2019. **Accepted:** 26.06.2019

The analysis of the features of immunoregulatory indicators of the child population living in the zone of airborne aluminum pollution was carried out. According to the results of immunological studies of the health of the child population, the presence of pathological changes in the immune system was revealed, which are manifested in a decrease in the phagocytic activity of cells, an increase in the level of the main classes of immunoglobulins, activation of T cell receptors CD127<sup>-</sup>, an increase in the content of cell death receptor CD95<sup>+</sup> (p<0,05). The comparative polymorphism of the eNOS gene (rs1799983) was studied. The excessive frequency of the T allele of the eNOS gene (rs1799983) was established, which, under the conditions of the technogenic "aluminum" province, can cause the occurrence of diseases of the cardiovascular system in children.

*Key words:* aluminum, children population, eNOS gene polymorphism, risk, diseases of the cardiovascular system

### 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;

**Mazunina A. A.**, Junior Researcher of the Immunogenetics Laboratory of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia;

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

**Guselnikov M. A.**, postgraduate student of FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia.