

ISSN 1028-7221

Том 9 (18), Номер 2 (2)

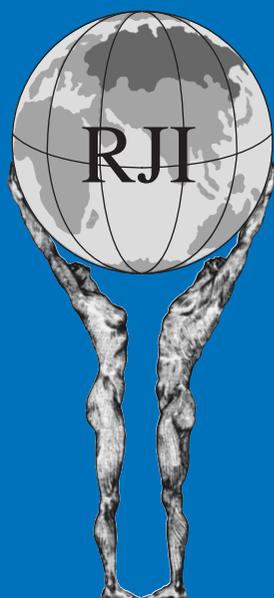
Август 2015

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES



<http://www.naukaran.ru>



НАУКА

вечающих за особенности иммунорегуляции и детоксикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцева Н. В., Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Вайсман Я. И. SNP-особенности у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции Вестник Башкирского университета. 2014, 19, 4, 1185-1188.
2. Noonan J. P., Coop G., Kudaravalli S., Smith D., Krause J., Alessi J., Chen F., Platt D., Pääbo S., Pritchard J. K., Rubin E. M. (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. Science 314, 1113-1118.
3. Goldberg S. M., Johnson J., Busam D., Feldblyum T., Ferreira S., Friedman R., Halpern A., Khouri H., Kravitz S. A., Lauro F. M., Li K., Rogers Y. H., Strausberg R., Sutton G., Tallon L., Thomas T., Venter E., Frazier M., Venter J. C. (2006). A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 11240-11245
4. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Лужецкий К. П., Андреева Е. Е. Особенности иммунной и генетической дезадаптации у детей в условиях избыточной гаптенной нагрузки // Российский иммунологический журнал. 2014, 8 (17), 3, 299-302
5. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Старкова К. Г., Лучникова В. А., Пирогова Е. А. Характеристика генотипов детей и взрослых, проживающих в условиях воздействия химических факторов риска. Анализ риска здоровью. 2015, 1, 55-59

PECULIARITIES OF THE DETECTION OF GENETIC POLYMORPHISM BY MEANS OF TARGET SEQUENCING ON LIQUID BIOCHIPS UNDER CONDITIONS OF STRONTIUM EXPOSURE

Dolgikh O. V., Zaitseva N. V., Krivtsov A. V., Bubnova O. A.

27 human genes were studied and their structure was decoded by means of target sequencing method. The special liquid biochip was developed which allows to unify the studies and to compare the received data to the reference sequence and individuals' data to each other. Differences in polymorphisms were found in over two hundred points in every single individual. The assessment of genes' variability using the sequence results and PCR allowed detecting the predominant polymorphism of the following genes: CYP1A2, TLR4, FAS, FOXP3, TP53, HLADRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1 which are responsible for the peculiarities of immunoregulation and detoxication.

Key words: immunoregulation genes, sequencing, strontium

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ИММУННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ ХЛОРОФОРМОМ

Долгих О. В.^{1,2,3}, Старкова К. Г.¹, Дианова Д. Г.¹,
Вдовина Н. А.¹, Лучникова В. А.¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; ²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; ³ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Особенности изменения иммунных показателей и регуляции апоптоза у детей в условиях повышенной концентрации в питьевой воде хлороформа определяются увеличением содержания IgE общего и специфического IgG к хлороформу, угнетением экспрессии CD25 и CD95 T-клеточных рецепторов, снижением интенсивности процесса апоптоза, ассоциированного с нарушением процессов его запуска через TNFR1 и Fas-рецептор, а также контролирующей функции белка p53.

Ключевые слова: CD-маркеры, апоптоз, хлороформ

Введение. Сохранение здоровья детского населения является важнейшей задачей в условиях постоянно нарастающего техногенного изменения среды обитания. Мониторинг показателей функционирования иммунной системы позволяет адекватно и своевременно оценить адаптивный резерв и устойчивость организма в связи со спецификой окружающего воздействия [1–5].

Цель работы – оценить иммунные маркерные показатели и апоптоз у детского населения, проживающего в условиях загрязнения питьевой воды хлороформом.

Были обследованы 89 детей в возрасте от 3 до 7 лет, которые потребляют воду с повышенным содержанием хлороформа. В группу сравнения вошли 46 детей с благополучной по данному показателю территории.

Содержание хлороформа в воде и биосредах детей определяли с помощью газовой хроматографии. Концентрацию IgE общего и фактора некроза опухоли (TNFальфа) – иммуноферментным анализом. Для определения специфических антител IgG к хлороформу применяли модифицированный метод аллергосорбентного тестирования. Фенотипирование лимфоцитов, экспрессирующих молекулы, участвующие в процессе апоптоза: рецептор к TNFальфа (TNFR1+) и транскрипционный белок p53, осуществляли с помощью проточной цитометрии методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием меченых моноклональных антител, при этом суммарно регистрируя не менее 10000 событий. Интенсивность апоптоза изучали по экспрессии на мембране клеток фосфатидилсерина с помощью меченого

аннексина V (Annexin V-FITC) и фрагментированной ДНК с помощью красителя 7-AAD (7-amino-actinomycin D).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью описательной статистики и t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Анализ качественного состава воды источников хозяйственно-бытового водоснабжения на территории наблюдения выявил несоответствие установленным гигиеническим нормативам по хлороформу (до 0,59 мг/дм³ при ПДК 0,2 мг/дм³). Исследование образцов крови детей обследованной группы показало присутствие хлороформа, в 2 раза превышающее показатели в группе сравнения (0,0008±0,0002 мг/см³ и 0,0004±0,0001 мг/см³ соответственно).

При этом у 33,3% обследованных детей показано значительное повышение уровня общей сенсибилизации, кратность превышения составила в 2,5 раза относительно физиологической нормы (109,395±40,716 МЕ/дм³ при норме <50,0 МЕ/дм³, $p < 0,05$) при отсутствии достоверных отклонений от группы сравнения. Одновременно в 41,8% случаев зафиксировано превышение референтного интервала по содержанию специфических IgG к хлороформу, в среднем в 2,6 раза (0,125±0,038 у.е. при норме <0,06 у.е., $p < 0,05$).

Параметры CD-иммунограммы (таблица) находились в пределах референтного диапазона за исключением снижения активационного маркера CD95 у 63,3% обследованных детей, а также CD25 у 26,7% группы наблюдения ($p < 0,05$).

Таблица. Изменение маркеров апоптоза и иммунной регуляции у детей в условиях загрязнения питьевой воды хлороформом

Показатель	Группа сравнения	Группа наблюдения
CD3 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,176±0,057	0,126±0,016*/**
CD3 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоциты,%	6,857±1,559	4,933±0,459*
CD3 ⁺ CD95 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /дм ³	0,557±0,108	0,366±0,047*/**
CD3 ⁺ CD95 ⁺ -лимфоциты,%	16,714±1,295	14,4±0,54*
Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁺ ,%	10,323±0,412	8,733±0,755**
Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁻ ,%	2,073±0,517	1,949±0,307
TNFальфа, пг/см ³	1,417±1,757	2,179±0,195
TNFR1 ⁺ ,%	0,866±0,282	0,392±0,13*/**
p53,%	1,413±0,552	0,585±0,126*/**

Примечание: * – разница достоверна относительно референтного интервала ($p < 0,05$); ** – разница достоверна относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

Достоверное уменьшение абсолютного количества CD95⁺- и CD25⁺-лимфоцитов в 1,4 и 1,2 раза соответственно также отмечено по отношению к группе сравнения.

Изучение особенностей регуляции апоптоза у обследованных детей показало негативные тенденции, связанные с нарушением процесса его запуска как через Fas-рецептор (CD95), так и рецептор TNFRI, достоверно сниженная экспрессия которого относительно референтного диапазона наблюдалась у 93,3% детей. Достоверные различия в продукции лиганда TNFальфа отсутствовали. В то же время отмечено значительное уменьшение клеток, экспрессирующих маркер p53, обладающий проапоптотической активностью, в среднем в 2,4 раза относительно показателей в группе сравнения ($p < 0,05$).

Количество Annexin V-FITC⁺7AAD⁺ клеток относительно контрольных параметров было снижено в 1,2 раза ($p < 0,05$), влияние на Annexin V-FITC⁺7AAD⁻ клетки проявилось только в виде тенденции.

Таким образом, анализ иммунологических показателей и маркеров апоптоза у детей, проживающих на территории с повышенным содержанием хлороформа в питьевой воде, выявил увеличение уровня общей и специфической к хлороформу сенсibilизации организма, угнетение T-клеточных рецепторов,

а также снижение интенсивности апоптоза, связанного с нарушением процесса его запуска и регуляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Лужецкий К. П., Андреева Е. Е. Особенности иммунной и генетической дезадаптации у детей в условиях избыточной гаптенной нагрузки. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (17), 299-302.
2. Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A and Lei DKY: Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell International* 9:29, 2009. doi:10.1186/1475-2867-9-29.
3. Дианова Д. Г., Зайцева Н. В., Долгих О. В. Особенности апоптотической программы лимфоцитов в условиях техногенного загрязнения. *Лечебное дело*. 2013, 4, 41-45.
4. Looi CY, Moharram B, Paydar M, Wong YL, Leong KH, Mohamad K, Arya A, Wong WF and Mustafa MR: Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:166; doi:10.1186/1472-6882-13-166, 2013.
5. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г. Апоптотический сигналинг и его регуляция стронцием. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: мат. Международной конференции, Пушкино, 25-28 мая 2015 г., 547-552

PECULIARITIES OF IMMUNE CHANGES AND MARKERS OF APOPTOSIS IN CHILDREN UNDER CHLOROFORM CONTAMINATION OF DRINKING WATER

Dolgikh O. V., Starkova K. G., Dianova D. G.,
Vdovina N. A., Luchnikova V. A.

Features of immune changes and regulation of apoptosis in children under high concentrations of chloroform in drinking water are determined by increasing content of total IgE and IgG specific to chloroform, reduced expression of CD25 and CD95 T-cell receptors, decrease in apoptosis intensity associated apparently with dysregulation of apoptosis process via TNFRI and Fas-receptor, as well as of controlling function of p53 protein.

 Авторский указатель

А		Зурочка А. В.	30
Абрамовских О. С.	22	Зурочка В. А.	30
Аклеев А. А.	3, 6	И	
Анисимов А. П.	120	Иванов С. А.	120
Б		К	
Базилян Э. А.	48	Калмантаева О. В.	120
Барышева О. Ю.	126	Кишкин А. М.	71
Безрученко Н. В.	110	Климов В. В.	35
Бейкин Я. Б.	53, 57	Козлов И. Г.	48
Блинова Е. А.	8	Колупаева И. Л.	37
Борисов А. Г.	42, 99	Колупаев В. А.	37
Бубнова О. А.	17	Копылов П. Х.	120
В		Костенко Е. И.,	40
Вдовина Н. А.	19, 110	Кошовкина Т. В.	35
Везикова Н. Н.	126	Кравченко П. Н.	126
Волошина М. А.	35	Кривцов А. В.	17, 110
Г		Кробинец И. И.	42, 99
Гапонов А. М.	11	Кудрявцев И. В.	42, 99
Гапонов М. А.	11	Кшнясев И. А.	80
Горбатов А. А.	120	Л	
Гребенчиков О. А.	11	Лабис В. В.	48
Гриценко В. А.	30	Лагерева Ю. Г.	53, 57
Д		Лучникова В. А.	19
Давыдова А. Я.	42	Ляпунов В. А.	60
Давыдова Е. В.	14	М	
Дентовская С. В.	120	Макарова Н. А.	62
Дианова Д. Г.	19	Марусенко И. М.	126
Добрынина М. А.	30	Медведев Б. И.	115
Долгих О. В.	17, 19	Мезенцева Е. А.	105
Долгушин И. И.	6, 22	Михайлова И. В.	65
Дровосекова И. В.	97	Морозова О. С.	68
Е		Мякишева Э. Н.	94
Ерыгина Е. Н.	24, 92	Н	
Ж		Никушкина К. В.	105
Железнова А. Д.	122	О	
Жулай Г. А.	126	Олейник В. М.	126
З		Олейник Е. К.	126
Забозлаева И. В.	26	Осиков М. В.	71, 74
Зайцева Н. В.	17	П	
Захаров Ю. М.	62	Павлов В. М.	120
Зуева Е. Б.	30	Панфилова Т. В.	122
		Пашнина И. А.	77, 80

Авторский указатель

Пиневич А. А.	83	Степанова О. В.	112
Пирогова Е. А.	110	Сюндюкова Е. Г.	115
Писарев В. М.	11	Т	
Пискалова Т. П.	40, 112	Телешева Л. Ф.	71
Плосконос М. В.	86, 89	Терехина Л. А.	83
Привалова Г. Р.	22	Тляубердина А. З.	97
Прозоровская Е. Л.	99	Торопова Л. Р.	22
Прокопьева О. Б.	94	Тутельян А. В.	11
Р		У	
Рафикова Ю. С.	97	Устьянцева Л. С.	60
Ремизова И. И.	60	Ф	
Романова Н. В.	24, 92	Филатенкова Т. А.	117
Романов В. А.	24, 92	Филиппова Ю. В.	122
Рыбина И. В.	57	Фирстова В. В.	120
С		Фомичева Е. Е.	117
Савочкина А. Ю.	22, 94	Фролов Б. А.	122
Савченко А. А.	42, 99	Х	
Саядгалина О. Т.	74	Хайдуков С. В.	11, 48
Саликова Т. И.	35	Ч	
Самойлович М. П.	83	Чайникова И. Н.	122
Сарычева Ю. А.	122	Чистякова Г. Н.	60
Сашенков С. Л.	37, 115	Чуров А. В.1	126
Семенова И. Н.	97	Ш	
Серебрякова М. К.	42, 99	Шанин С. Н.	117
Сизова С. В.	48	Щ	
Симонян Е. В.	74	Щеголева Л. С.	68
Синеглазова А. В.	105		
Смолягин А. И.	65, 122		
Старкова К. Г.	19, 110		