

УДК 613.64: 616.717-057

К.Г. Старкова¹, О.В. Долгих¹⁻³, А.В. Кривцов¹, О.А. Бубнова^{1,2}, В.А. Хорошавин⁴**ИММУННЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВЫЯВЛЯЕМЫЕ У ЖЕНЩИН, РАБОТАЮЩИХ НА ПРОИЗВОДСТВЕ РЕЗИНОТЕХНИЧЕСКИХ ИЗДЕЛИЙ**¹ ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская, 82, Пермь, Россия, 614045² ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», ул. Букирева, 15, Пермь, Россия, 614990³ ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Комсомольский проспект, 29, Пермь, Россия, 614990⁴ Управление Роспотребнадзора по Пермскому краю, ул. Куйбышева, 50, г. Пермь, Россия, 614016

Проведено обследование женщин, работающих на химическом производстве резинотехнических изделий в условиях сочетанного воздействия комбинации химических факторов (азота оксиды и углерода оксид) и шума, превышающего ПДУ на 3,7–27,5%. Установлено повышение фагоцитарной активности, снижение содержания сывороточных иммуноглобулинов IgM и IgG, угнетение экспрессии CD25 и CD95 T-клеточных рецепторов, а также замедление апоптоза запускаемого через Fas-рецептор, ассоциированных с условиями труда. Выявленные нарушения реализуются на фоне особенностей генетической вариабельности у женщин, которая характеризуется распространенностью мутантных аллелей генов FAS и TNFR с минорным гомозиготным генотипом.

Ключевые слова: CD-маркеры, апоптоз, химическое производство.

K.G. Starkova¹, O.V. Dolgikh¹⁻³, A.V. Krivtsov¹, O.A. Bubnova^{1,2}, V.A. Horoshavin⁴. **Immune and genetic markers revealed in women working in technical rubber goods production**

¹ FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies», 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045² FSBEI of Higher Professional Education «Perm State National Research University», 15, Bukireva St., Perm, Russia, 614990³ FSBEI of Higher Education «Perm National Research Polytechnic University», 29, Komsomolsky prospekt, Perm, Russia, 614990⁴ Perm Region Department of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, 50, ul. Kuybysheva, Perm, Russia, 614016

Medical examination covered female workers engaged into chemical production of technical rubber goods, under combined exposure to chemicals (nitrogen oxides, carbon oxide) and noise exceeding MAC by 3.7–27.5%. Findings are increased phagocytary activity, lower level of serum IgM and IgG, suppressed expression of CD25 and CD95 T-cell receptors, and slower apoptosis induced via Fas receptor — all those indicators associated with work conditions. The disorders revealed are actualized on a basis of genetic variability features of the females, that is characterized by prevalence of mutant alleles of FAS and TNFR genes with minor homozygous phenotype.

Key words: CD-markers, apoptosis, chemical production.

Для решения задачи сохранения здоровья и повышения качества жизни трудоспособного населения необходимы своевременное выявление негативных изменений в функционировании регуляторных систем, определяющих снижение адаптивного потенциала организма, и разработка системы маркерных показателей, адекватно отражающих специфику воздействия в условиях производственной среды [4,5]. Поиск и разработка системы критериев на основе маркерных показателей, отражающих степень и специфику негативного воздействия производственных факторов на регуляторные механизмы, среди которых иммунная система занимает важнейшее место, позволят адекватно применить и повысить эф-

фективность профилактики развития производственно обусловленных нарушений здоровья [1,2,6,7]. Исследование особенностей изменения параметров иммунной регуляции в сочетании с идентификацией индивидуальной генетической вариабельности внесут существенный вклад в процесс своевременного выявления патогенетических тенденций у работающих в условиях многофакторного воздействия [3,8,9].

Цель работы — исследовать иммунные и генетические маркерные показатели у женщин, работающих на производстве резинотехнических изделий в условиях сочетанного воздействия химических факторов и шума.

Материалы и методы. Обследовано 29 женщин, трудовая деятельность которых связана с изготовлением и обработкой резинотехнических изделий (цех холодной штамповки, станочный участок, участок обработки резиновых изделий) в условиях сочетанного воздействия комбинации веществ (азота оксиды; углерода оксид) и шума. Группу сравнения составили 29 женщин этого же предприятия (руководители и инженерно-технические специалисты, которые работают вне условий воздействия производственных факторов).

Изменение фагоцитарной активности оценивали, используя в качестве объектов фагоцитоза формализированные эритроциты барана. Содержание сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G (IgG, IgM, IgA) изучали методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. С помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию IgE общего, фактора некроза опухоли (TNF α), интерлейкина-17.

Определение по CD-маркерам популяций и субпопуляций лимфоцитов, а также клеток, экспрессирующих маркеры апоптоза рецептор к TNF α (TNFR1⁺), белок p53 осуществляли на проточном цитометре с использованием метода мембранной иммуофлюоресценции и применением меченых моноклональных антител, суммарно регистрируя не менее 10000 событий. Уровень апоптоза исследовали по экспрессии на мембране фосфатидилсерина с помощью меченого Аннексина V (Annexin V-FITC) и фрагментации ДНК красителем 7-AAD (7-amino-actinomycin D).

Для статистического анализа полученных данных применяли метод вариационной статистики с расчетом средней арифметической и ее стандартной ошибки и t-критерия Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Материал для генетического исследования получали с помощью мазков со слизистой оболочки ротоглотки, ДНК выделяли разрушением клеток и дальнейшей сорбцией на сорбент. Для определения генотипов использовали полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени и метод аллельной дискриминации. Различия между вариантами генотипов устанавливали по особенностям протекания реакции амплификации соответствующих праймеров с флуоресцентными метками. Изучали полиморфизмы следующих патогномоничных генов — фактора некроза опухоли TNFR, рецептора запуска апоптоза FAS и транскрипционного фактора p53 (TP53). Расчет частот генотипов и аллелей проводили по равновесию Харди-Вайнберга с использованием программы «Ген Эксперт» и диагностики однонуклеотидных полиморфизмов.

Результаты исследования. Условия труда женщин основной группы характеризовались сочетанным воздействием вредных производственных факторов. Отмечено наличие производственного шума (от 83 дБ до 102 дБ), превосходящего предельно допустимый уровень на 3,7–27,5%. По химическому фактору на

рабочих местах установлено присутствие оксида углерода в концентрации до 26,0 мг/м³ при ПДК 20 мг/м³; комбинация веществ (азота оксиды; углерода оксид) встречалась на уровне до 1,34 мг/м³ при ПДК 1,0 мг/м³. Концентрации паров формальдегида, бензола, углеводородов алифатических предельных и серы диоксида не превышали установленных нормативов. По результатам проведенной аттестации рабочих мест согласно Р 2.2.2006–05 условия труда оценены как вредные 3-го класса 1–3 степени (3.1–3.3).

В результате клинко-лабораторных исследований выявлены изменения функциональной активности иммунной системы у обследованной группы. При сравнении с референтным диапазоном установлено повышение фагоцитарной активности у 45,5% обследованных женщин по критерию фагоцитарного индекса, а также достоверное увеличение данного показателя в 1,1 раза относительно контрольных значений ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1
Изменение иммунных показателей женщин в условиях воздействия вредных производственных факторов

Показатель	Группа сравнения	Группа наблюдения
Абсолютный фагоцитоз, 10 ⁹ /дм ³	1,906±0,265	2,322±0,92
Фагоцитоз, %	44,769±5,389	44,727±8,541
Фагоцитарное число, у.е.	0,79±0,141	0,941±0,241
Фагоцитарный индекс, у.е.	1,72±0,129	1,943±0,197*/**
IgG, г/дм ³	11,55±0,556	10,978±0,918*
IgM, г/дм ³	1,876±0,191	1,399±0,245*/**
IgA, г/дм ³	1,654±0,184	1,359±0,19**
IgE общий, МЕ/см ³	93,774±60,384	109,936±131,336
TNF α , пг/см ³	0,96±0,218	0,374±0,21**
Интерлейкин-17, пг/см ³	0,927±0,21	0,763±0,193

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

Выявлены преимущественно угнетающие эффекты на продукцию сывороточных иммуноглобулинов, которая достоверно отличалась от физиологической нормы снижением IgG (63,6% случаев) и IgM (81,8% случаев), различия достоверны по критерию кратности превышения нормы. Также определено уменьшение содержания IgM и IgA в 1,2 и 1,3 раза соответственно относительно группы сравнения (81,8% и 72,7% обследованных) ($p < 0,05$).

Не выявлено достоверных отличий по изменению маркера гиперчувствительности IgE общего как относительно референтного диапазона, так и показателей группы сравнения, хотя его содержание было повышено у 27,3% группы наблюдения.

Содержание маркеров межклеточной цитокиновой регуляции IL-17 и TNF α соответствовало ре-

ферентному диапазону у женщин основной группы, в то же время концентрация TNF α была достоверно ниже относительно группы сравнения, в среднем в 2,5 раза ($p < 0,05$). При исследовании параметров CD-иммунограммы (табл. 2) и по основным показателям достоверных отклонений от референтного интервала не наблюдалось за исключением содержания активационного маркера CD25, сниженного по абсолютному (в среднем в 1,5 раза) и относительному количеству, а также CD95 по относительному содержанию у всех обследованных женщин ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о проявлении супрессорного эффекта у лиц основной группы с признаками угнетения Т-клеточных рецепторов. В то же время отмечено повышение количества регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127⁻ клеток в 60% случаев при отсутствии достоверных отличий по средним значениям.

Таблица 2

Особенности экспрессии CD-маркеров и регуляции апоптоза у женщин в условиях химического производства

Показатель	Референтный интервал	Группа наблюдения
CD16 ⁺ 56 ⁺ лимфоциты, %	5–27	11,8 $\pm$ 2,964
CD19 ⁺ лимфоциты, %	6–25	10,6 $\pm$ 4,936
CD3 ⁺ лимфоциты, %	55–84	73,6 $\pm$ 7,325
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты, %	13–41	30,8 $\pm$ 6,356
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоциты, %	31–60	27,4 $\pm$ 4,081
CD3 ⁺ CD25 ⁺ лимфоциты, %	13–24	3,2 $\pm$ 1,36*
CD3 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, %	39–49	19,6 $\pm$ 8,718*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ лимфоциты, %	0,8–1,2	2,15 $\pm$ 1,5
Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁻ клетки, %	1,5–2,5	0,844 $\pm$ 0,402*
Annexin V-FITC ⁺ 7AAD ⁺ клетки, %	7–11	9,77 $\pm$ 4,856
TNFR1 ⁺ , %	1–1,5	1,572 $\pm$ 1,044
p53, %	1,2–1,8	1,362 $\pm$ 0,971

Примечания: * — разница достоверна относительно референтного интервала ($p < 0,05$).

Изменение показателей, характеризующих особенности регуляции процесса апоптоза, на фоне снижения экспрессии Fas-рецептора (CD95) указывает на негативные тенденции в обеспечении клеточного гомеостаза. Снижение количества вступивших в апоптоз Annexin V-FITC⁺7AAD⁻ клеток в среднем в 1,4 раза ($p < 0,05$) сопровождалось уменьшением экспрессии белка p53, участвующего в запуске процесса апоптоза, у 40% обследованных. При этом не выявлено достоверных отличий от референтного диапазона по количеству клеток, экспрессирующих рецептор TNFR1⁺. Кроме того, показана положительная коррелятивная взаимосвязь между уровнем экспрессии Fas-рецептора и количеством Annexin V-FITC⁺7AAD⁻ клеток, вступивших в апоптоз ($r = 0,825$; $p < 0,05$).

Таблица 3

Особенности генетического полиморфизма у женщин, работающих на химическом производстве

Ген	Генотип/аллель	Группа сравнения, %	Группа наблюдения, %
FAS	CC	67	53
	CT	33	40
	TT	0	7
	C	83	73
	T	17	27
TP53	CC	58	55
	CT	42	45
	TT	0	0
	C	79	77
	T	21	23
TNFA	GG	100	55
	GA	0	35
	AA	0	10
	G	100	73
	A	0	28

Проведенный генетический анализ выявил у женщин основной группы особенности полиморфизма генов, связанных с иммунной регуляцией и апоптозом (табл. 3). Показано смещение в распределении генотипов по генам FAS и TNFR, вызванное повышением частоты мутантного аллеля за счет появления минорного гомозиготного генотипа в обследуемой группе, а также присутствием гетерозиготного варианта генотипа в случае TNFR.

Заключение. В результате проведенного обследования женщин, трудовая деятельность которых связана с изготовлением и обработкой резинотехнических изделий, выявлены существенные изменения функциональной активности иммунной системы, которые проявились повышением показателей фагоцитоза, снижением экспрессии Т-клеточных рецепторов и содержания сывороточных иммуноглобулинов, а также замедление апоптоза запускаемого через Fas-рецептор. Указанные изменения наблюдаются на фоне негативной генетической вариативности, определяющейся распространенностью мутантного аллеля по генам FAS и TNFR за счет минорного гомозиготного генотипа. Патогномоничные для обследуемого контингента женщин иммунные (CD95, CD4⁺CD25⁺CD127⁻, Annexin V-FITC⁺7AAD лимфоциты, p53) и генетические (гены FAS и TNFR) маркеры ассоциированы с условиями их труда, которые характеризуются сочетанным воздействием комбинации химических факторов (азота оксиды, углерода оксид) на уровне 1,3 ПДК и шума, превышающего ПДУ на 3,7–27,5%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (см. REFERENCES стр. 7–9)

1. Долгих О.В., Кривцов А.В., Бубнова О.А., Алексеев В.Б. // Анализ риска здоровью. — 2013. — № 4. — С. 77–81.
2. Долгих О.В., Кривцов А.В., Гугович А.М. и др. // Мед. труда и пром. эколог. — 2012. — № 12. — С. 30–33.

3. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Предеина Р.А. и др. // Здоровье семьи — 21 век. — 2013. — № 4(4). — С. 27–39.
4. Измеров Н.Ф., Тихонова Г.И. // Проблемы прогнозирования. — 2011. — № 3. — С. 56–70.
5. Онищенко Г.Г. // Здравоохран. РФ. — 2009. — № 2. — С. 7–12.
6. Халимов Ю.Ш., Сухонос Ю.А., Цепкова Г.А. и др. // Вестн. Росс. военно-мед. академии. — 2014. — № 2 (46). — С. 7–12.

REFERENCES

1. Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Alekseev V.B. // Analiz riska zdorov'yu. — 2013. — 4. — P. 77–81 (in Russian).
2. Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Gugovich A.M., et al. // Industr. med. — 2012. — 12. — P. 30–33 (in Russian).
3. Zaytseva N.V., Dolgikh O.V., Predeina R.A., et al. // Zdorov'e sem'i — 21 vek. — 2013. — 4 (4). — P. 27–39 (in Russian).
4. Izmerov N.F., Tikhonova G.I. // Problemy prognozirovaniya. — 2012. — 3. — P. 56–70 (in Russian).
5. Onishchenko G.G. // Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii. — 2009. — 2. — P. 7–12 (in Russian).
6. Khalimov Yu.Sh., Sukhonos Yu.A., Tsepikova G.A., et al. // Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii. — 2014. — 2 (46). — P. 7–12 (in Russian).
7. Banerjee B.D., Chakraborti A., Suke S.G. et al. // Indian journal of biochemistry and biophysics. — 2008. — V. 45. — P. 7–15.
8. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. // In vivo: International Journal of Experimental and Clinical Patho-

physiology and Drug Research. — 2011. — V. 25. — No. 3. — P. 523–524.

9. Jeng H.A., Pan C.H., Diawara N. et al. // Occupational and Environmental Medicine. — 2011. — V. 68(9). — P. 653–658.

Поступила 20.10.2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Старкова Ксения Геннадьевна (Starkova K.G.),
зав. лаб. иммунологии и аллергологии ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», канд. биол. наук. E-mail: skg@fsrisk.ru.
- Долгих Олег Владимирович (Dolgikh O.V.),
зав. отд. иммунобиол. методов диагностики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», проф. каф. экологии человека и безопасности жизнедеятельности Пермского гос. национального иссл. университета, проф. каф. охраны окружающей среды Пермского национального иссл. политехнического университета, д-р мед. наук, проф. E-mail: oleg@fcrisk.ru.
- Кривцов Александр Владимирович (Krivtsov A.V.),
зав. лаб. иммуногенетики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», канд. мед. наук. E-mail: krivtsov@fcrisk.ru.
- Бубнова Ольга Алексеевна (Bubnova O.A.),
мл. науч. сотр. лаб. иммуногенетики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». E-mail: oleg@fcrisk.ru.
- Хорошавин Виктор Алексеевич (Horoshavin V.A.),
зам. рук. Управления Роспотребнадзора по Пермскому краю, д-р мед. наук. E-mail: urpn@59.rosptrebnadzor.ru.

УДК 615.9

В.Н. Звездин¹, М.А. Землянова^{1–3}, Т.И. Акафьева²

ТОКСИЧНОСТЬ АЭРОЗОЛЯ НАНОДИСПЕРСНОГО ОКСИДА МАРГАНЦА ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская, 82, Пермь, Россия, 614045

²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», ул. Букирева, 15, Пермь, Россия, 614990

³ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Комсомольский проспект, 29, Пермь, Россия, 614990

Представлены результаты экспериментального исследования острой ингаляционной токсичности нанодисперсного оксида марганца, широко используемого в производстве продуктов нового поколения. В ходе технологического процесса возможно образование в воздухе рабочей зоны аэрозоля наноразмерного оксида марганца, что обуславливает опасность ингаляционного экспонирования работающих. Установлено, что исследуемое вещество является наноматериалом с преимущественным размером сечения частиц нитевидной формы 15–29 нм. Вещество обладает острой токсичностью при ингаляционном воздействии в виде аэрозоля. CL_{50} при 4-часовой экспозиции для крыс линии Wistar составляет 120 мг/м³ (1-й класс опасности). Клиническая картина острой интоксикации характеризуется преимущественно раздражающим и нейротоксическим эффектами действия, что подтверждается результатами морфологических исследований. Гистологическая картина ткани головного мозга характеризуется патологическими