

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 613.64: 616.717–057

Дианова Д.Г., Долгих О.В., Аликина И.Н., Челакова Ю.А.

АНАЛИЗ ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ У РАБОТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ ФЕНОЛОМ

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская, 82, Пермь, Россия, 614045

Для ранней диагностики нарушений здоровья работающих, экспонированных избыточными концентрациями фенола, проведена идентификация показателей иммунного статуса, характеризующих апоптоз иммунных клеток. Использованы современные методы лабораторных иммунологических исследований, включающих проточную цитометрию. Установлено, что в условиях повышенной контаминации биосред фенолом статистически значимо (в 2 раза; $p < 0,05$) снижается экспрессия транскрипционного фактора p53 и количество TNFRI-клеток, а также в 1,2 раза — процентное содержание апоптозассоциированных Annexin V-FITC+7-AAD-клеток, что характеризует течение процесса клеточной гибели, как его ингибирование по механизму апоптоза. Фенолсодержащие соединения при постоянном поступлении в организм работающих трансформируют компоненты клеточных сигнальных путей и, изменяя соотношение проапоптотических и противапоптотических внутриклеточных сигналов, негативно модулируют выживаемость клеток при канцерогенезе и формируют потенциальную опасность развития онкологических заболеваний.

Ключевые слова: проточная цитометрия; клеточная гибель; фенол

Для цитирования: Дианова Д.Г., Долгих О.В., Аликина И.Н., Челакова Ю.А. Анализ индикаторных показателей клеточной гибели у работающих в условиях производственной экспозиции фенолом. *Мед. труда и пром. экол.* 2018. 10:62–64. <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2018-10-62-64>

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Dina G. Dianova, Oleg V. Dolgikh, Inga N. Alikina, Yuliya A. Chelakova

ANALYSIS OF CELL DEATH INDICATORS IN EMPLOYEES UNDER EXPOSURE TO PHENOL AT WORK

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, 82, Monastyrskaya Str., Perm, Russia, 614045

For early diagnosis of health disorders in workers exposed to excessive levels of phenol, the authors identified parameters of immune state, characterizing apoptosis of immune cells. The identification used contemporary method of laboratory immunologic studies including flow cytometry. Findings are that biologic media highly contaminated with phenol demonstrate statistically significant (twice; $p < 0.05$) decrease of transcription factor p53 expression and TNFRI cells count, as well as 1.2 times lower percentage of apoptosis-associated Annexin V-FITC+7-AAD- cells — that characterizes a course of cell death as its inhibition by apoptosis mechanism. Phenol-containing compounds when continuously incorporated into workers' bodies transform components of cellular signal pathways and by changing ratio between pro-apoptotic and contra-apoptotic intracellular signals negatively modify survival of cells in carcinogenesis and form potential danger of malignancies.

Key words: flow cytometry; cell death; phenol

For citation: Dianova D.G., Dolgikh O.V., Alikina I.N., Chelakova Yu.A. Analysis of cell death indicators in employees under exposure to phenol at work. *Med. truda i prom. ekol.* 2018. 10:62–64. <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2018-10-62-64>

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

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Токсическое воздействие фенола непосредственно связано с концентрацией свободного фенола в крови, который является общим протоплазматическим ядом. Количество свободного фенола в крови определяется как экзогенным поступлением, так и эндогенным образованием в результате метаболизма токсичных и биологически активных веществ [1]. Изучение влияния фенола на организм работающих вследствие его распространенности, тропности к иммунным механизмам и наличию мутагенных свойств является весьма актуальной темой, так как на данный момент существуют ограниченные сведения о воздействии этого гаптена на иммунный гомеостаз [2–4]. Применение современной диагностики состояния иммунитета с использованием новейших методов цитофлуориметрического фенотипирования клеток и регистрация ранних признаков апоптоза на лазерном про-

точном цитометре позволяет выявить нарушения клеточной функции и возможное развитие патологических процессов на самых ранних этапах формирования патологии [5–8]. Воздействие производственных химических факторов на иммунитет может способствовать увеличению риска развития ряда заболеваний, что обуславливает целесообразность проведения исследования иммунной системы работающих в условиях вредного производства [9,10].

Цель исследования — анализ индикаторных показателей клеточной гибели у работающих в условиях производственной экспозиции фенолом методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. Всего, включая группу сравнения, обследовано 152 человека. Группу наблюдения составили работающие в условиях вредного производства, основной производственной вредностью которого являются

избыточные концентрации в воздухе рабочей зоны фенола (всего — 101 человек).

В соответствии с Р 2.2.2006–05¹, класс условий труда по фактору «фенол» в воздухе рабочей зоны относится к классу 3.2. Группа сравнения — 51 человек, не имеющие производственной вредности. Определение уровня экспрессии CD25⁺-, CD95⁺-рецептора, TNFRI, CD4⁺CD25⁺CD127⁺ (Treg), белка p53, содержание Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺ -клеток проводилось методом мембранной иммунофлуоресценции на проточном цитометре FACSCalibur с использованием универсальной программы CellQuestPro («Becton Dickinson», USA). В качестве витального красителя использовался 7-аминоактиномицин (7-AAD (7-aminonormycin D)) («BC», USA). Живые клетки негативны по Annexin V и 7-AAD, Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺ — ранний апоптоз (обратимый). Определение анализируемых показателей иммунитета проводилось на стандартизованном, проверенном оборудовании в соответствии с протоколами фирм-производителей. Определение органических соединений (фенол) в биосредах (кровь) выполнялось методом газовой хроматографии в соответствии с МУК 4.1.2102–4.1.2116–06². Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий средних проверялось соответствие формы выборочных распределений нормальному, с использованием критерий χ^2 , а также контролировалось равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. При соответствии данных нормальному распределению использовался *t*-критерий Стьюдента. Результаты исследования представлены в виде среднего значения (M) и ошибки средней (m) изученных показателей. Во всех процедурах статистическо-

го анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ результатов показал, что уровень фенола в воздухе рабочей зоны производственных помещений составил 1,4 мг/м³, что превышает ПДК (0,3 мг/м³). В крови обследуемой группы наблюдения концентрации фенола статистически значимо (в 1,56 раза; p=0,001) выше относительно референтных значений и статистически значимо (в 1,48 раза; p=0,001) выше в сравнении со значениями, зафиксированными в группе сравнения (табл.).

Установлено, что у работающих в условиях вредного производства статистически значимо (в 2,13 раза; p=0,002) реже определяется внутриклеточный белок p53 относительно физиологического уровня и значений, идентифицированных у группы сравнения. Результаты иммунологического обследования продемонстрировали, что у работающих с повышенным содержанием фенола в биосредах статистически значимо (в 2 раза; p=0,001) снижено количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих TNFRI, в сравнении с результатами, полученными у работающих, в крови которых содержание фенола не превышает референтных значений. Показано, что у обследуемых группы наблюдения статистически значимо (в 2 раза; p=0,001) снижено процентное содержание TNFRI-клеток относительно физиологической нормы. Установлено статистически значимое (в 1,2 раза; p=0,001) снижение количества Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺-клеток у обследуемых группы наблюдения по отношению к результатам, полученным у обследуемых группы сравнения.

Хроническое поступление фенола в организм человека ведет не только к кумуляции самого вещества и его метаболитов, но и оказывает влияние на функциональную активность иммунной системы, что характеризуется нарушением реализации клеточной гибели. Фенолы обычно действуют как антиоксиданты, удаляя свободные радикалы с образованием стабильного фенольного радикала, но они также могут стать прооксидантами [2]. Экспериментально установлено, что ряд фенолсодержащих соединений и их метаболитов, накапливаясь в митохондриях, нарушают

¹ Р 2.2.2006-05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда / утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.07.2005 г. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200040973>.

² МУК 4.1.2102-4.1.2116-06. Определение вредных веществ в биологических средах: Сборник методических указаний. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.

Таблица

Диапазон концентрации фенола в крови обследуемых работающих и соответствующие уровни показателей иммунной системы, (M±m)

Range of serum phenol level in examinees and corresponding levels of immune system parameters (M±m)

Показатель	Референтный уровень / Физиологическая норма	Группа сравнения (n=51)	Группа наблюдения (n=101)	p
Концентрация фенола в крови, мг/дм³				
Диапазон концентрации	0,057±0,019	0,041–0,07	0,071–0,164	
Среднее значение		0,060±0,0009	0,089±0,0003*	0,001
Показатели иммунной системы				
CD25 ⁺ , %	13–24	13,15±0,76	12,49±0,51	0,800
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм³	0,19–0,56	0,30±0,03	0,26±0,02	0,800
CD95 ⁺ , %	39–49	41,18±1,52	38,79±1,31	0,200
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм³	0,63–0,97	0,91±0,06	0,87±0,04	-
Treg, %	0,8–1,2	0,97±0,15	0,90±0,10	0,400
p53, %	1,2–1,8	1,75±0,26	0,82±0,19*	0,002
TNFR1, %	1–1,5	1,01±0,79	0,54±0,06*	0,001
Ann V-FITC ⁺ 7-AAD ⁺ , %	1,5–2,5	1,93±0,28	1,54±0,14	0,001

Примечания: p — различие между группой сравнения и группой наблюдения по средним величинам; * — различие с Референтным уровнем / Физиологической нормой p<0,05.

энергетический метаболизм этих органелл, что провоцирует повышение образование активных форм кислорода и гибель клетки. Этот эффект является дозозависимым [3]. Между тем активация пути PI3K/Акт является одним из механизмов, посредством которых активные формы кислорода модулируют выживаемость клеток при канцерогенезе. Фенолсодержащие соединения, трансформируя компоненты клеточных сигнальных путей, изменяют соотношение проапоптотических и противоапоптотических внутриклеточных сигналов.

Выводы:

1. У работающих в условиях вредного производства, концентрация фенола в крови статистически значимо (в среднем в 1,5 раза; $p < 0,05$) выше референтных значений и показателей, идентифицированных в биосредах обследуемых групп сравнения.

2. В условиях повышенной контаминации биосред фенолом статистически значимо (в 2 раза; $p < 0,05$) снижается экспрессия белка p53 и количество TNFRI-клеток, а также в 1,2 раза — процентное содержание Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺-клеток, что характеризует течение процесса клеточной гибели как его ингибирование по механизму апоптоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (пп. 6–8 см. REFERENCES)

1. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных. *Мед. иммунология*. 2000; 2(1): 7–16.
2. Долгих О.В., Кривцов А.В., Бубнова О.А., Алексеев В.Б. Особенности генетического полиморфизма у женщин с угрозой невынашивания в условиях хронической аэрогенной экспозиции фенолами. *Анализ риска здоровью*. 2013; 4: 77–81 [DOI: 10.21668/health.risk/2013.4.10].
3. Долгих О.В., Кривцов А.В., Старкова К.Г., Бубнова О.А., Дианова Д.Г., Вдовина Н.А., Ухабов В.М. Иммуногенетические изменения у работающих в условиях сочетанного воздействия производственного шума и пыли. *Мед. труда и пром. экол.* 2015; 12: 21–5.
4. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Долгих О.В. Адаптационные возможности иммунной системы в условиях хронического воздействия фенола. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2013; 15 (3–6): 1779–82.
5. Старкова К.Г., Долгих О.В., Кривцов А.В. и др. Иммунные и генетические маркеры, выявляемые у женщин, работающих на производстве резинотехнических изделий. *Мед. труда и пром. экол.* 2015; 12: 10–3.
9. Дианова Д.Г., Долгих О.В. Анализ параметров иммунной системы работающих в условиях экспозиции кремнием и марганцем. *Академический журнал Западной Сибири*. 2013; 9 (1–44): 48–49.
10. Зайцева Н.В., Май И.В., Клейн С.В. К вопросу установления и доказательства вреда здоровью населения при выявлении неприемлемого риска, обусловленного факторами среды обитания. *Анализ риска здоровью*. 2013; (2): 14–27 [DOI: 10.21668/health.risk/2013.2.02].

REFERENCES

1. Yarilin A.A., Nikonova M.V., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in

immunopathological states. *Meditinskaya immunologiya*. 2000; 2(1): 7–16. (in Russian).

2. Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Alexeyev V.B. Characteristics of Gene polymorphism in women with a threat of miscarriage and airborne exposure to phenols. *Analiz Riska Zdorov'yu*. 2013; (4): 77–81 [DOI: 10.21668/health.risk/2013.4.10. eng]. (in Russian).

3. Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Starkova K.G., Bubnova O.A., Dianova D.G., Vdovina N.A., Uhabov V.M. Immune and genetic changes in workers exposed to industrial noise and dust. *Med. truda i prom. ecol*. 2015; 12: 21–5 (in Russian).

4. Zaitseva N.V., Dianova D.G., Dolgikh O.V. Adaptation possibilities of the immune system in the conditions of chronic phenol impact. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2013; 15 (3–6): 1779–82 (in Russian).

5. Starkova K.G., Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Horoshavin V.A. Immune and genetic markers revealed in women working in technical rubber goods production. *Med. truda i prom. ecol*. 2015; 12: 10–3 (in Russian).

6. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. Molecular markers of apoptosis in industrial workers. *In vivo: Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2011; 259 (3): 523–4.

7. Gazzano E., Lazzarato L., Rolando B. et al. Mitochondrial delivery of phenol substructure triggers mitochondrial depolarization and apoptosis of cancer cells. *Front. Pharmacol*. 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00580> (19.07.2018).

8. George B.P., Abrahamse H., Hemmaragala N.M. Phenolics from *Rubus fairholmanus* induces cytotoxicity and apoptosis in human breast adenocarcinoma cells. *Chem. Biol. Interact*. 2017; 275: 178–88.

9. Dianova D.G., Dolgikh O.V. Analysis of parameters of the immune system working under exposure conditions with silicon and manganese. *Akademicheskii zhurnal Zapadnoi Sibiri*. 2013; 9 (1–44): 48–9 (in Russian).

10. Zaitseva N.V., May I.V., Kleyn S.V. On the determination and proof of damage to human health due to an unacceptable health risk caused by environmental factors. *Analiz Riska Zdorov'yu*. 2013; (2): 14–27 [DOI: 10.21668/health.risk/2013.2.02. eng] (in Russian).

Поступила 06.08.2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Дианова Дина Гумеровна (Dina G. Dianova),
ст. науч. сотр. лаб. клеточных методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», канд. мед. наук. E-mail: dianovadina@rambler.ru.
<http://orcid.org/0000-0002-0170-1824>
- Долгих Олег Владимирович (Oleg V. Dolgikh),
зав. отделом иммунобиологич. методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», д-р мед. наук. E-mail: oleg@fcrisk.ru.
<http://orcid.org/0000-0003-4860-3145>
- Аликина Инга Николаевна (Inga N. Alikina),
мл. науч. сотр. отдела иммунобиологич. методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН». E-mail: oleg@fcrisk.ru.
<http://orcid.org/0000-0002-2057-9828>
- Челакова Юлия Александровна (Yuliya A. Chelakova),
мл. науч. сотр. отд. иммунобиологич. методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН». E-mail: oleg@fcrisk.ru.
<http://orcid.org/0000-0002-9421-6536>