

ГИГИЕНА, САНИТАРИЯ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

О.В. Долгих, Т.С. Уланова, И.Н. Аликина, Ю.А. Челакова,
Т.В. Нурисламова

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ НИТРАТНОЙ ГЕОХИМИЧЕСКОЙ ПРОВИНЦИИ

DOI 10.25789/YMJ.2019.68.14

УДК 611/612:616.097

Проведена оценка иммунологического и генетического статуса детского населения в условиях избыточного поступления нитратов с питьевой водой в биогеохимической провинции Пермского края.

Установлены изменения клеточного звена иммунитета (угнетение Т-клеточных рецепторов CD95⁺ и внутриклеточных белков Bcl2), дефицит ТГГ, увеличение экспрессии онкомаркеров, ассоциированные с ростом концентрации N-нитрозодиметиламина в крови, достоверные как по отношению к референтному уровню, так и к группе сравнения. Выявлено повышение специфического IgG к N-нитрозодиметиламину ($p < 0,05$). Результаты изучения частоты полиморфизма генов выявили его особенности у детей нитратной провинции по критерию минорного аллеля генов: *MTHFR*, *PPARA*, *CPOX*, *CYP1A2*, *BRCA1*, характеризующих вероятность возникновения нарушений процессов детоксикации и контроллинга онкопролиферации.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, генетический полиморфизм, ген *BRCA1* rs3950989, N-нитрозоамины.

The authors assessed immunological and genetic status of children under excessive intake of nitrates with drinking water in a particular bio-geochemical province of Perm region.

The changes in cellular component of the immune system (inhibition of T-cell receptors CD95⁺ and intracellular proteins Bcl2), TH deficiency, the increased expression of tumor markers associated with the growth in N-nitrosodimethylamine concentration in the blood, significant both in relation to the reference level and the comparison group were found. An increase in specific IgG to N-nitrosodimethylamine ($p < 0,05$) was detected. The study results of the gene polymorphism frequency revealed its features in children of nitrate province according to the criterion of minor allele of genes: *MTHFR*, *PPARA*, *CPOX*, *CYP1A2*, *BRCA1*, which characterize the eventual violations of detoxification and cancer proliferation functions.

Keywords: cell-mediated immunity, a genetic polymorphism, *BRCA1* gene rs3950989, N-nitrosamines.

Введение. При длительном воздействии различных токсических веществ в концентрациях, не вызывающих внешне обнаруживаемого эффекта, выявляются скрытые изменения ряда физиологических, нейрорегуляторных, иммунологических и биохимических показателей функции отдельных органов и систем. К таким веществам относятся нитраты и их метаболиты – N-нитрозоамины. N-нитрозодиэтиламин (НДМА) относится к классу супермутагенов, обладает высокой токсичностью, тератогенным и эмбриотропным действием, способствует росту злокачественных опухолей, является слабым аллергеном и обладает иммунодепрессивным действием [1]. Поступление нитратов

в организм может приводить к эндогенному нитрозированию и образованию N-нитрозоаминов, которые являются весьма вероятным канцерогенным фактором для человека (группа 2A) [3,5]. Метаболизм N-нитрозоаминов микросомальной системой окисления с помощью цитохрома P-450 приводит к образованию иона метилдiazония (прямой канцероген), который способен метилировать ДНК клеток, индуцируя возникновение злокачественных опухолей лёгких, желудка, пищевода, печени и почек. Актуальным остается выбор индикаторов/маркеров, способных дать оценку взаимосвязей между биологической системой и потенциально опасными химическими факторами [1,4].

Материалы и методы исследования. Объектами исследований являлись дети в возрасте 4–8 лет ($n=111$): 57 чел. (группа наблюдения), проживающих в условиях повышенного содержания нитратов (превышение гигиенического норматива в 1,1 раза) в воде, используемой для питьевых целей, и 54 чел. (группа сравнения), проживающих на территории относительного санитарно-эпидемиологического благополучия (вода с нормативным содержанием нитратов). Дети посещали детские дошкольные образовательные

учреждения на территории Пермского края.

Оценка содержания N-нитрозодиметиламина в пробах питьевой воды выполнена газохроматографическим методом с использованием термодетектора. Методика позволяет выполнять определение N-нитрозодиметиламина в питьевой воде в диапазоне концентраций 0,005–0,1 мг/дм³ с погрешностью ± 20 % при доверительной вероятности 0,95. Исследование крови на содержание N-нитрозоаминов выполняли хромато-масс-спектрометрическим методом. Диапазон измеряемых концентраций N-нитрозоаминов составил от 0,002 до 0,1 мг/дм³ с погрешностью ± 27 % при доверительной вероятности 0,95.

Проведённое обследование детей включало в себя изучение маркеров клеточной дифференцировки (CD3⁺CD95⁺), определение уровня экспрессии белков, контролирующих процессы апоптоза – p53 и поверхностную экспрессию рецептора к фактору некроза опухоли (TNFR), методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCalibur с использованием соответствующих MKAT («BD», USA) и одновременным проведением процедуры отрицательного изотипического контроля. Идентифи-

Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, г. Пермь: **ДОЛГИХ Олег Владимирович** – д.м.н., зав. отделом, oleg@fcrisk.ru, ORCID: 0000-0003-4860-3145, **УЛАНОВА Татьяна Сергеевна** – д.м.н., зав. отделом, ORCID: 0000-0002-9238-5598, **АЛИКИНА Инга Николаевна** – м.н.с., ORCID: 0000-0002-2057-9828, **ЧЕЛАКОВА Юлия Александровна** – м.н.с., ORCID: 0000-0002-9421-6536, **НУРИСЛАМОВА Татьяна Валентиновна** – д.м.н., зав. лаб., ORCID: 0000-0002-2344-3037.

кация медиатора межклеточной иммунной регуляции фактора некроза опухоли (ФНО) и показателей пролиферативных реакций карцино-эмбрионального антигена (КЭА) и СА 199 проводилась методом иммуноферментного анализа на анализаторе «Elx808IU».

У всех обследуемых были изучены полиморфизм (SNP) генов *CYP1A1_3*, *MTHFR*, *CPOX*, *SULT1A1*, *SOD*, система генов пероксисом *PPAR*, *FAS*, *FOXP3*, *VEGF*, *APO-E*, *NO-синтаза*, *MMP9*, *p53*, *NR3C1*. Генетический материал был выделен из периферической крови с помощью набора для экстракции ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» (НекстБио, Россия). Полиморфизм генотипировали с использованием наборов «SNP-скрин» (Синтол, Россия) на приборе CFX96 Real Time System. Оценка частот полиморфизмов генов на соответствие произведена по равновесию Харди-Вайнберга. Анализ средних показателей относительно нормальных уровней представлен на диаграммах в виде $\bar{x} \pm SE$. Значимыми считались результаты с уровнем $p < 0,05$. Для парных сравнений также использовалась поправка Бонферрони, устанавливающая уровень значимости $p < 0,008$ (менее 1%).

Результаты и обсуждение. Установлены повышенные уровни содержания нитратов и N-нитрозодиметиламина в воде (соответственно в 4,7 раза и 2,5 раза) по отношению к территории сравнения (табл. 1). Установлено, что длительная экспозиция нитратами и N-нитрозодиметиламином с питьевой водой при содержании их в диапазоне концентраций 45-51,7 и 0,01-0,016 мг/дм³ соответственно формирует повышение концентрации в крови детей группы наблюдения N-нитрозодиметиламина в 1,5 раза ($0,0045 \pm 0,0014$ мг/дм³) относительно

детей группы сравнения ($0,003 \pm 0,0009$ мг/дм³). Химический анализ позволил определить в моче детей группы наблюдения нитраты на уровне 66,6 мг/дм³, что в 1,5 раза выше, чем в моче детей группы сравнения (43,7 мг/дм³).

Установлен достоверно сниженный по отношению к норме уровень мембранного активационного маркера CD3⁺CD95⁺ (у 100% детей), транскрипционного фактора p53 (у 87% детей) и рецептора TNFR (у 100,0% детей), отвечающих за апоптоз ($p < 0,05$) (табл. 2). Использование методического приема оценки отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации загрязнителей в биологических средах позволило установить достоверное ($p < 0,05$) понижение CD3⁺CD95⁺ при увеличении концентрации N-нитрозодиметиламина в крови ($R^2 = 0,91$, при $p < 0,05$). Достоверно снижено в 3 раза, по отношению к контрольной группе, содержание фактора некроза опухоли. Повышенный уровень фетального белка СА 199 зафиксирован в сыворотке крови у 2 % детей, проживающих на территории наблюдения. Установлено достоверное ($p < 0,05$) повышение концентрации СА 199, КЭА при увеличении концентрации N-нитрозодиметиламина в крови ($R^2 = 0,74$ при $p < 0,05$). Показан высокий уровень специфической сенсibilизации к N-нитрозодиметиламину по критерию IgG (93% обследованных группы наблюдения, $p < 0,05$) с достоверным различием с группой сравнения (превышение в 2,2 раза, $p < 0,05$).

Результаты генетического анализа позволили выявить ключевые гены, частота полиморфизмов которых достоверно отличалась от средней по региону распространенности полиморфных отклонений (табл. 3). Изменен полиморфизм генов детоксикации и

оксигенации: ген метилентетрагидрофолатредуктазы *MTHFR*, а также гены пролифератора пероксисом (*PPARA*, *PPARG*, *PPARGC1A*), связанные со 2-й фазой детоксикации ксенобиотиков – конъюгацией (частота мутантного аллеля превышала аналогичную в группе контроля более чем в 1,5 раза).

Увеличение частоты аллеля Т гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR* rs1801133) и частоты аллеля А гена онкопролиферации *BRCA1* rs3950989, а также повышенная в 1,5–2,0 раза частота встречаемости вариантных аллелей генов металлопротеиназы 9 (*MMP9* rs17576), цитохрома (*CYP1A2* rs2069522), копропорфириногеноксидазы (*CPOX* rs1131857) в группе детей, потребляющих воду с повышенным содержанием нитратов, характеризуют их как группу риска развития процессов, ассоциированных с фолатным циклом, обменом гомоцистеина и коллагена (нарушение функции эндотелия сосудов), детоксикацией и метаболизмом гаптенных, онкологических процессами.

Повышенная частота встречаемости минорного аллеля гена фермента *BRCA1* rs3950989 достоверно ассоциирована с дефицитом уровня фактора некроза опухоли (TNFR), что указывает на формирование дополнительных факторов риска канцерогенеза в условиях геохимической провинции (табл. 3).

По результатам выполненных исследований можно предположить, что в условиях хронической экспозиции нитратами в концентрациях, не вызывающих острые эффекты, выявляются скрытые изменения иммунологических и биохимических показателей, ассоциированных с полиморфным генетическим фоном. Проведенными на примере Пермского края исследованиями подтверждено, что поступающие с водой избыточные концентрации нитратов, метаболизируясь до N-нитрозаминов на фоне измененного генетического фона, запускают иммуноопосредованный механизм пролиферативных сдвигов в гомеостазе, которые характеризуются дисбалансом мембранных и транскрипционных факторов апоптоза.

Заключение. Установлено, что длительная экспозиция нитратами с питьевой водой в диапазоне концентраций 45-51,7 мг/дм³ и N-НДМА при содержании 0,01-0,016 мг/дм³ формирует повышенные в 1,5 раза концентрации N-НДМА в крови детей экспонированной группы ($0,0045 \pm 0,0014$ мг/дм³) относительно детей группы сравнения ($0,003 \pm 0,0009$ мг/дм³). Наблюдалась

Таблица 1

Содержание нитратов в воде и моче, N-нитрозодиметиламина в крови детей групп сравнения и наблюдения (разовые концентрации нитратов и N-нитрозодиметиламина в питьевой воде за весенне-летний период, n=95)

Питьевая вода, мг/дм³ (P ≤0,005)			
концентрация нитратов		концентрация N-нитрозодиметиламина	
ПДК=45 мг/дм³		ПДК=0,01 мг/дм³	
Среднее арифметическое			
группа сравнения	группа наблюдения	группа сравнения	группа наблюдения
10,9±2,7	51,7±12,92	0,0065±0,001	0,016±0,003
Биологические среды, мг/дм³			
концентрация нитратов в моче		концентрация N-нитрозодиметиламина в крови	
Медиана		Среднее арифметическое	
группа сравнения	группа наблюдения	группа сравнения	группа наблюдения
43.7	66.6	0.003±0.0009	0.0045±0.0014

Таблица 2

Показатели иммунитета у детей в условиях экспозиции нитратами
(Пермский край)

Показатель	Норма	Группа наблюдения, <i>M±m</i>	Группа сравнения, <i>M±m</i>
CD3 ⁺ CD95 ⁺ - лимфоциты, отн., %	15-25	7,65±1,07*/**	12,833±2,28
p53, %	1,2-1,8	0,324±0,11*	0,522±0,10
TNFR, %	1-1,5	0,514±0,187**	1,418±0,301
СА-19-9, единиц/см ³	0-35	18,07±2,2**	10,06±3,20
КЭА (карцино-эмбрион. антиген), нг/см ³	0-2,9	6,35±0,08**	1,001±0,17
Фактор некроза опухолей, пг/см ³	0-6	2,824±1,43**	8,199±3,85
Специфический IgG к нитрозодиметиламину, у.е.	0-0,1	0,176±0,033**	0,115±0,022

* Разница достоверна относительно референтного уровня ($p < 0,05$).

** Разница достоверна относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 3

Особенности генетического полиморфизма в условиях техногенного
воздействия - ген *BRCA1*, ассоциированный с экспрессией TNFR

Ген <i>BRCA1</i> / ответ TNFR				
генотип	группа	n	X (s.e)	OR (CI 95%)
G/G	Контроль	10	0,97(0,31)	0,00
G/A		12	0,77(0,16)	-0,17(-1,22-0,87)
A/A		6	1,61(0,35)	0,60(-0,66-1,86)
G/G	Исследуемая группа	14	2,34(0,29)	0,00
G/A		30	1,20(0,28)	-1,16(-1,96-0,37)
A/A		8	0,98(0,49)	-1,38(-2,46-0,30)

достоверная гиперпродукция специфического IgG к N-НДМА ($p < 0,05$) как по отношению к референтному значению, так и по отношению к группе сравнения. Установлены изменения клеточного звена иммунитета: угнетение Т-клеточных рецепторов CD3CD95⁺ транскрипционного фактора p53 и рецептора TNFR, увеличение экспрессии онкомаркеров, ассоциированной с ростом концентрации N-НДМА в крови, достоверные по отношению к рефе-

рентному уровню и группе сравнения. Результаты анализа полиморфизма генов выявили избыточную частотность минорного аллеля гена МТГФР (*MTHFR*), генов пролифератора пероксисом *PPARA* и первой фазы детоксикации копропорфириногеноксидазы (*CPOX*) и цитохрома (*CYP1A2*), онкопролиферации (*BRCA1*), характеризующих генетические полиморфные варианты дисбаланса процессов метаболизма. Повышение у контами-

нированных N-НДМА детей частоты встречаемости минорного аллеля гена фермента *BRCA1* rs3950989 достоверно ($p = 0,016$) ассоциировано с дефицитом уровня фактора некроза опухоли (TNFR), что указывает на формирование дополнительных факторов риска процессов канцерогенеза в условиях нитратной геохимической провинции. А условия хронической экспозиции нитратами в концентрациях, не вызывающих острые эффекты, выявляют скрытые изменения иммунологических и биохимических показателей, ассоциированных с полиморфным генетическим фоном.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Нитраты и нитриты. Влияние на организм человека. [Электронный ресурс].-2009. URL: http://prodobavki.com/modules.php?article_id=96&name=articles
2. Nitrates and nitrites. Influence on the human body [Electronic resource.]-2009.URL: http://prodobavki.com/modules.php?article_id=96&name=articles.
3. Особенности иммунной и генетической дезадаптации у детей в условиях избыточной гаптенной нагрузки / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, К.П. Лужецкий [и др.] // Российский иммунологический журнал. 2014; 8(3): 299-302
4. Peculiarities of immune and genetic disadaptation in children under excess haptenic load / O.V. Dolgikh, N.V. Zaitseva, K.P. Luzhetskiy [et al.] // Rossijskij immunologicheskij zhurnal. – 2014. – №8 (3). – P. 299-302.
5. Calderon R. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water / R. Calderon // Food and Chemical Toxicology. 2000; 38: 13-20. DOI: 10.1016 / S0278-6915 (99) 00133-7.
6. Duramad P. Holland N.T. Biomarkers of immunotoxicity for environmental and public health research / P. Duramad, N.T. Holland. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2011; 8 (5): 1388-1401.
7. The emerging biology of the nitrite anion / M.T. Gladwin, A.N. Schechter, D.B. Kim-Shapiro [et al.] // Nature chemical biology. 2005; 1: 308-314.