

© ДОЛГИХ О.В., НИКОНОШИНА Н.А., 2023



Долгих О.В., Никоношина Н.А.

Аэрогенная экспозиция бенз(а)пиреном детей как фактор модификации генетически детерминированной клеточной гибели

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь, Россия

Введение. Изучение особенностей генетически детерминированной гибели клеток у детей в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном является актуальным в аспекте идентификации иммунологических и генетических маркеров воздействия техногенных химических факторов.

Материалы и методы. Обследованы 569 детей дошкольного возраста. Группа наблюдения — дети, проживающие в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном ($n = 384$), группа сравнения — дети, проживающие на условно чистой территории ($n = 185$). Определение содержания бенз(а)пирена в атмосферном воздухе и в крови проводили методом ВЭЖХ. Определение AnnexinV-FITC⁺7AAD⁻, AnnexinV-FITC⁺7AAD⁺, Bax, Bcl-2, CD95⁺, p53, TNFR выполняли методом проточной цитофлуориметрии, изучение полиморфизма генов FAS (rs1159120) и TP53 (rs1042522) — методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Аэрогенная экспозиция бенз(а)пиреном (7,4 ПДКсс) при его поступлении в дозе 0,000163 мг/(кг × день) обуславливает повышение уровня контаминации крови детей относительно группы сравнения и референтного уровня. Изменения иммунного профиля обследованного контингента (повышение содержания маркеров апоптоза AnnexinV-FITC⁺7AAD⁻-клеток, CD3⁺CD95⁺-лимфоцитов, p53, TNFR на фоне компенсаторной гиперпродукции антиапоптотического белка Bcl-2) ассоциированы с C-аллелем ($OR = 1,38$; 95% CI = 1,02–1,88; $p < 0,05$) и с CC-генотипом ($OR = 2,53$; 95% CI = 1,72–3,72; $p < 0,05$) гена FAS (rs1159120), а также с C-аллелем ($OR = 1,96$; 95% CI = 1,53–2,53; $p < 0,05$) и CC-генотипом ($OR = 2,53$; 95% CI = 1,72–3,72; $p < 0,05$) гена TP53 (rs1042522).

Ограничения исследования. Ограничения на проведение исследований, связанные с возможностью применения выбранных методов, характеристиками объектов исследования, отсутствовали.

Заключение. Ассоциированные с контаминацией крови бенз(а)пиреном изменения иммунного профиля (избыток AnnexinV-FITC⁺7AAD⁻-клеток и CD3⁺CD95⁺-лимфоцитов, p53, TNFR, Bcl-2), сопряжённые с C-аллелем ($OR = 1,38$; 95% CI = 1,02–1,88; $p < 0,05$) и CC-генотипом ($OR = 2,53$; 95% CI = 1,72–3,72; $p < 0,05$) гена FAS (rs1159120), а также с C-аллелем ($OR = 1,96$; 95% CI = 1,53–2,53; $p < 0,05$) и CC-генотипом ($OR = 2,53$; 95% CI = 1,72–3,72; $p < 0,05$) гена TP53 (rs1042522), формируют риски нарушений запрограммированной клеточной гибели у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном, при его поступлении в дозе более 0,000163 мг/(кг × день).

Ключевые слова: бенз(а)пирен; дети; апоптоз; иммунный профиль; генетический полиморфизм

Соблюдение этических стандартов. Исследование выполнено с соблюдением этических требований Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследование одобрено ЛЭК ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 23 от 20.12.2021 г.). Было получено информированное согласие законных представителей участников исследования.

Для цитирования: Долгих О.В., Никоношина Н.А. Аэрогенная экспозиция бенз(а)пиреном детей как фактор модификации генетически детерминированной клеточной гибели. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(5): 482–487. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-5-482-487> <https://elibrary.ru/weyfqf>

Для корреспонденции: Никоношина Наталья Алексеевна, мл. науч. сотр. лаб. иммунологии и аллергологии, аспирант ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». E-mail: nat08.11@yandex.ru

Участие авторов: Долгих О.В. — концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста; Никоношина Н.А. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание и редактирование текста. *Все соавторы* — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 09.03.2023 / Принята к печати: 31.05.2023 / Опубликована: 20.06.2023

Oleg V. Dolgikh, Natalya A. Nikonoshina

Aerogenic exposure of benzo(a)pyrene in children as the modification factor of genetically determined cell death

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Perm, 614045, Russian Federation

Introduction. The study of genetically determined cell death features in children under the conditions of aerogenic exposure to benzo(a)pyrene is relevant in the identification of immunological and genetic markers of technogenic chemical factor exposure.

Materials and methods. Five hundred sixty nine preschool children were examined. Observation group included 384 children living under the conditions of aerogenic exposure to benzo(a)pyrene. Comparison group consisted of 185 children living in a relatively clean area. Determination of the content of benzo(a)pyrene in atmospheric air and in blood was carried out by HPLC. Determination of Annexin-FITC⁺7AAD⁻, Annexin-FITC⁺7AAD⁺, Bax, Bcl-2, CD95⁺, p53, TNFR was made by flow cytometry. The study of FAS (rs1159120) and TP53 (rs1042522) gene polymorphism was performed by real-time PCR.

Results. The aerogenic benzo(a)pyrene exposure (7.4 MPCad) at a dose of 0.000163 mg/(kg · day) causes an increase in the level of contamination in children blood relative to the comparison group and the reference level ($p < 0.05$). Changes in the immune profile of the examined contingent (increased content of apoptosis markers — Annexin-FITC⁺7AAD⁻-cells, CD3⁺CD95⁺-lymphocytes, p53, TNFR against the background of compensatory anti-apoptotic protein Bcl-2 hyperproduction) are associated with the C-allele ($OR = 1.38$; 95% CI: 1.02–1.88, $p < 0.05$); and CC-genotype ($OR = 2.53$; 95% CI: 1.72–3.72, $p < 0.05$) of FAS gene (rs1159120), and the C-allele ($OR = 1.96$; 95% CI: 1.53–2.53, $p < 0.05$) and CC-genotype ($OR = 2.53$; 95% CI: 1.72–3.72, $p < 0.05$) of TP53 gene (rs1042522).

Limitations. There are no restrictions on conducting research related to the possibility of using the selected methods and the characteristics of the objects of research.

Conclusion. Changes in the immune profile associated with blood contamination with benzo(a)pyrene (excess of AnnexinV-FITC⁺7AAD⁻ and CD3⁺CD95⁺-lymphocytes, p53, TNFR, Bcl-2 cells) are associated with the C-allele ($OR = 1.38$; 95% CI: 1.02–1.88, $p < 0.05$); and CC-genotype ($OR = 2.53$;

Original article

95% CI: 1.72–3.72, $p < 0.05$) of FAS gene (rs1159120), and C-allele (OR=1.96; 95% CI: 1.53–2.53, $p < 0.05$) and CC-genotype (OR=2.53; 95% CI: 1.72–3.72, $p < 0.05$) of TP53 gene (rs1042522) form the risks of programmed cell death violations in children living under the conditions of aerogenic exposure to benzo(a)pyrene, when it is entered the body at a dose of more than 0.000163 mg/(kg · day).

Keywords: benzo(a)pyrene; children; apoptosis; immune profile; genetic polymorphism

Compliance with ethical standards. The study was carried out in compliance with the ethical requirements of the Helsinki Declaration of the WMA 2000 and the Protocol of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine 1999. The study was approved by the LEC of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being (Protocol No. 23 of 12/20/2021). Informed consent was obtained for all participants.

For citation: Dolgikh O.V., Nikonoshina N.A. Aerogenic benzo(a)pyrene exposure in children as the modification factor of genetically determined cell death. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(5): 482–487. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-5-482-487> <https://elibrary.ru/weyfqf> (In Russ.)

For correspondence: Natalya A. Nikonoshina, junior research associate of the laboratory of immunology and allergology, post-graduate student of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: nat08.11@yandex.ru

Information about the authors:

Nikonoshina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-7271-9477>

Dolgikh O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4860-3145>

Contribution: Dolgikh O.V. – concept and design of research, writing and editing of text; Nikonoshina N.A. – collection and processing of material, statistical processing, writing and editing of text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: March 9, 2023 / Accepted: May 31, 2023 / Published: June 20, 2023

Введение

Антропогенные химические факторы окружающей среды оказывают негативное влияние на состояние здоровья детского населения урбанизированных территорий [1]. Иммунная система играет важную роль в процессах адаптации организма и восстановления гомеостаза в условиях избыточной техногенной нагрузки благодаря высокой пластичности иммунорегуляторных процессов и реакций. Вместе с тем хроническая экспозиция химическими соединениями с иммунотоксическими свойствами может индуцировать ранние премоурбидные изменения иммунного профиля, поскольку иммунная система крайне чувствительна к воздействию химических факторов [2]. Апоптоз – это генетически запрограммированная и эволюционно сохраняемая гибель клеток, индуцированная экзогенными и эндогенными факторами различной природы и чрезвычайно важная для процесса эмбрионального развития и поддержания клеточного гомеостаза взрослого целостного организма [3, 4].

Бенз(а)пирен обладает выраженными канцерогенными и иммунотоксическими свойствами, обусловленными мутационными изменениями генетического материала клетки, а также цитотоксическими реакциями в условиях окислительного стресса [5]. Следовательно, избыточная техногенная экспозиция бенз(а)пиреном может индуцировать дисбаланс процессов клеточной пролиферации и запрограммированной клеточной гибели, повышая риск развития иммунодефицитных состояний при гиперактивации апоптоза иммунных клеток либо образования злокачественных новообразований при угнетении запрограммированной гибели клеток с генетическими нарушениями [6].

Адаптационный потенциал организма в условиях стрессорного воздействия техногенных факторов окружающей среды определяется не только характеристиками иммунного профиля и особенностями запрограммированной клеточной гибели, но и зависит от их генетической детерминированности. Определённые полиморфные варианты кандидатных генов иммунной регуляции могут быть ассоциированы с угнетением функциональной активности продуктов экспрессии – рецепторов, транскрипционных факторов и др., что способно привести к нарушениям иммунного ответа и апоптоза [7].

Следовательно, изучение молекулярных и клеточных индикаторных показателей запрограммированной клеточной гибели и её генетических детерминант у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном, представляется актуальным направлением идентификации

иммунологических и генетических маркёров воздействия техногенных химических факторов на здоровье детского населения урбанизированных территорий и дальнейшего использования в профилактике и ранней диагностике патологий, ассоциированных с нарушениями клеточного гомеостаза.

Материалы и методы

Проведено клинико-лабораторное обследование 569 детей дошкольного возраста (3–6 лет). Группа наблюдения – дети, проживающие на территории размещения промышленного предприятия цветной металлургии в Восточной Сибири с избыточным уровнем аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном ($n = 384$), группа сравнения – дети, проживающие на условно чистой территории ($n = 185$). Обследованные выборки сопоставимы по половозрастному, социальному и этническому составу.

Определение концентрации бенз(а)пирена в атмосферном воздухе территорий проживания обследованных детей проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., США) в соответствии с МУК 4.1.1273–03 «Измерение массовой концентрации бенз(а)пирена в атмосферном воздухе и воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием». Определение концентрации бенз(а)пирена в крови обследованных детей также проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., США), руководствуясь МУК 4.1.3040–12 «Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Идентификацию внутриклеточных и мембранных маркёров апоптоза выполняли методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием универсальной программы CellQuestPro. Определение уровня экспрессии CD95⁺-рецепторов на клеточной мембране лимфоцитов проводили с использованием панели меченых моноклональных антител к соответствующим CD-рецепторам (Becton Dickinson, США). Определение внутриклеточных маркёров и регуляторных факторов апоптоза – белков p53 и Bax – проводили с помощью моноклональных антител, конъюгированных с фикоэритрином (Becton Dickinson, США). Интенсивность запрограммированной гибели лимфоцитов оценивали по результатам окрашивания аннексином V-FITC и йодидом пропидия (Becton Dickinson, США).

Таблица 1 / Table 1

Уровень контаминации крови бенз(а)пиреном у детей, проживающих в условиях избыточной техногенной нагрузки
The level of blood contamination with benzo(a)pyrene in children living under conditions of excessive technogenic load

Показатель Indicator	Референтный уровень [10] Reference range [10]	Группа наблюдения Observation group <i>n</i> = 384 <i>X</i> ± <i>SE</i>	Группа сравнения Comparison group <i>n</i> = 185 <i>X</i> ± <i>SE</i>	<i>p</i>
Бенз(а)пирен (кровь), мкг/дм ³ Benzo(a)pyrene (blood), mcg/dm ³	0	0.002306 ± 0.000372*	0.001069 ± 0.000462	0.004

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – различия с референтным уровнем достоверны ($p < 0,05$).

Note: Here and in Table 2: * – differences with the reference interval are significant ($p < 0.05$).

У обследованных детей выполнен анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) гена рецептора запрограммированной клеточной гибели лимфоцитов FAS(CD95⁺) – FAS (rs1159120) и гена транскрипционного фактора, супрессора роста злокачественных образований – белка p53 – TP53 (rs1042522). Анализ проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе CFX96 Real Time System C1000 Thermal Cycler (BioRAD, Сингапур). ДНК для генотипирования была выделена из Buccal swab с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорбВ Форма 2 вариант 100» (ООО «НекстБио», Россия) сорбентным методом. Для определения генетического полиморфизма исследуемых генов использовали тест-системы («Синтол», Россия) – набор реагентов для определения SNP: C14405T гена FAS (rs1159120) и Arg72Pro гена TP53 (rs1042522). Определение генотипов проводили в специализированной программе TaqMan с использованием метода аллельной дискриминации.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена методами описательной математической статистики с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Характер распределения данных в обследованных выборках оценивали с использованием критерия Шапиро – Уилка. Для оценки уровня достоверности различий полученных данных применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента в случае нормального распределения данных либо *U*-критерий Манна – Уитни для значений показателей с ненормальным распределением. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического (*X*) и стандартной ошибки (*SE*) значений проанализированных показателей. Расчёт распределения частот генотипов и аллелей по равновесию Харди – Вайнберга, а также показателя отношения шансов *OR* и его 95%-го доверительно-интервала (CI) в группах наблюдения и сравнения про-

водился с помощью унифицированных онлайн-программ SNPStat и Gen-Expert для вычисления статистических параметров в исследованиях «случай – контроль», использующих SNP-диагностику однонуклеотидных полиморфизмов.

Результаты

Гигиеническая оценка качества атмосферного воздуха урбанизированной территории с избыточной техногенной нагрузкой показала, что средняя концентрация бенз(а)пирена в точках наблюдения составляет 7,4 ПДКсс, то есть наблюдается превышение действующих нормативов. При этом содержание бенз(а)пирена в атмосферном воздухе условно чистой территории сравнения определяется на уровне 0,8 ПДКсс и не превышает установленных нормативных значений при воздействии данного ПАУ. Средняя суточная доза аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном для детей в группе наблюдения составляет 0,000163 мг/(кг · день), тогда как для детей в группе сравнения – 0,000018 мг/(кг · день) [8, 9].

В результате проведённого химико-аналитического исследования биосред детского населения территории размещения промышленного предприятия цветной металлургии установлены признаки контаминации крови бенз(а)пиреном. Содержание бенз(а)пирена в крови 71,6% (275) детей группы наблюдения достоверно превышает как значение данного показателя в группе сравнения, так и его референтный нулевой уровень ($p < 0,05$) (табл. 1).

Иммунный профиль 66,2% (254) детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном на уровне 0,000163 мг/(кг · день), отличается достоверно повышенным содержанием Annexin V-FITC⁺7AAD⁻-клеток (процент с признаками раннего апоптоза $p < 0,05$), в то время как содержание Annexin V-FITC⁺7AAD⁺-клеток с признаками позднего апоптоза и некроза незначительно снижено по отношению к группе сравнения ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

Особенности запрограммированной клеточной гибели у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном
The features of programmed cell death determinants in children living under conditions of aerogenic benzo(a)pyrene exposure

Показатель Indicator	Референтный уровень [10] Reference range [10]	Группа наблюдения Observation group <i>n</i> = 384 <i>X</i> ± <i>SE</i>	Группа сравнения Comparison group <i>n</i> = 185 <i>X</i> ± <i>SE</i>	<i>p</i>
Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁻ -клетки, % (Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁻ -cells, %)	1.5–2.5	2.844 ± 0.494	1.323 ± 0.204	0.005
Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁺ -клетки, % (Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁺ -cells, %)	7–11	7.327 ± 1.038	8.330 ± 0.681	0.419
Vcl-2, %	1–1.5	2.492 ± 0.425*	0.494 ± 0.056	0.001
Vax, %	5–9	7.712 ± 0.748	7.875 ± 0.919	0.891
CD3 ⁺ CD95 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /л (CD3 ⁺ CD95 ⁺ -lymphocytes, 10 ⁹ /L)	0.4–0.7	0.527 ± 0.025	0.413 ± 0.037	0.011
CD3 ⁺ CD95 ⁺ -лимфоциты, % (CD3 ⁺ CD95 ⁺ -lymphocytes, %)	15–25	17.727 ± 0.733	12.000 ± 1.134	0.001
TNFR, %	1–1.5	3.857 ± 0.562*	0.568 ± 0.117	0.001
p53, %	1.2–1.8	7.747 ± 0.894*	1.873 ± 0.391	0.001

Таблица 3 / Table 3

Распределение частот аллелей и генотипов кандидатных генов запрограммированной клеточной гибели у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном**The allele and genotype frequency distribution of programmed cell death candidate genes in children living under conditions of under conditions of aerogenic benzo(a)pyrene exposure**

SNP	Генотип/аллель Genotype/Allele	Группа наблюдения Observation group <i>n</i> = 384	Группа сравнения Comparison group <i>n</i> = 185	OR		χ^2	<i>p</i>
				значение / meaning	95% CI		
<i>FAS</i> (rs1159120)	CC	0.682 (262)	0.587 (108)	1.51	1.05–2.17	3.88	0.049
	CT	0.279 (107)	0.364 (67)	0.67	0.46–0.98	–	–
	TT	0.039 (15)	0.049 (9)	0.79	0.34–1.84	–	–
	C	0.822	0.769	1.38	1.02–1.88	3.95	0.049
	T	0.178	0.231	0.72	0.53–0.98	–	–
<i>TP53</i> (rs1042522)	CC	0.470 (181)	0.259 (48)	2.53	1.72–3.72	23.07	0.002
	CG	0.351 (135)	0.443 (82)	0.68	0.47–0.97	–	–
	GG	0.179 (69)	0.297 (55)	0.52	0.34–0.78	–	–
	C	0.645	0.481	1.96	1.53–2.53	27.96	0.001
	G	0.355	0.519	0.51	0.40–0.66	–	–

Результаты изучения запрограммированной клеточной гибели у обследованных детей демонстрируют изменения уровней экспрессии и продукции мембранных и внутриклеточных маркеров и регуляторов апоптоза. Так, у 72,4% (278) детей в группе наблюдения установлено достоверное повышение абсолютного и относительного содержания лимфоцитов с мембранным маркером индукции апоптоза CD95⁺ – Fas-рецептора относительно группы сравнения ($p < 0,05$). У 76% (292) детей выявлены признаки гиперэкспрессии рецептора фактора некроза опухолей TNFR, при этом содержание клеток с данным рецептором достоверно превышает не только аналогичное значение в группе сравнения, но и установленный референтный уровень ($p < 0,05$). При этом у 72,4% (278) детей установлено повышение уровня экспрессии антиапоптотического регуляторного фактора Bcl-2, а содержание проапоптотического Bcl-2-ассоциированного X-белка Вах в обследованных группах определяется на сопоставимых уровнях ($p < 0,05$).

Установленные особенности иммунного профиля детского населения урбанизированной территории с избыточной экспозицией бенз(а)пиреном ассоциируются с полиморфными аллелями и генотипами генов *FAS* (rs1159120) и *Arg72Pro* гена *TP53* (rs1042522), продукты экспрессии которых участвуют в инициации запрограммированной клеточной гибели. Распределение частот аллелей и генотипов данных генов соответствует равновесию Харди – Вайнберга ($p < 0,05$) и описывается мультипликативной (тест χ^2 , $df = 1$) и аддитивной (тест Кохрана – Армитаджа для линейных трендов, $\chi^2 = [0,1,2]$, $df = 1$) моделями наследования (табл. 3).

Генетический профиль детей, проживающих в условиях избыточной гаптенной нагрузки, включающей экспозицию бенз(а)пиреном, отличается повышенной частотой С-аллеля (мультипликативная модель: $OR = 1,38$; 95% CI = 1,02–1,88; $p < 0,05$) и соответствующего СС-генотипа (типичная гомозигота, аддитивная модель: $OR = 1,51$; 95% CI = 1,05–2,17; $p < 0,05$), гена мембранного Fas-рецептора – CD95⁺-маркера лимфоцитов, инициирующего трансдукцию апоптотического сигнала *FAS* (rs1159120), по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$), что соотносится с выявленной гиперэкспрессией CD3⁺CD95⁺ кластера клеточной дифференцировки лимфоцитов.

Полиморфизм гена белка-супрессора злокачественных опухолей p53 *TP53* (rs1042522) характеризуется повышенной частотой С-аллеля (мультипликативная модель: $OR = 1,96$; 95% CI = 1,53–2,53; $p < 0,05$) и соответствующего СС-генотипа (типичная гомозигота, аддитивная модель:

$OR = 2,53$; 95% CI = 1,72–3,72; $p < 0,05$) по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$), что сопровождается повышенным уровнем экспрессии данного белка у 63,6% (244) детей в группе наблюдения по отношению к группе сравнения и к референтному интервалу ($p < 0,05$).

Обсуждение

Бенз(а)пирен является веществом I класса опасности с выраженными мутагенными, канцерогенными и иммуносупрессивными свойствами, обуславливающими дисбаланс процессов клеточной пролиферации и апоптоза и, как следствие, нарушение клеточного гомеостаза. Если рассматривать бенз(а)пирен как вещество с приоритетными канцерогенными свойствами, то его избыточная экспозиция, вероятно, должна способствовать снижению запрограммированной клеточной гибели, так как процесс образования злокачественных опухолей сопровождается избыточной клеточной пролиферацией и угнетением апоптоза клеток органов различной локализации [11]. Канцерогенные свойства бенз(а)пирена подробно описаны в научной литературе. Исследователи выделяют два основных варианта бенз(а)пирен-индуцированного канцерогенеза, связанных с образованием диоксидов или катионных радикалов. Диол-эпоксидный механизм канцерогенеза ассоциирован с образованием бенз(а)пирен-7,8-диол-9,10-эпоксида (BPDE) в результате его метаболизма с участием ферментов цитохрома P450 изоформы CYP1 и ковалентным связыванием с пуриновыми нуклеотидными основаниями с формированием цис- и транс-аддуктов ДНК, нарушающих процесс нормальной репликации ДНК и индуцирующих образований мутаций [12].

Радикально-катионный механизм бенз(а)пирен-зависимого канцерогенеза заключается в одноэлектронном окислении бенз(а)пирена ферментами цитохрома P450 или пероксидазой до образований катионного радикала на атоме углерода С6, который ковалентно связывается с гуанином и аденином, образуя ряд ДНК-аддуктов [13].

Однако результаты нашего исследования, напротив, указывают на избыточность запрограммированной клеточной гибели в условиях экспозиции бенз(а)пиреном на уровне 0,000163 мг/(кг × день). В литературе также имеются данные о том, что стрессорное воздействие бенз(а)пирена может способствовать развитию иммуносупрессии и иммунодефицитных состояний, а также ряда патологий ЦНС, включая нейродегенеративные заболевания, которые развиваются

вследствие избыточности запрограммированной клеточной гибели иммунцитов или нейронов [14].

Проапоптотическая активность бенз(а)пирена основана на изменении окислительно-восстановительного равновесия на фоне окислительного стресса, так как активация ферментов цитохрома P450 может способствовать образованию супероксидных анионов и, как следствие, развитию окислительного стресса. Бенз(а)пирен индуцирует образование активных форм кислорода, воздействуя на передачу сигналов в системе «активные формы кислорода (ROS) / индуцируемый гипоксией 1-альфа (HIF-1 α) фактор / гемоксигеназа 1 (HO-1)» [15]. Также показано, что бенз(а)пирен существенно снижает антиоксидантный потенциал организма путём ингибирования активности каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GSH-Px), супероксиддисмутазы (SOD), глутатион-S-трансферазы (GST) и глутатионредуктазы (GR) вследствие нарушения экспрессии соответствующих генов. Кроме того, бенз(а)пирен снижает уровень восстановленного глутатиона (GSH) и витаминов С и Е, повышает уровень перекисного окисления липидов и карбонилирования белков при гиперпродукции фермента цитохрома P450 CYP1A1 и провоспалительных цитокинов [16, 17].

Другой вариант проапоптотической активности бенз(а)пирена связан с транскрипционной регуляцией репарации ДНК в восстановлении целостности ДНК после генотоксического стресса. Так, бенз(а)пирен способен угнетать ответ на повреждение клеточной ДНК, индуцируя транскрипционную репрессию генов мисмэтч-репарации *MSH2*, *MSH6* и *EXO1*, гена центрального компонента гомологичной рекомбинационной репарации *RAD51*, что является маркёром раннего старения клеток, вызванного генотоксическим стрессом. Предполагается, что понижающая регуляция процессов репарации ДНК может участвовать в формировании и поддержании фенотипа старения, связанного с накоплением невосполнимых окислительных повреждений ДНК и ранней клеточной гибели [18].

В проведённом исследовании нами также были установлены признаки активации запрограммированной гибели клеток у детей, проживающих в условиях избыточной техногенной нагрузки бенз(а)пиреном. Это повышение содержания клеток с маркёрами раннего апоптоза Annexin V-FITC⁺7AAD⁻-клеток, признаки гиперпродукции проапоптотических маркёров Fas-рецептора – маркёра CD95⁺-лимфоцитов и рецептора фактора некроза опухолей TNFR, регулирующих внешний (рецепторный) тип запрограммированной клеточной гибели, при котором связывание лиганда с рецептором активирует инициаторную каспазу-8 и эффекторные каспазы (каспазы-3,7). Также известно, что каспаза-8 способна расщеплять белок Bid с образованием его активной формы tBid, активирующей проапоптотический белок Вах, который встраивается в наружную мембрану митохондрий и индуцирует митохондриальный тип апоптоза [19]. Способность бенз(а)пирена индуцировать митохондриальный тип апоптоза связана с повышением уровня ионов Ca²⁺ внутри клеток. Именно изменения в кальциевой межклеточной сигнализации становятся основным механизмом токсического повреждения лимфоидных и нелимфоидных иммунных клеток. Ионы Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума транспортируются в митохондрии для регулирования активности ферментов цикла Кребса и транспортёров, влияющих на его биоэнергетическую и биосинтетическую функцию. Избыточный транспорт Ca²⁺ в митохондрии приводит к постоянному открытию митохондриальной поры переходной проницаемости (PTP), что вызывает набухание митохондрий с нарушением или разрывом внешней митохондриальной мембраны и изменяет её трансмембранный потенциал. Разрыв внешней мембраны митохондрии активирует высвобождение нескольких проапоптотических белков, таких как цитохром С, индуцирующий апоптоз фактор (AIF), прокаспазы 9, Smac/DIABLO и эндонуклеаза G, в цитозоль, где они взаимодействуют с другими белками и иницируют сигнальный каскад, приводящий к апоптозу [20].

Выявленное в нашем исследовании повышение уровня экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2, ингибирующего продукцию свободных радикалов и образование каналов ионной проводимости в мембранах, возможно, является защитным механизмом от избыточной гибели клеток в условиях окислительного стресса, вызванного повышенной экспозицией бенз(а)пиреном [21].

Стоит отметить, что канцерогенные и цитотоксические (проапоптотические) свойства бенз(а)пирена, способствующие альтернативным нарушениям клеточного гомеостаза, не противостоят друг другу. Избыточность апоптоза лимфоцитов может опосредовать устойчивое снижение иммунной защиты и формирование клеточного иммунодефицита, что в свою очередь снижает способность организма распознавать и элиминировать не только чужеродные агенты из внешней среды, но и собственные клетки с генетическими дефектами, в том числе атипичные раковые клетки. Это значительно повышает риск развития злокачественных новообразований в условиях хронического воздействия канцерогена [11].

Установленное избыточное содержание лимфоцитов с маркёром апоптоза CD95⁺ – Fas-рецептора – у обследованных детей ассоциируется с повышенной частотой С-аллеля и соответствующего СС-генотипа *FAS* (rs1159120), ассоциированного с повышенным уровнем экспрессии данного гена, что указывает на генетическую обусловленность избыточной плотности рецепторов клеточной смерти и, как следствие, на повышенный уровень готовности клеток к внешнему (рецепторному) апоптозу. Fas-индуцированный апоптоз является приоритетным механизмом поддержания иммунного гомеостаза в нестабильных условиях среды [22]. Следовательно, генетически обусловленное повышение уровня экспрессии Fas-рецептора на мембране лимфоцитов способно быть маркёром избыточности запрограммированной гибели иммунных клеток в условиях избыточной техногенной нагрузки, результатом которой могут стать бенз(а)пирен-индуцированный клеточный иммунодефицит и иммуносупрессия.

В свою очередь признаки гиперэкспрессии белка-супрессора злокачественных новообразований p53 сопряжены с повышенной частотой С-аллеля и СС-генотипа гена *TP53* (rs1042522), что также демонстрирует вклад генетической предрасположенности к избыточной клеточной гибели у детей в условиях избыточной техногенной нагрузки. Белок p53 распознаёт различные повреждения ДНК, включая образование аддуктов с метаболитом бенз(а)пирена – ВDPE, и в ответ индуцирует транскрипцию проапоптотических белков семейства Bcl-2: Вах, Puma, Noxa и Bid. Кроме того, p53 может индуцировать апоптоз путём прямого воздействия на митохондриальные мембраны. Установлено, что воздействие бенз(а)пирена обуславливает не только избыточность экспрессии белка p53, но и структурные изменения, а именно посттрансляционное фосфорилирование в остатке серина в позиции ser15, дополнительно повышающие его функциональную проапоптотическую активность. Белок-супрессор p53 способен также усиливать уровень экспрессии Fas-рецептора в ответ на генотоксическое повреждение [23].

Заключение

Результаты проведённых исследований качества атмосферного воздуха и состава биосред детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном, демонстрируют достоверно значимое повышение его содержания в атмосферном воздухе (на уровне 7,4 ПДК_{сс}), а также уровня контаминации крови данным ПАУ относительно группы сравнения и референтного уровня в 2,1 раза при экспозиции в средней суточной дозе бенз(а)пирена 0,000163 мг/(кг · день) ($p < 0,05$). Иммунный профиль обследованного контингента при воздействии соответствующей дозы бенз(а)пирена характеризуется повышенным уровнем AnnexinV-FITC⁺7AAD⁻-клеток и CD3⁺CD95⁺-лимфоцитов,

p53 и TNFR на фоне компенсаторного повышения уровня продукции антиапоптотического белка Bcl-2 относительно группы сравнения ($p < 0,05$), что указывает на гиперактивацию запрограммированной клеточной гибели в результате избыточной экспозиции бенз(а)пиреном, следствием которой может быть развитие клеточного иммунодефицита. Выявленные изменения показателя запрограммированной клеточной гибели ассоциированы с С-аллелем ($OR = 1,38$; $95\% CI = 1,02-1,88$; $p < 0,05$) и СС-генотипом ($OR = 2,53$; $95\% CI = 1,72-3,72$; $p < 0,05$) гена *FAS* (rs1159120), а также с С-аллелем ($OR = 1,96$; $95\% CI = 1,53-2,53$; $p < 0,05$) и СС-генотипом ($OR = 2,53$; $95\% CI = 1,72-3,72$; $p < 0,05$) гена *TP53* (rs1042522), что указывает на вклад генетической детерминации гиперэкспрессии Fas-рецептора ($CD95^+$) и p53 у детей в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пире-

ном. Выявленные изменения иммунного профиля (избыток Annexin V-FITC⁺7AAD⁻ клеток и CD3⁺CD95⁺-лимфоцитов, p53, TNFR и Bcl-2), ассоциированные с С-аллелем и СС-генотипом гена *FAS* (rs1159120), а также с С-аллелем и СС-генотипом гена *TP53* (rs1042522), характеризуют особенности модификации запрограммированной клеточной гибели и её генетическую детерминацию у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции бенз(а)пиреном со средней суточной дозой более 0,000163 мг/(кг × день). Эти изменения могут быть использованы в качестве иммунологических и генетических маркёров эффекта и чувствительности к бенз(а)пирену детского населения урбанизированных территорий для решения задач ранней диагностики нарушений клеточного гомеостаза, ассоциированных с аутоиммунными и онкопролиферативными состояниями.

Литература

(п.п. 1, 2, 5, 6, 11–23 см. References)

- Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели. *Гены и клетки*. 2018; 13(1): 6–19. <https://doi.org/10.23868/201805001> <https://www.elibrary.ru/ynqdvj>
- Старкова К.Г., Долгих О.В., Легостаева Т.А., Ухабов В.М. Риск формирования аллергии и ее иммунные фенотипы у детей с полиморфизмом гена MMP9 Q279R. *Анализ риска здоровью*. 2022; (4): 168–76. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.16> <https://www.elibrary.ru/lhospn>
- Зайцева Н.В., Никоношина Н.А., Долгих О.В. Особенности иммунного профиля и полиморфизма кандидатных генов у детского населения при промышленной контаминации биосреды ртутью. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(10): 1133–8. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1133-1138>
- Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2018 году». М.: Кадастр; 2019.
- Состояние загрязнения атмосферы в городах на территории России за 2017г.*: Ежегодник. СПб.; 2018.
- Бу А.Х.Б., ред. *Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам*. Пер. с англ. М.: Лабора; 2013.

References

- Deng Y.L., Liao J.Q., Zhou B., Zhang W.X., Liu C., Yuan X.Q., et al. Early life exposure to air pollution and cell-mediated immune responses in preschoolers. *Chemosphere*. 2022; 286(Pt. 3): 131963. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131963>
- Suzuki T., Hidaka T., Kumagai Y., Yamamoto M. Environmental pollutants and the immune response. *Nat. Immunol.* 2020; 21(12): 1486–95. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0802-6>
- Deev R.V., Bilyalov A.I., Zhampeisov T.M. Modern ideas about cell death. *Geny i kletki*. 2018; 13(1): 6–19. <https://doi.org/10.23868/201805001> <https://www.elibrary.ru/ynqdvj> (in Russian)
- Starkova K.G., Dolgikh O.V., Legostaeva T.A., Ukhavov V.M. Risk of allergy and its immune phenotypes in children with MMP9 Q279R gene polymorphism. *Анализ риска здоровью*. 2022; (4): 168–76. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.16> <https://www.elibrary.ru/lhospn> (in Russian)
- Chang Y., Siddens L.K., Heine L.K., Sampson D.A., Yu Z., Fischer K.A., et al. Comparative mechanisms of PAH toxicity by benzo[a]pyrene and dibenzo[def,p]chrysene in primary human bronchial epithelial cells cultured at air-liquid interface. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2019; 379: 114644. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114644>
- Abd El-Fattah E.E., Abdelhamid A.M. Benzo[a]pyrene immunogenetics and immune archetype reprogramming of lung. *Toxicology*. 2021; 463: 152994. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152994>
- Zaytseva N.V., Nikonoshina N.A., Dolgikh O.V. Features of the immune profile and polymorphism of candidate genes in children population of an industrially developed region with excessive contamination of the biological medium with mercury. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2021; 100(10): 1133–8. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1133-1138> (in Russian)
- State Report «On the state and environmental protection of the Russian Federation in 2018». Moscow: Kasastr; 2019. (in Russian)
- The state of atmospheric pollution in cities in Russia for 2017: Yearbook. St. Petersburg; 2018. (in Russian)
- Wu A.H.B. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. Elsevier Health Science; 2006. (in Russian)
- Myers J.N., Harris K.L., Rekhadevi P.V., Pratap S., Ramesh A. Benzo(a)pyrene-induced cytotoxicity, cell proliferation, DNA damage, and altered gene expression profiles in HT-29 human colon cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* 2021; 37(6): 891–913. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09579-5>
- Dráčinská H., Indra R., Jelínková S., Černá V., Arlt V.M., Stiborová M. Benzo[a]pyrene-Induced Genotoxicity in Rats Is Affected by Co-Exposure to Sudan I by Altering the Expression of Biotransformation Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(15): 8062. <https://doi.org/10.3390/ijms22158062>
- Kumar A., Sinha N., Kodidela S., Zhou L., Singh U.P., Kumar S. Effect of benzo(a)pyrene on oxidative stress and inflammatory mediators in astrocytes and HIV-infected macrophages. *PLoS One*. 2022; 17(10): e0275874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275874>
- Liu D., Zhao Y., Qi Y., Gao Y., Tu D., Wang Y., et al. Benzo(a)pyrene exposure induced neuronal loss, plaque deposition, and cognitive decline in APP/PS1 mice. *J. Neuroinflammation*. 2020; 17(1): 258. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01925-y>
- Gao M., Zheng A., Chen L., Dang F., Liu X., Gao J. Benzo(a)pyrene affects proliferation with reference to metabolic genes and ROS/HIF-1 α /HO-1 signaling in A549 and MCF-7 cancer cells. *Drug Chem. Toxicol.* 2022; 45(2): 741–9. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1774602>
- Bukowska B., Duchnowicz P. Molecular Mechanisms of Action of Selected Substances Involved in the Reduction of Benzo[a]pyrene-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2022; 27(4): 1379. <https://doi.org/10.3390/molecules27041379>
- Lin Y.C., Wu C.Y., Hu C.H., Pai T.W., Chen Y.R., Wang W.D. Integrated hypoxia signaling and oxidative stress in developmental neurotoxicity of benzo[a]pyrene in zebrafish embryos. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(8): 731. <https://doi.org/10.3390/antiox9080731>
- Allmann S., Mayer L., Olma J., Kaina B., Hofmann T.G., Tomovic M.T., et al. Benzo[a]pyrene represses DNA repair through altered E2F1/E2F4 function marking an early event in DNA damage-induced cellular senescence. *Nucleic Acids. Res.* 2020; 48(21): 12085–101. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa965>
- Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(3): 175–93. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Sukumaran P., Nascimento Da Conceicao V., Sun Y., Ahamad N., Saraiva L.R., Selvaraj S., et al. Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis. *Cells*. 2021; 10(8): 2125. <https://doi.org/10.3390/cells10082125>
- Hussar P. Apoptosis regulators Bcl-2 and caspase-3. *Encyclopedia*. 2022; 2(4): 1624–36. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040111>
- Wang M., Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2018; 64(2): 93–102. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1422046>
- Abuetabh Y., Wu H.H., Chai C., Al Yousef H., Persad S., Sergi C.M., et al. DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Exp. Mol. Med.* 2022; 54(10): 1658–69. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00863-4>