

УДК 614.878.086

Н.В. Зайцева^{1,2}, М.А. Землянова¹⁻³

НАРУШЕНИЕ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ У НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО В ЗОНЕ ВЛИЯНИЯ ВЫБРОСОВ МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

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

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», ул. Букирева, 15, Пермь, Россия, 614068

³ ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», пр-т Комсомольский, 29, Пермь, Россия, 614990

Технологией протеомного анализа выполнено исследование и оценка белкового профиля плазмы крови у населения, проживающего в зоне влияния выбросов металлургического производства. Установлено, что неудовлетворительное качество атмосферного воздуха селитебной застройки по содержанию ванадия, никеля, марганца (до 24–44 RfC_{chr}) и стабильное их присутствие в питьевой воде (до 0,006 RfD) обуславливает преимущественно аэрогенную хроническую экспозицию на уровне 0,00025–0,0022 мг/(кг·день). У экспонированных лиц в крови формируется повышенная (в 3,5–3,8 раза) относительно неэкспонированных и референтного уровня концентрация ванадия (от 0,0023 до 0,003 мг/дм³), никеля (0,06–0,11 мг/дм³) и марганца (0,036–0,048 мг/дм³). Показано изменение протеомного профиля плазмы крови, связанное с концентрацией ванадия и никеля в крови (долевой вклад ванадия и никеля составил 15–20%), в виде повышения относительного объема транстиретина, аполипопротеина А–1, снижения относительного объема гаптоглобина. Повышенное содержание в крови ванадия обуславливает нарушение транспорта апобелков, входящих в состав липопротеинов; повышенное содержание никеля в крови активирует гемолиз эритроцитов, нарушается скорость образования комплекса гемоглобин-гаптоглобин и последующая его утилизация гепатоцитами.

Выявленные клеточно-молекулярные нарушения позволяют прогнозировать развитие болезней щитовидной железы, крови, нарушений обмена холестерина.

Ключевые слова: протеомный профиль, плазма крови, металлы, молекулярные маркеры, ингаляционная экспозиция, источники металлургического производства.

N.V. Zaitseva^{1,2}, M.A. Zemlyanova¹⁻³. **Disorders of serum proteomic profile in residents of area influenced by metallurgic industrial releases**

¹ FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies», Monastyrskaya Str., 82, Perm, Russia, 614045

² FSBEI HE «Perm State National Research University» Bukireva Str., 15, Perm, Russia, 614068

³ FSBEI HE «Perm National Research Polytechnic University», pr-t Komsomol'skij, 29, Perm, Russia, 614990

Proteomic analysis technology helped to study and assess protein profile of blood serum in residents of area influenced by metallurgic industrial releases. Findings are that poor quality of ambient air in populated area concerning concentrations of vanadium, nickel, manganese (up to 24–44 RfC_{chr}) and stable presence of these elements in drinkable water (up to 0,006 RfD) cause mainly aerogenous chronic exposure at 0,00025–0,0022 mg/(kg·day). The exposed individuals demonstrate higher (3,5–3,8 times vs. unexposed ones and reference level) serum level of vanadium (0,0023 to 0,003 mg/dm³), nickel

(0,06–0,11 mg/dm³) and manganese (0,036–0,048 mg/dm³). The authors demonstrated changes in serum proteomic profile associated with serum levels of vanadium and nickel (share contribution of vanadium and nickel equalled 15–20%) and manifested as increase of relative volume of transthyretin, apolipoprotein A-1, lower relative volume of haptoglobin. Increased serum level of vanadium disorders transport of apoproteins incorporated into lipoproteins; increased serum level of nickel activates hemolysis of RBC, disorders speed of hemoglobin-haptoglobin complex formation and its subsequent utilization by hepatocytes.

Revealed molecular and cellular disorders enable to forecast thyroid disorders, hematologic diseases, cholesterol metabolism disorders.

Key words: proteomic profile, blood serum, metals, molecular markers, inhalation exposure, sources of metallurgical industry.

Никель (Ni), ванадий (Va) и марганец (Mn) согласно Рекомендациям ВОЗ по качеству воздуха в Европе и международной программы по химической безопасности и Европейской комиссией (2000 г.) входят в список веществ, загрязняющих атмосферный воздух и в перечень вредных и опасных факторов производственной среды. Основными источниками поступления металлов в воздух рабочей зоны и в атмосферный воздух населенных мест являются пылегазовые выбросы предприятий металлургического и машиностроительного комплекса.

При аэрогенном поступлении в организм Ni, Va, Mn в форме соединений с высокой степенью окисления характеризуются высокой реакционной способностью, проникают через гематоэнцефалический барьер, кумулируют во внутриклеточных структурах [1,15]. Согласно данным Агентства по регистрации токсичных веществ и заболеваний США [11] они обладают, наряду с общерезорбтивным действием, специфическими эффектами повреждающего действия на органы и системы-мишени (ЦНС, система крови, органы дыхания, эндокринная система, жировой обмен) [7,13,14].

Исследование протеомного профиля плазмы крови индивидов в условиях воздействия Ni, Va, Mn технологиями протеомного анализа и установление специфических белков-мишеней, изменение количества которых связано с повышенным содержанием данных металлов в организме, является особо актуальным для расширения доказательной базы причинения вреда здоровью при воздействии факторов риска, для повышения эффективности мер ранней диагностики, профилактики и принятия управленческих решений [4,5].

Целью исследований являлось выявление и оценка нарушений протеомного профиля плазмы крови у населения, подвергающихся аэрогенной экспозиции металлами (Ni, Va, Mn) в зоне влияния выбросов металлургических производств, для решения задач гигиенической экспертизы и расследований, повышения эффективности ранней диагностики и профилактики риск-ассоциированных заболеваний.

Материалы и методы. Гигиеническая оценка качества атмосферного воздуха на содержание Ni, Va, Mn выполнена на территории с размещением металлургического производства по результатам мониторинговых наблюдений за период 2010–2015 гг. (данные ГУ Пермского ЦГМС, Роспотребнадзора по Пермскому краю) и натурных исследований (данные

ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»), расчетов рассеивания металлов в атмосферном воздухе от стационарных источников методом пространственно-временного анализа в среде ГИС ARC/View (версия 3.2). Оценку полученных концентраций проводили относительно предельно допустимых и референтных концентраций для хронического ингаляционного воздействия (ПДК_{с.с.} и RfC_{chr.}) [9]. Зона влияния считали территорию, на которой достигаются приземные концентрации выше 0,05 ПДК_{с.с.} [8]. Количественную оценку хронической экспозиции осуществляли в соответствии с Руководством Р 2.1.10.1920–04.

Объектом исследования являлась наиболее чувствительная группа населения (дети в возрасте 4–7 лет в количестве 72 человек), постоянно проживающие в жилой застройке, расположенной в зоне влияния выбросов металлургического производства (группа наблюдения). Для сравнительных оценок выбрана группа детей (66 человек) аналогичного возраста, проживающая на территории, максимально удаленной от зоны влияния выбросов металлургического производства (группа сравнения). Группы были сопоставимы по социально-гигиеническим условиям жизни, отсутствиюотягощенного наследственного анамнеза, профессиональных вредностей в семье. Обследование выполнено с соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 года (с изменениями и дополнениями 2008 года), при наличии индивидуального письменного информированного согласия на обследование.

Химико-аналитическое исследование содержания Ni, Va, Mn в крови осуществляли в соответствии с МУК 4.1.777–99, МУК 4.1.1483–03. Установленные концентрации металлов оценивали относительно референтного уровня в крови (RfL) [6]. Обследованные лица с содержанием металлов в крови выше референтного значения ($C_{Me} > RfL_{Me}$), составили группу наблюдения; на уровне или ниже референтного значения ($C_{Me} \leq RfL_{Me}$) — группу сравнения.

Обоснование маркеров экспозиции осуществляли на основании установления достоверных связей между концентрацией металлов в атмосферном воздухе и концентрацией металла в крови, которые описывали с помощью модели нелинейной логистической регрессии [2]. Оценку параметров моделей выполняли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Сравнение групп по количественным признакам про-

водили по критерию Стьюдента при статистической значимости $p \leq 0,05$.

Технологией протеомного анализа исследовали белковый состав (протеом) термостабильной фракции плазмы крови [3]. Фракционирование белков выполнено методом двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле с использованием специального оборудования (Bio-Rad, США). Фотографирование геля осуществляли с помощью системы визуализации GelDoc XR с разрешением 254 dpi. Для каждого белкового пятна рассчитывали объем, выраженный относительно общего объема значимых пятен на геле (V%). Частоту встречаемости и относительный объем белковых пятен в протеомных картах группы наблюдения оценивали относительно показателей контрольной группы. Выделенные белковые пятна идентифицировали методом ВЭЖХ-МС/МС с последующим трипсинолизом белков в геле [12] и лиофилизацией полученного гидролизата белков на центробежном вакуумном концентраторе CentriVap (Labconco, США).

Масс-спектрометрия полученных образцов выполнена в ходе информационно-зависимого эксперимента на тандемном масс-спектрометре 4000 QTRAP (AB Sciex, Канада) с источником ионов NanoSpray.

Выявление и оценку связи относительного объема выделенных белковых пятен с концентрацией металлов в крови выполняли по расчету отношения шансов (OR) и его доверительного интервала (DI) [10]. Критерием наличия связи являлось $OR \geq 1$. Долю вклада

повышенного содержания металлов в крови в изменение объема белковых пятен оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа. Адекватность модели оценивали по критерию Фишера ($F \geq 3,96$) со статистической значимостью $p \leq 0,05$ [2].

Результаты исследования и их обсуждение.

Оценка качества атмосферного воздуха селитебной застройки в зоне влияния выбросов металлургического производства свидетельствовала о неудовлетворительной ситуации в течение последних 5 лет по содержанию Va и Ni на уровне до 1,2 ПДКс.с., Mn — до 2,2 ПДКс.с. Превышение референтных уровней при хроническом ингаляционном воздействии составило по Va 34 раза, Ni — 24 раза, Mn — 44 раза. Зона загрязнения атмосферного воздуха распространялась от места расположения металлургического производства на селитебную территорию в южном, восточном, северном и северо-восточном направлениях.

Экспозиция характеризовалась поступлением изучаемых металлов в организм одновременно с атмосферным воздухом и питьевой водой. Суммарная суточная доза при хроническом воздействии, составляющая для Mn 0,002 мг/(кг×день), Ni — 0,0011 мг/(кг×день), Va — 0,00024 мг/(кг×день), складывается из дозы металла, поступающего преимущественно ингаляционным путем (долевой вклад 90,0–95,8%). В зоне экспозиции проживает около 20 тыс. населения.

Таблица

Концентрация металлов в крови лиц группы наблюдения и группы сравнения, мг/дм³

Металл	Группа обследованных	Концентрация (M±m), мг/дм ³	Референтный предел, мг/дм ³	Доля RL	Достоверность различий ($p \leq 0,05$)	
					с группой сравнения	с референтным пределом
Марганец	сравнения	0,012±0,003	0,011±0,002	1,0	–	0,581
	наблюдения	0,042±0,008		3,8	0,0001	0,0001
Никель	сравнения	0,031±0,009	0,028±0,004	1,1	–	0,545
	наблюдения	0,285±0,036		10,2	0,0001	0,0001
Ванадий	сравнения	0,0006±0,0002	0,0005±0,0002	1,2	–	0,921
	наблюдения	0,0015±0,0005		3,0	0,001	0,0003

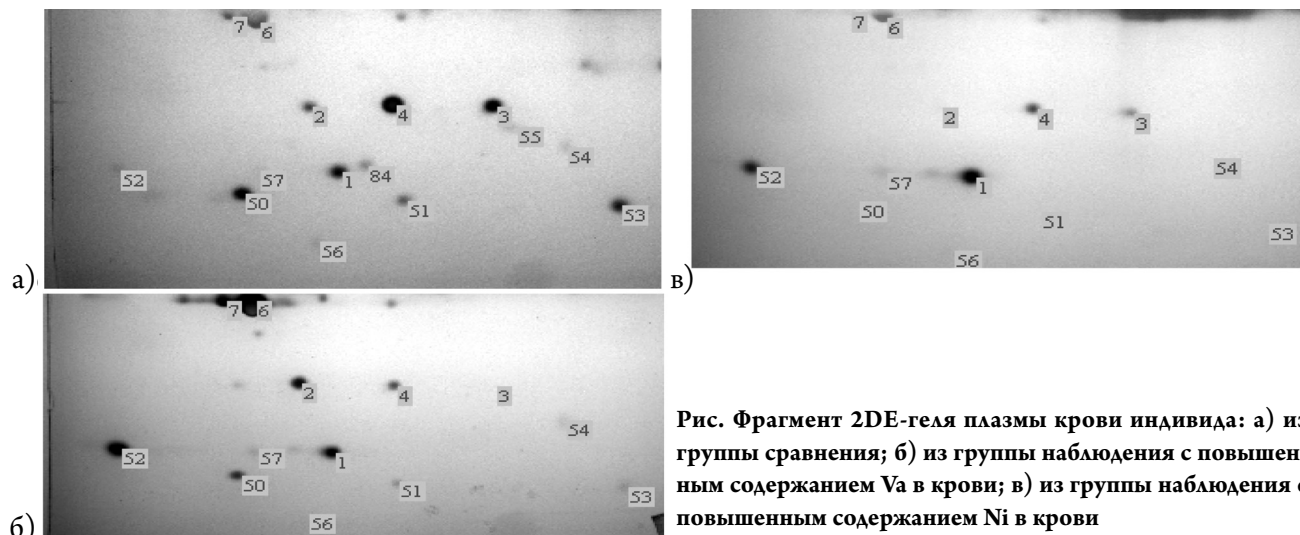


Рис. Фрагмент 2DE-геля плазмы крови индивида: а) из группы сравнения; б) из группы наблюдения с повышенным содержанием Va в крови; в) из группы наблюдения с повышенным содержанием Ni в крови

В крови обследованных лиц группы наблюдения регистрировали концентрации Va на уровне от 0,0023 до 0,003 мг/дм³, Mn — 0,036–0,048 мг/дм³, Ni — 0,27–0,30 мг/дм³ (табл.).

Средние концентрации в 2,5–9,2 раза превысили аналогичные показатели в крови лиц группы сравнения ($p=0,0001$ – $0,001$) и в 3,0–10,2 раза — референтные уровни ($p=0,0001$ – $0,0003$). Получены адекватные модели зависимости между средней годовой концентрацией Ni , Va , Mn в крови от их суммарной средней суточной дозы при ингаляционном и пероральном поступлении в организм ($F=2055,12$ – $2720,18$, $R^2=0,64$ – $0,76$, $p=0,0001$). Концентрации в крови Mn от 0,036 мг/дм³, Ni — 0,27 мг/дм³ и Va — 0,0023 мг/дм³ обоснованы в качестве маркеров хронической внешнесредовой экспозиции.

Сравнительный анализ относительного объема белковых пятен в протеомных картах плазмы крови лиц группы наблюдения и группы сравнения выявил достоверные различия в относительном объеме ряда белковых пятен (рис.).

При повышенном содержании Va в крови увеличен относительный объем белка транстирета (пятно № 1, № 52 в 2,4–4,7 раза, $p=0,021$ – $0,031$), аполипопротеина А-1 (пятно № 6 в 2,2 раза, $p=0,048$); при повышенном содержании Ni в крови снижен относительный объем белка гаптоглобина (пятно № 2 в 2,9 раза, $p=0,001$), обеспечивающего метаболизм гемоглобина.

Расчет отношения шансов показал наличие связи между концентрацией Ni в крови на уровне $0,285 \pm 0,036$ мг/дм³, Va — $0,0015 \pm 0,0005$ мг/дм³ и относительным объемом белковых пятен ($OR=2,0$ – $4,5$; $DI=1,2$ – $5,0$; $p=0,001$ – $0,012$). Долевой вклад Va и Ni в изменение относительного объема транстирета, гаптоглобина и аполипопротеина-А1 составил 15–20% ($F=12,15$ – $16,73$; $p=0,001$ – $0,012$).

При аэрогенной экспозиции Ni , Va , Mn в крови идентифицируются данные металлы в концентрациях в 3–10 раз превышающих референтный уровень. Технологичными протеомного анализа обнаружены достоверно значимые изменения протеомного профиля плазмы крови, представленные в виде повышения относительного объема транстирета, аполипопротеина А-1 и гаптоглобина. Выявленные изменения показателей протеома доказанно связаны с концентрацией Ni и Va в крови, что позволяет предположить развитие негативных эффектов, характеризующихся нарушением транспорта тироксина и холестерина, а при повышенном содержании никеля в крови — нарушением обмена гемоглобина [1].

Использование идентифицированных белков в качестве маркеров негативных эффектов является целесообразным для раннего выявления и профилактики риск-ассоциированных заболеваний в зонах влияния выбросов металлургических производств.

Выводы. 1. Неудовлетворительное качество атмосферного воздуха селитебной застройки в зоне влияния выбросов металлургического производства по содержанию Va , Ni , Mn обуславливает хроническую

экспозицию населения на уровне 0,00024–0,002 мг/(кг×день). 2. У экспонированного населения формируется повышенная концентрация Va , Ni , Mn в крови (в 3,5–3,8 раза выше показателей группы сравнения и референтного уровня). 3. Изменения протеомного профиля плазмы крови, связанные с концентрацией Va и Ni в крови, характеризуются развитием на уровне рецепторов негативных эффектов, показателями которых являются повышение относительного объема белка транстирета и аполипопротеина А-1, снижение относительного объема белка гаптоглобина. 4. Протеомные изменения могут быть связаны с цитотоксическим действием Va , что обуславливает нарушение транспорта апобелков, входящих в состав липопротеинов; цитотоксическим действием Ni , активирующим гемолиз эритроцитов, с последующим нарушением скорости образования комплекса гемоглобин-гаптоглобин и его утилизации гепатоцитами. 5. При отсутствии своевременных мер профилактики можно прогнозировать раннее развитие болезней щитовидной железы, болезней крови, нарушений обмена холестерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (см. REFERENCES стр. 11–15)

1. Воздействие на организм человека опасных и вредных экологических факторов. Метрологические аспекты. В 2-х томах / Под ред. Л.К. Исаева. — М.: ПАИМС, 1997. — 512 с.
2. Вредные вещества в окружающей среде. Элементы V-VIII групп периодической системы и их неорганические соединения / Под ред. В.А. Филова и др. — СПб: НПО Профессионал, 2007. — 452 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / под ред. Н.Е. Бузикашвили. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
4. Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В. и др. // Биохимия. — 2006. — Т. 71. Вып. 4. — С. 445–453.
5. Зайцева Н.В., Май И.В., Клейн С.В. // Анализ риска здоровью. — 2013. — № 2. — С. 14–27.
6. Клиническое рук-во по лабораторным тестам / Под ред. Н. Тица. — М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003. — 943 с.
7. Профессиональная патология: Национальное рук-во / Под ред. Н.Ф. Измерова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 784 с.
8. Руководство по контролю загрязнения атмосферы: РД 52.04.186–89. URL: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/44/44486/ (дата обращения: 27.09.2016).
9. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду: Руководство 2.1.10.1920–04. — М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 143 с.
10. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. — М.: Медиа Сфера, 1998. — 352 с.

REFERENCES

1. Isaev L.K., ed. Human exposure to ecologic hazards. Metrologic aspects. 2 volumes. — Moscow: PAIMS, 1997; 512 p. (in Russian).

2. Filov V.A., et al., eds. Chemical hazards in environment. Elements of V-VIII groups of periodic table and their inorganic compounds. — St-Petersburg: NPO Professional, 2007; 452 p. (in Russian).
3. Buzikashvili N.E., ed. Glants S. Medical and biologic statistics. — Moscow: Praktika, 1998; 459 p. (in Russian).
4. Goufman E.I., Moshkovskiy S.A., Tikhonova O.V., et al. // Biokhimiya. — 2006. — Vol. 71. — issue 4. — P. 445–453 (in Russian).
5. Zaytseva N.V., May I.V., Kleyn S.V. // Analiz riska zdorov'yu. — 2013. — 2. — P. 14–27 (in Russian).
6. N. Tits, ed. Clinical manual on laboratory tests. — Moscow: YuNIMED-press, 2003. — 943 p. (in Russian).
7. Izmerov N.F. Occupational diseases: National manual. — Moscow: GEOTAR-Media, 2011. — 784 p. (in Russian).
8. Manual on atmosphere pollution control: RD 52.04.186–89. URL: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/44/44486/ (accessed 27/09/2016) (in Russian)
9. Manual on evaluation of risk for public health under exposure to chemical pollutants of environment: Manual 2.1.10.1920–04. — Moscow: Federal'nyy tsentr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2004. — 143 p. (in Russian).
10. Fletcher R., Fletcher S., Vagner E. Clinical epidemiology. Basics of evidence-based medicine. — Moscow: Media Sfera, 1990. — 352 p. (in Russian).
11. Draft Toxicological Profile for Vanadium: U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. — Atlanta, 2009. — 206 p.
12. Gharahdaghi F., Weinberg C.R., Meagher D.A. et al. // Electrophoresis. — 1999. — № 20. — P. 601–605.
13. Hosseini M.-J., Pourahmad J., Shaki F., Ghazi-Khansari M. // Toxicology Letters. — 2012. — № 211. — P. 167.
14. Stemmler A.J., Burrows C.J. // J. Biol. Inorg. Chem. — 2001. — № 6. P. 100–106.
15. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. // Chem. Biol. Interact. — 2006. — № 160, P. 1–40.

Поступила 29.09.2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Зайцева Нина Владимировна (Zaitseva N.V.),
дир. ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», зав. каф. экологии человека и безопасности жизнедеятельности ГБОУ ВО «ПГНИУ»,
акад. РАН, д-р мед. наук, проф. E-mail: znv@fcrisk.ru.

Землянова Марина Александровна (Zemlyanova M.A.),
зав. отд. биохимич. и цитогенетич. методов диагн. ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», проф. каф. экологии человека и безопасности жизнед. ГБОУ ВО «ПГНИУ», проф. каф. охраны окружающей среды ГБОУ ВО «Пермский научный исследовательский политехнический ун-т», д-р мед. наук.
Тел.: (342)236–39–30.

УДК 616–056.527–06:616.12–008.331.1–06:616.379–008.64](470.53–25)

А.А. Воробьева¹, Е.М. Власова¹, В.В. Шевчук^{1,3}, В.Б. Алексеев¹, А.Е. Носов¹, Т.А. Пономарева¹,
С.Ю. Тендрякова²

ФОРМИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА КАК ФАКТОРА РИСКА ПАТОЛОГИИ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ У ВОДИТЕЛЕЙ

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

²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Пермскому краю, ул. Куйбышева, 50, Пермь, Россия, 614016

³ГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России,
ул. Петропавловская, 26, Пермь, Россия, 614037

Рассмотрены системные подходы по выявлению факторов, способствующих формированию метаболического синдрома и связанного с ним риска патологии системы кровообращения у водителей. Обследованы водители с метаболическим синдромом и без него. Установлено, что формирующиеся у водителей метаболические нарушения являются производственно обусловленными. Прослеживается стажевая детерминация по количеству случаев кардиоваскулярных нарушений, манифестации сахарного диабета, чаще наблюдалось сочетание гипергликемии и/или гипердислипидемии с абдоминальным ожирением. У водителей со стажем работы 15 лет и более, в возрасте 35 лет и старше, в 35% случаев выявлена артериальная гипертензия, в 43% случаев постинфарктный кардиосклероз (ПИКС), в 55% случаев нарушения ритма сердца и проводимости, причем их количество увеличивается со стажем и с возрастом и к 55 годам достигает 80% от общего числа обследованных. Сахарный диабет (СД) диагностирован в 37% случаев (у 75% работников выявлен впервые) при стаже 20 лет и более, средний возраст 50 лет.

Ключевые слова: метаболический синдром, кардиоваскулярный риск, артериальная гипертензия, нарушение углеводного обмена, дислипидемия, водители.