

*Дианова Д.Г., Долгих О.В.*

## Экспозиция ванадием как фактор негативной активации лимфоцитов

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь

*Dianova D.G., Dolgikh O.V.*

### Exposure of vanadium as a factor of adverse activation of lymphocytes

#### Резюме

Проведена оценка влияния ванадия на клеточную гибель лимфоцитов периферической крови у работающих. Оценка иммунного статуса позволила установить, что у работающих в условиях экспозиции ванадием количество аннексин-позитивных клеток, свидетельствующих об апоптозе, достоверно повышается по отношению к группе сравнения. Выявлена статистически значимая негативная активация лимфоцитов у обследуемых, чей стаж в условиях вредного производства превышал 10 лет. Таким образом, уровень и длительность экспозиции ванадием, определяемая стажем работы, усугубляет степень дисфункции иммунной системы.

**Ключевые слова:** ванадий, экспозиция, негативная активация, апоптоз

#### Summary

We have estimated effect of vanadium influence on apoptosis of peripheral blood lymphocytes among workers. Immunologic assessment have allowed establishing that people working under the conditions of vanadium exposure have significantly increased quantity of annexin-positive cells indicating apoptosis in comparison with a reference group of people. We have identified statistically significant adverse mobilization of lymphocytes in respondents who have been working under conditions of the hazardous industry over 10 years. Therefore, the level and duration of the vanadium exposure influenced by the length of employment increase the immune system dysfunction degree.

**Keywords:** Vanadium, exposure, adverse mobilization, apoptosis

#### Введение

Широкий спектр химических факторов в условиях производства способствует нарушению иммунного ответа, что может проявляться в позитивной или негативной активации лимфоцитов. Апоптоз зрелых лимфоцитов является средством регуляции интенсивности и продолжительности иммунного ответа. Неадекватное усиление апоптоза ведет к патологическим изменениям, что можно охарактеризовать как тенденцию к развитию иммунодефицитного состояния [1].

В настоящее время недостаточно изучены вопросы воздействия производственных химических факторов, обладающих иммуноотоксичностью, на процесс клеточной гибели.

**Цель работы** – оценить влияние ванадия на позитивную и негативную активацию лимфоцитов.

#### Материалы и методы

В работе использованы гигиенические, химико-аналитические, цитофлюориметрические методы исследования. Для оценки условий труда на рабочих местах использованы материалы аттестации рабочих мест,

результаты производственного контроля, результаты химико-аналитического анализа содержания химических веществ (ванадий) в воздухе рабочей зоны.

Всего, включая группу сравнения, обследовано 44 человека. В основную группу вошли 18 человек, имеющих специальность сталевар мартеповской печи, аппаратчик охлаждения, аппаратчик выщелачивания, аппаратчик нейтрализации, шихтовщик, обжигальщик, плавильщик пентаоксида ванадия, плавильщик ферросплавов. Класс условий труда в основной группе оценивался как вредный. Дополнительно в ходе исследования, обследуемые основной группы были разделены на две подгруппы в зависимости от стажа в условиях вредного производства: первая подгруппа – 9 человек (средний стаж 7,0±0,9 лет), вторая подгруппа – 9 человек (средний стаж 16,0±1,9 лет). Группу сравнения составили 26 человек (административный персонал), не имеющих контакта с вредными производственными факторами. Обе группы сопоставимы по возрасту и стажу работы на предприятии. Средний возраст основной группы составил 33,3±1,4, группы сравнения – 37,7±3,3. Средний стаж обследуемых основной группы составил 17,0±1,8, группы сравнения – 14,6±2,5.

Выборка обследуемых была достаточна для достоверного определения межгрупповых различий.

Исследование биосред (кровь) на содержание металлов (ванадий; V+5) выполнено на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Perkin Elmer 3110» («Perkin Elmer», США) с применением в качестве окислителя ацетиленовоздушной смеси с детектированием в режиме пламенной атомизации, а также государственных стандартных образцов растворов исследуемых металлов.

Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», США) с использованием универсальной программы CellQuestPro. Определение популяций лимфоцитов (CD3+CD25+, CD3+CD95+) проводили методом мембранной иммунофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам («BD», США).

Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC (Annexin V-FITC, FITC (Fluorescein Isothiocyanate)) и 7AAD (7-aminoactinomycin D) («BD», США) согласно протоколу фирмы-производителя. Для определения количества апоптотических клеток использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) [2].

Биомедицинские исследования выполнены в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 года с дополнениями 1983 года.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office и дополнительной программы статистического анализа Statistica 6.0. Достоверность различий между группами считали значимыми при  $p < 0,05$  [3].

## Результаты и обсуждение

При проведении исследований воздуха рабочей зоны выявлено, что уровень диванадия пентоксида составляет 0,07 - 2,60 мг/м<sup>3</sup>, что превышает предельно допустимую концентрацию (0,5 мг/м<sup>3</sup>) и соответствует 0,14ПДК-5,2ПДК. Непонятные мне исправления от Рослой.

Оценка уровня контаминации биосред всех обследуемых позволила установить, что в крови работающих в условиях экспозиции тяжелыми металлами статистически значимо увеличено содержание ванадия  $0,0037 \pm 0,00089$  мг/дм<sup>3</sup> по отношению к результатам, полученным в группе сравнения  $0,0012 \pm 0,00023$  мг/дм<sup>3</sup> ( $p < 0,05$ ).

Исследование активационных процессов в иммунной системе выявило, что у обследуемых основной группы достоверно выше количество лимфоцитов, экспрессирующих CD25+-антиген, относительно величин, зафиксированных в группе сравнения ( $p < 0,05$ ) (табл.1). Сравнительный анализ иммунограмм показал, что у работающих в условиях экспозиции ванадием процентное содержание иммуноцитов, вступивших в стадию апоптоза статистически значимо превышает уровень Annexin V-FITC+7AAD--клеток, зарегистрированный в группе сравнения ( $p < 0,05$ ). Оценка иммунного статуса с уче-

Таблица 1. Характеристика показателей иммунного статуса всех обследованных ( $M \pm m$ )

Показатель	Группа сравнения (n=26)	Основная группа (n=18)
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	12,19±0,62	13,17±0,72
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,21±0,01	0,27±0,02*
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> , %	33,81±1,83	35,89±2,41
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,59±0,03	0,74±0,07
Annexin V-FITC <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %	0,81±0,08	1,11±0,08*
Annexin V-FITC <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %	7,67±0,58	7,42±0,12

Примечание. \* - различия достоверны по сравнению с группой сравнения ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Характеристика показателей иммунного статуса работающих с учетом стажа в условиях экспозиции ванадием ( $M \pm m$ )

Показатель	Первая подгруппа стаж 7,0±0,9 лет (n=9)	Вторая подгруппа стаж 16,0±1,9 лет (n=9)
CD3+CD25+, %	12,78±1,16	13,56±0,90
CD3+CD25+, 10 <sup>9</sup> /л	0,25±0,03	0,28±0,02
CD95+, %	32,78±2,60	39,00±3,94
CD95+, 10 <sup>9</sup> /л	0,65±0,06	0,84±0,11
Annexin V-FITC <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %	0,94±0,07	1,27±0,13*
Annexin V-FITC <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %	6,81±0,65	8,02±1,51

Примечание. \* - различия достоверны по сравнению с первой подгруппой ( $p < 0,05$ ).

том стажа в условиях вредного производства продемонстрировала, что у обследуемых второй подгруппы (стаж более 10 лет) достоверно возрастает количество клеток вступивших в стадию апоптоза при сравнении с аналогичными показателями, полученными в первой подгруппе (стаже менее 10 лет) ( $p < 0,05$ ) (табл.2).

Основной путь поступления ванадия в организм вдыхание частичек пыли, содержащих оксиды ванадия (например, на металлургическом производстве). Этот путь является и наиболее опасным с точки зрения негативного влияния на здоровье человека [4]. Экспериментально установлено, хроническое поступление ди-ванадия пентоксида через дыхательные пути в организм животных вызывает гистологические изменения и функциональные повреждения органов иммунной системы [5, 6], что, по всей видимости, может привести к серьезным изменениям в иммунном ответе [7]. Ванадий, поступающий через респираторный тракт в организм экспериментальных животных, влияет на экспрессию медиаторов межклеточного взаимодействия и изменяет количество клеток, отвечающих за клеточный и гуморальный ответ на антиген [7]. Воздействие ванадия в зависимости от времени экспозиции и дозы может способствовать повышению экспрессии или мутации генов-активаторов апоптоза [8, 9]. Последние результаты исследования на инбредной линии мышей доказывают наличие зависимости восприимчивости к V2O5-индуцированному воспалению и опухолевому процессу от генетического фона [6].

Очевидно, эффект, оказываемый ванадием на иммунную систему, зависит от времени экспозиции и дозы воздействия. Активация процесса клеточной гибели в результате влияния производственных факторов является важным патогенетическим звеном ряда патологических

процессов работающих. Определение активационного профиля и уровня апоптоза в аннексинном тесте может иметь важное диагностическое и прогностическое значение, так как в настоящее время модуляция апоптоза иммунокомпетентных клеток рассматривается как возможный подход к терапии ряда заболеваний иммунной системы [10].

### Заключение

Таким образом, у работающих в условиях экспозиции ванадием количество аннексин-позитивных клеток, свидетельствующих об апоптозе, достоверно повышается по отношению к группе сравнения. Выявлена статистически значимая негативная активация лимфоцитов у обследуемых, чей стаж в условиях вредного производства превышал 10 лет, а уровень и длительность экспозиции ванадием, определяемая стажем работы, усугубляет степень дисфункции иммунной системы. ■

*Дианова Д.Г., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь; Долгих О.В., д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь; Автор, ответственный за ведение переписки – Дианова Д.Г. 614045, г. Пермь, ул. Орджоникидзе, 82.; тел. 8-(342)-236-39-30, E-mail: dianovadina@rambler.ru*

### Литература:

1. Дианова Д.Г., Долгих О.В., Лекомцева Е.М. Аннексин-зависимый апоптоз в условиях контаминации фенолами // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2012; 10(1): 49-53.
2. Youm A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968; 21(97): 77-89.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Под ред. Н.Е. Бузикашвили и соавт. М.: Практика. 1998: 459.
4. Самыкина Л.Н., Сказкина О.Я., Дроздова Н.И., Ибрагимов И.М. Определение активности каталазы эритроцитов как показателя антиоксидантной защиты организма лабораторных животных при воздействии пятиоксида ванадия // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010; 1(6): 1497-1502.
5. González-Villalva A., Fortoul T.I., Avila-Costa M.R., et al. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V2O5 inhalation // Toxicology and Industrial Health. 2006; 22: 113-116.
6. Fortoul T.I., Rodriguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A. et al. Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion // J. Biomed Biotechnol. 2011; 2011: 951043.
7. Pinon-Zarate G., Rodriguez-Lara V., Rojas-Lemus M. et al. Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses // J. Immunotoxicol. 2008; 5(2): 115-122.
8. Rondini E.A., Walters D.M., Bauer A.K. Vanadium pentoxide induces pulmonary inflammation and tumor promotion in a strain-dependent manner // Part. Fibre Toxicol. 2010; 7: 9.
9. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Долгих О.В. Особенности реактивности лимфоцитов в условиях экспозиции тяжёлыми металлами // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2012; 10(2): 129-132.
10. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. и др. Особенности лимфоцитарно-клеточного звена у детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях // Биологические мембраны. 2012; 29(5): 349-353.