

## ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ У НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Сетко Н.П.<sup>1</sup>, Николаева Т.В.<sup>1</sup>, Полякова В.С.<sup>1</sup>, Воронина Л.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, e-mail: k\_epidem.fpdo@orgma.ru

В статье представлены результаты эколого-эпидемиологического исследования, проведенного на трех территориях промышленных городов, отличающихся по уровню антропогенного загрязнения. Суммарное воздействие комплекса загрязнителей на 1-й территории было в 4,2 раза выше, чем на 3-й территории, и в 1,2 раза выше, чем на 2-й территории. Расчет коэффициентов опасности показал (HQ), что наибольший вклад в риск развития неонкологических заболеваний на 1-й территории проживания вносят медь, цинк, диоксид азота, диоксид серы; на 2-й территории – сероводород, марганец, цинк; на 3-й – свинец, хром, марганец. Суммарный индекс опасности (HI) для критических органов и систем составил на 1-й территории 19,68; на 2-й территории – 13,56 и на 3-й территории соответственно был равен 4,64. Установлены высокие индексы опасности поражения иммунной системы, которые на всех трех территориях проживания были примерно одинаковыми и составляли от 1,76 до 1,96. Уровни заболеваемости аутоиммунными заболеваниями кожи на исследуемых территориях не имели статистически значимых различий: на 1-й территории проживания распространенность была равна 6,69 случая на 10000 населения, на 2-й территории – 6,97 случая на 10000 населения и на 3-й территории – 6,96 случая на 10000 населения. Была выдвинута гипотеза о том, что при формировании риска развития аутоиммунных заболеваний кожи имеют значение качественные показатели загрязнения, их доза и степень кумуляции в организме. Аprobация этой гипотезы в модельном эксперименте позволила установить, что тяжелые металлы (хром, никель, свинец) приводят к изменению пролиферативного и апоптотического ответа кератиноцитов. Активация апоптоза, индуцированного тяжелыми металлами, может играть роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний кожи.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания кожи, распространенность, суммарный индекс опасности, иммунная система, тяжелые металлы, активация апоптоза.

## BIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND MECHANISM OF ACTIVATION OF APOPTOSIS, INDUCED BY HEAVY METALS

Setko N.P.<sup>1</sup>, Nikolaeva T.V.<sup>1</sup>, Poljakova V.S.<sup>1</sup>, Voronina L.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Orenburg State Medical University, Orenburg, e-mail: k\_epidem.fpdo@orgma.ru

The article presents the results of ecological and epidemiological studies conducted in three areas of industrial cities, which differ in the level of anthropogenic pollution. The total effect on the complex pollutants in the 1st area was 4.2 times higher than in the third area and 1.2 times higher than the 2nd area. The calculation of the hazard quotient (HQ) showed, that the greatest contribution to the risk of non-cancer diseases in the 1st living area is made of copper, zinc, nitrogen dioxide, sulfur dioxide; on the 2nd area - hydrogen sulfide, manganese, zinc; 3 minutes - lead, chromium and manganese. The total hazard index (HI) for critical organs and systems was on the 1st area 19.68; on the 2nd area - 13.56 and in the third area, respectively, was equal to 4.64. A high index of risk of the immune system was found. It was similar for all three areas of residence and ranged from 1.76 to 1.96. The prevalence of skin autoimmune diseases in the study area did not have a statistically significant difference: the 1st living area is the prevalence was 6.69 per 10,000 population, the 2nd area - 6.97 cases per 10,000 population and the 3rd area - 6.96 per 10,000 population. It is assumed that the formation of the risk of autoimmune diseases of the skin are qualitative indicators of pollution the value of the dose and the degree of accumulation in the body. The testing this hypothesis in a model experiment has allowed to specify that heavy metals (chromium, nickel, lead) lead to a change in the proliferative and apoptotic keratinocytes response. The activation of apoptosis induced by heavy metals, may play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases of the skin.

Keywords: autoimmune skin disease, the prevalence, the hazard quotient, hazard index, the immune system, heavy metals, activation of apoptosis.

В последние годы во всем мире особое внимание уделяется ухудшению экологической обстановки. Причем темпы развития антропогенных изменений окружающей среды значительно опережают адаптационные возможности организма человека [3; 4]. Повышенный уровень содержания различных токсичных веществ, в том числе тяжелых металлов [6; 10], в выбросах и стоках промышленных предприятий приводит к их накоплению в окружающей среде и поступлению в организм человека [3; 8]. Несмотря на пристальное внимание к проблеме неблагоприятного воздействия экологических факторов, их влияние на развитие аутоиммунных заболеваний кожи (АИЗК) практически не исследовано; отсутствует оценка риска для здоровья населения с учетом территории его проживания.

В этой связи целью исследования явилось определение риска развития и распространенности АИЗК в зависимости от уровня антропогенного загрязнения территорий проживания.

#### **Материалы и методы исследования**

Эколого-эпидемиологическое исследование проведено на трех территориях промышленных городов Оренбургской области (1-я территория – г. Медногорск, 2-я территория – г. Оренбург, 3-я территория – г. Бугуруслан), отличающихся уровнем антропогенного загрязнения. При гигиенической оценке окружающей среды, формирующейся в реальных условиях проживания, исследовано содержание химических веществ, загрязняющих воздушную среду, почву, питьевую воду по данным региональной системы социально-гигиенического мониторинга, данных управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Анализ загрязнения атмосферного воздуха проводился в соответствии с ГОСТ 17.2.3-01-86 и РД 52.04.186-89 с определением суммарного показателя загрязнения атмосферного воздуха – К воздух. Анализ почвы на исследуемых территориях осуществлялся в соответствии с СанПин 2.1.7.1278-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы»; для металлов и микроэлементов, имеющих ПДК, рассчитывались средние уровни содержания в долях ПДК, оценка степени химического загрязнения почвы дана по суммарному показателю (К почвы), который определен как сумма коэффициентов концентраций отдельных компонентов загрязнения.

Для оценки качества питьевой воды была проведена выкопировка данных результатов исследования проб из водопроводной сети в соответствии с ГОСТ 24481-80. Качество питьевой воды оценивалось по 24 показателям на соответствие СанПин 2.1.4.1074-01. На основании полученных данных рассчитаны суммарные уровни антропогенной нагрузки на исследуемые территории.

Оценка риска здоровью населения, подвергающемуся различному уровню антропогенного воздействия, произведена в соответствии с руководством Р 2.1.10.1920-04 «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии веществ, загрязняющих окружающую среду». Распространенность аутоиммунных заболеваний на исследуемых территориях проведена путем выкопировки данных из счетов-реестров медицинских учреждений Оренбургской области, направленных на оплату в Территориальный фонд обязательного медицинского страхования с исключением повторяющихся персональных данных. Показатели заболеваемости представлены в виде среднего за пятилетний период (2011–2015 гг.) числа случаев на 10000 населения и 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ).

В рамках реализации риска развития аутоиммунных заболеваний кожи и доказательства роли загрязнителей, в том числе тяжелых металлов, проведен модельный эксперимент. Исследование по оценке влияния тяжелых металлов на пролиферативную и апоптотическую активность кератиноцитов выполнено на 25 самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 6–7 недель, с исходной массой 15–17 г. Мыши были распределены на 4 опытные и контрольную группу по 5 особей в каждой. Экспериментальные животные I опытной группы в качестве питьевой воды получали водный раствор сульфата цинка 0,1238 г/л (50 мг/л в пересчёте на цинк); II опытной группы – водный раствор сульфата никеля 0,0026 г/л (1 мг/л в пересчёте на никель); III опытной группы – водный раствор бихромата натрия двухосновного 0,001433 г/л (0,5 мг/л в пересчёте на хром); IV опытной группы – водный раствор ацетата свинца (трёхводный) 0,00054 г/л (3 мг/л в пересчёте на свинец). Животные контрольной группы получали чистую питьевую воду. Исследование выполнено на фоне индукции анагена путем депиляции волос с кожи спины животных [12] восковыми мини-полосками WaxStrips «Beauty formulas» (Drammock International LTD., Великобритания) под эфирным наркозом, произведенной на 17-й день эксперимента. На 9-е сутки после депиляции, соответствующие позднему анагену [11], все животные были выведены из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Морфологическому исследованию подлежали образцы кожи, ранее подвергнутой депиляции размером 10,0 x 15,0 мм. После забора их помещали в 10%-ный нейтральный формалин и фиксировали при комнатной температуре в течение суток, затем после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. Эксперимент проводился с разрешения Локального этического комитета ГБОУ ВПО «ОрГМУ» МЗ РФ (протокол № 131 от 15.12.2015 г.), с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267).

Пролиферативную и апоптотическую активность кератиноцитов определяли иммуногистохимическим методом на гистологических срезах кожи толщиной 5 мкм и оценивали путем расчета индекса пролиферации (ИП) и индекса апоптоза (ИА). Выявление пролиферирующих эпителиальных клеток, основанное на экспрессии их ядрами белка Ki-67 [1], проводилось с использованием кроличьих моноклональных антител к Ki-67 (clone SP6) (Cell marque, США) с визуализацией Ki-67-позитивных клеток согласно протоколу фирмы-производителя (Cell marque, США). Апоптотические клетки выявлялись путем идентификации каспазы-3, с использованием первичных антител Human CPP 32 (caspase-3) Clone JHM62 согласно протоколу фирмы-производителя (Spring BioScience, США). Подсчет клеток проводился не менее чем в 15 полях зрения при увеличении  $\times 600$ . Ki-67-позитивные клетки распознавались по наличию ядра коричневого цвета, каспаза-3-позитивные – по темно-коричневой зернистости в ядре и цитоплазме. Оценивались клетки покровного эпителия и эпителиальные клетки волосяных фолликулов – наружной и внутренней оболочек влагалища фолликула волоса, без учета зоны матрикса, где из-за скопления гранул меланина меченые ядра клеток трудно различимы. Для каждого поля зрения рассчитывали индекс пролиферации и индекс апоптоза, которые представляли собой долю позитивно окрашенных клеток к общему количеству клеток, выраженному в процентах [5]. Данные для каждой группы представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки средней ( $M \pm m$ ), и 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение данных каждой из опытных групп и контрольной проводилось с помощью критерия Манна-Уитни (1947). В том случае, если доверительные интервалы для средних значений сравниваемых показателей имели трансгрессию, различия между ними считались статистически незначимыми [9].

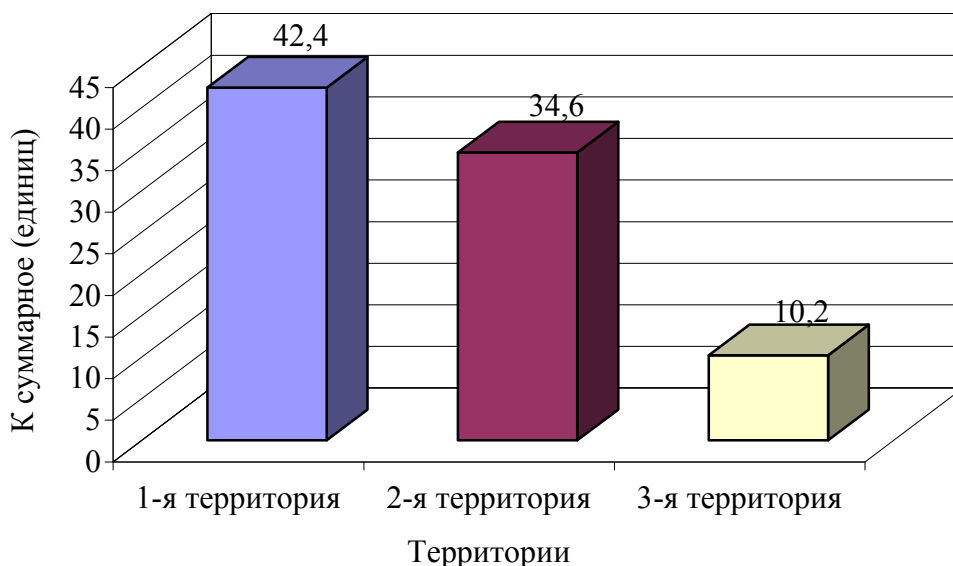
### **Результаты исследования и их обсуждение**

В результате проведенных исследований установлено, что загрязнение атмосферного воздуха 1-й территории характеризуется превышением ПДК диоксида азота в 1,62 раза, диоксида серы в 1,53 раза, никеля в 2,1 раза, кадмия в 1,5 раза. На 2-й территории отмечалось превышение ПДК в атмосферном воздухе формальдегида в 2,0 раза, 3,4-бенз(а)пирена в 2,1 раза, диоксида азота в 1,16 раза, свинца в 2,0 раза. В атмосферном воздухе 3-й территории ни один из выявленных загрязнителей не превышал ПДК по среднесуточным концентрациям. При анализе структуры загрязнения атмосферного воздуха металлами наибольший вклад вносили на 1-й территории никель (32%), кадмий (23%), хром (15%), марганец (12%); на 2-й территории соответственно свинец (38%), никель (26%), марганец (10%), хром (9%); на 3-й территории металлами-загрязнителями были свинец (58%), кадмий (17%), хром (15%).

В питьевой воде, которой пользуется население, проживающее на трех исследуемых территориях, идентифицированы такие поллютанты, как хлориды, свинец, кадмий, никель,

железо, фториды, хром, нитраты, алюминий, содержание которых было в пределах допустимого уровня. В связи с тем что почва является аккумулярующей средой, то по уровню ее загрязнения можно дополнительно судить о состоянии атмосферного воздуха и воды, как контактирующей и аккумулярующей среды. Выявлено, что на 1-й территории приоритетными загрязнителями почвы являются свинец ( $K_c=8,2$ ), медь ( $K_c=5,6$ ), цинк ( $K_c=3,22$ ); на 2-й территории – хром ( $K_c=1,58$ ), никель ( $K_c=1,55$ ), марганец ( $K_c=1,36$ ), свинец ( $K_c=1,2$ ); на 3-й территории концентрации поллютантов не превышали ПДК или Кларка.

Оценка величины антропогенной нагрузки на организм населения, определенная концентрацией загрязнения атмосферного воздуха, почвы и воды в исследуемых территориях, представленная на рисунке 1, свидетельствует о том, что суммарное воздействие комплекса загрязнителей на население 1-й территории в 4,2 раза выше, чем на 3-й территории и в 1,2 раза выше, чем на 2-й территории.



*Рис. 1. Суммарная антропогенная нагрузка на организм населения, проживающего на трех исследуемых территориях*

С целью оценки последствий влияния многокомпонентных загрязнителей на здоровье населения проведен расчет неканцерогенного риска. Установлено, что с учетом рассчитанных коэффициентов опасности (HQ) наибольший вклад в риск развития неонкологических заболеваний на 1-й территории проживания вносят медь ( $HQ=6,5$ ), цинк ( $HQ=3,2$ ), диоксид азота ( $HQ=1,53$ ), диоксид серы ( $HQ=1,29$ ). На 2-й территории соответственно сероводород ( $HQ=2,6$ ), марганец ( $HQ=1,83$ ), цинк ( $HQ=0,93$ ); на 3-й территории – свинец ( $HQ=0,83$ ), хром ( $HQ=0,54$ ), марганец ( $HQ=0,22$ ).

Анализ данных, представленных в таблице, свидетельствует о том, что самые высокие суммарные риски от загрязнителей были на 1-й территории, где суммарный индекс опасности для критических органов и систем составил 19,68; на 2-й территории – 13,56 и на 3-й территории соответственно был равен 4,64. Важно отметить, что при исключении такого органа-мишени, как органы дыхания, имеют место высокие индексы опасности поражения иммунной системы, которые на всех трех территориях проживания были примерно одинаковыми и составляли от 1,76 до 1,96.

Суммарные индексы опасности для критических органов и систем организма населения, проживающего на исследуемых территориях

Критические органы и системы	Суммарные индексы опасности (НИ)		
	1-я территория	2-я территория	3-я территория
Органы дыхания	13,96	8,72	1,24
Кровь	1,47	0,72	0,61
ЦНС	0,43	1,22	0,12
Иммунная система	1,96	1,80	1,76
Системные поражения	1,86	1,10	0,91
Суммарный индекс	19,68	13,56	4,64

Подтверждением роли химических загрязнителей в риске развития аутоиммунных заболеваний кожи является распространенность последних среди населения, проживающего на трех исследуемых территориях. Установлено, что средние показатели числа аутоиммунных заболеваний кожи у населения за последние пять лет составили на 1-й территории проживания 6,69 случая на 10000 населения (95% ДИ 3,66–9,71 случая на 10000 населения), на 2-й территории – 6,97 случая на 10000 населения (95% ДИ 6,28–7,65 случая на 10000 населения) и на 3-й территории – 6,96 случая на 10000 населения (95% ДИ 4,65–9,26 случая на 10000 населения). Анализ полученных данных позволяет предположить, что, вероятно, помимо общего уровня антропогенной нагрузки на организм, имеют значение качественные показатели загрязнения, их доза и степень кумуляции в организме.

Апробация гипотезы в проведенных экспериментальных исследованиях позволила показать, что поступление в организм животных I опытной группы раствора сульфата цинка стимулировало пролиферативную активность кератиноцитов (рис. 2).

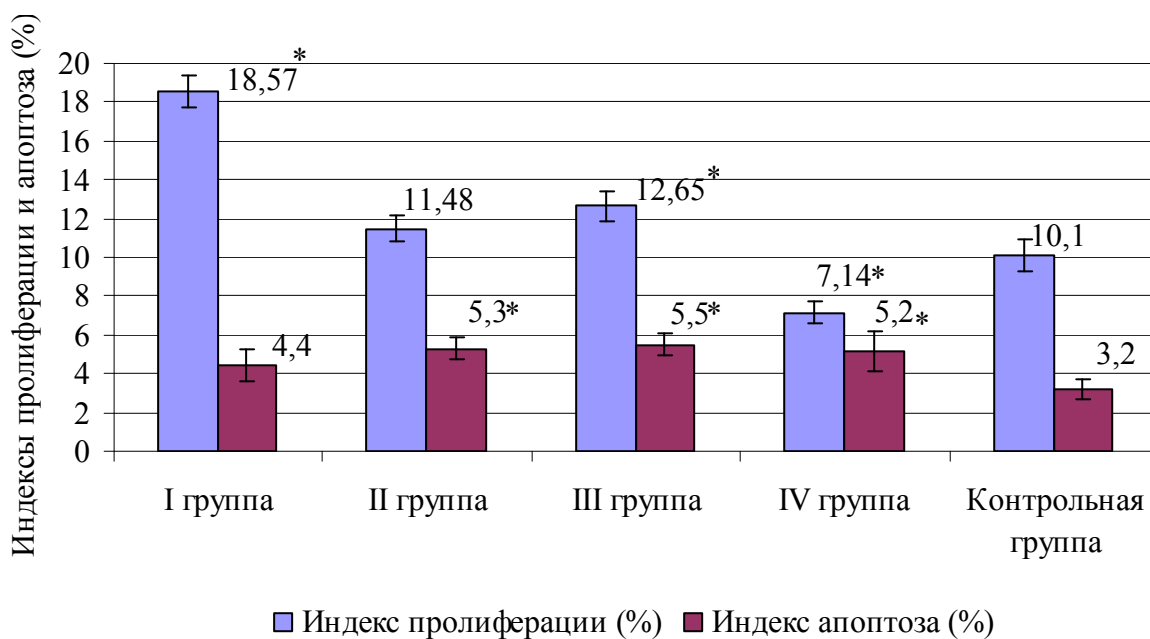


Рис. 2. Индексы пролиферации и апоптоза эпителиальных клеток кожи мышей подопытных групп (планки погрешностей обозначают 95%-ный доверительный интервал; \* –  $p < 0,01$ )

Индекс пролиферации (ИП) кератиноцитов мышей I опытной группы составил  $18,57 \pm 0,34\%$  (95% ДИ 17,68–19,4%), превысив на 85,7% ИП кератиноцитов мышей контрольной группы, равный  $10,1 \pm 0,33\%$  (95% ДИ 9,39–10,95%). При этом введение сульфата цинка не привело к изменению апоптотической доминанты эпителиальных клеток кожи. Противоположные эффекты были получены при введении мышам раствора сульфата никеля. Введение этого вещества животным II опытной группы привело к увеличению ИА кератиноцитов на 65,6%, составив  $5,3 \pm 0,21\%$  (95% ДИ 4,79–5,87%) против  $3,2 \pm 0,22\%$  (95% ДИ 2,67–3,73%) у животных контрольной группы, не оказав влияния на пролиферативный ответ кератиноцитов. Поступление в организм мышей III опытной группы раствора бихромата калия активировало как апоптоз кератиноцитов, так и их пролиферацию. Так, ИА кератиноцитов у мышей III опытной группы превысил аналогичный показатель у животных контрольной группы на 71,9% и составил соответственно  $5,5 \pm 0,22\%$  (95% ДИ 4,92–6,07%) и  $3,2 \pm 0,22\%$  (95% ДИ 2,67–3,73%). Индекс пролиферации кератиноцитов у мышей III опытной группы был равен  $12,65 \pm 0,29\%$  (95% ДИ 11,89–13,4%), что на 26,5% превышало ИП кератиноцитов у животных контрольной группы ( $10,1 \pm 0,33\%$  (95% ДИ 9,39–10,95%)). Поступление в организм животных IV опытной группы раствора ацетата свинца активировало апоптоз кератиноцитов. Индекс апоптоза у животных этой группы по сравнению с аналогичным показателем у мышей контрольной группы был выше на 62,5% и составил  $5,2 \pm 0,37\%$  (95% ДИ 4,16–6,23%). В то же время воздействие ацетата свинца оказало угнетающее влияние на пролиферативную активность кератиноцитов. Индекс пролиферации

кератиноцитов мышей VI опытной группы составил  $7,14 \pm 0,21\%$  (95% ДИ 6,55–7,72%), что было ниже на 28,6% ИП кератиноцитов мышей контрольной группы, равного  $10,1 \pm 0,33\%$  (95% ДИ 9,39–10,95%).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что активация апоптоза, индуцируемого бихроматом натрия, сопровождается увеличением пролиферативной активности кератиноцитов, которое, вероятно, носит компенсаторный характер. Это согласуется с результатами отдельных авторов, полученных на примере других тканей [7]. Однако активация апоптоза в случае поступления в организм животных сульфата никеля не сопровождается усилением пролиферации, а при введении ацетата свинца пролиферативный ответ кератиноцитов подавляется. Активация апоптоза рассматривается рядом исследователей в качестве фактора, способствующего возникновению аутоиммунных реакций [13; 15], что связывают с экстернализацией внутриклеточных аутоантигенов и неспособностью фагоцитов к полноценному удалению апоптотического материала в случае массивного апоптоза [14].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что загрязнение окружающей среды территорий проживания влияет на развитие аутоиммунных заболеваний кожи, при этом такие приоритетные загрязнители, как хром, никель, свинец, приводят к изменению пролиферативного и апоптотического ответа кератиноцитов, подтвержденному экспериментальными данными.

### Список литературы

1. Бабиченко И.И., Ковязин В.А. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста : учебное пособие. - М. : РУДН, 2008.
2. Овсянникова Н.М. Особенности адаптационных реакций человека в связи с содержанием тяжелых металлов в организме // Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2010. – Т. 26 (62). – № 2. – С. 142–151.
3. Рахманин Ю.А. Актуализация проблем экологии человека и гигиены окружающей среды и пути их решения // Гигиена и санитария. – 2012. – № 5. – С. 4–8.
4. Сетко А.Г., Сетко Н.П., Макарова Т.М., Сетко И.М. Особенности адаптированности детей к факторам среды обитания и критерии их оценки // Гигиена и санитария. – 2005. – № 6. – С. 57.



5. Яровая Г.А., Нешкова Е.А., Мартынова Е.А., Блохина Т.Б. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза // *Лабораторная медицина*. – 2011. – № 11. – С. 39–53.
6. Banerjee B.D., Chakraborti A., Suke S.G., Ahmed R.S., Tripathi A.K. Xenobiotic-induced immune alterations: Implications in health and disease // *Indian. J Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 45. – P. 7–15.
7. Beaver L.M., Stemmy E.J., Schwartz A.M., Damsker J.M., Constant S.L., Ceryak S.M. et al. Lung inflammation, injury, and proliferative response after repetitive particulate hexavalent chromium exposure // *Environ. Health Perspect.* – 2009. – Vol. 117. – № 12. – P. 1896–1902.
8. Das K.K., Das S.N., Dhundasi S.A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress // *Indian. J. Med. Res.* – 2008. – Vol. 128. – № 4. - P. 412–425.
9. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. - 5th edition. - New York : McGraw-Hill Inc, 2002.
10. Jan A.T., Azam M., Siddiqui K., Ali A., Choi I., Haq Q.M. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – № 12. – P. 29592–29630.
11. Müller-Röver S., Handjiski B., van der Veen C., Eichmüller S., Foitzik K., McKay I.A. et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages // *J. Invest. Dermatol.* – 2001. – Vol. 117. – № 1. - P. 3–15.
12. Paus R., Handjiski B., Eichmüller S., Czarnetzki B.M. Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone // *Am. J. Pathol.* – 1994. – Vol. 144. – № 4. – P. 719–734.
13. Peng Y., Martin D.A., Kenkel J., Zhang K., Ogden C.A., Elkon K.B. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells // *J. Autoimmun.* – 2007. – Vol. 29. – P. 303–309.
14. Pieterse E., Hofstra J., Berden J., Herrmann M., Dieker J., van der Vlag J. Acetylated histones contribute to the immunostimulatory potential of neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.* – 2015. – Vol. 179. – № 1. – P. 68–74.
15. Yu C., Chang C., Zhang J. Immunologic and genetic considerations of cutaneous lupus erythematosus: a comprehensive review // *J. Autoimmun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 34–45.