

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РИСКА

УДК 614.878.086

ОЦЕНКА НАРУШЕНИЙ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ДЕТЕЙ ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ МЕЛКОДИСПЕРСНОЙ ПЫЛИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ВАНАДИЙ

Н.В. Зайцева¹, М.А. Землянова^{1,2}

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

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

Представлены результаты исследований и оценки белкового профиля плазмы крови у детей, подвергающихся длительной экспозиции мелкодисперсной пыли, содержащей ванадий, в зоне влияния источников металлургического производства. Установлено, что в условиях неудовлетворительного качества атмосферного воздуха селитебной застройки по содержанию пыли ванадия пентаоксида на уровне до 1,2 ПДК_{сс} (34 RfC_{chr}), взвешенных веществ – до 0,6 ПДК_{сс} (1,2 RfC_{chr}) у экспонированных детей 4–7 лет формируется концентрация ванадия в крови, до 6 раз превышающая референтный уровень. Технологией протеомного анализа показано, что у детей с повышенным содержанием ванадия в крови наблюдается изменение протеомного профиля плазмы крови в виде увеличения относительно объёма кислого гликопротеина альфа-1; снижения кластерина, аполипопротеина А-IV, альфа-2-HS-гликопротеина, доказанно связанное с концентрацией ванадия в крови. При отсутствии своевременных мер первичной и вторичной профилактики и сохранении устойчивой экспозиции ванадия выявленные клеточно-молекулярные нарушения позволяют прогнозировать в дальнейшем развитие функциональных нарушений на тканевом и органном уровне в виде раннего развития остеопороза и костно-суставной патологии, атеросклеротических изменений сосудов, аутоиммунных аллергических процессов на фоне нарушения иммунной регуляции, онкологических заболеваний.

Ключевые слова: протеомный профиль, плазма крови, ванадий, молекулярные маркеры, ингаляционная экспозиция.

Введение. Ванадий, содержащийся в составе мелкодисперсной пыли, входит в перечень химических веществ, формирующих неудовлетворительное качество атмосферного воздуха селитебных территорий в зоне влияния металлургических производств по переработке ванадийсодержащих руд.

Ванадий и мелкодисперсная пыль входят в список загрязняющих веществ атмосферного воздуха, рассматриваемых в «Рекомендациях ВОЗ по качеству воздуха в Европе», подготовленных в сотрудничестве с международной программой по химической безопасности и Европейской комиссией (ЕС) в 2000 г.

При аэрогенном поступлении в организм в составе аэрозоля конденсации или дезинтегра-

ции (мелкодисперсной пыли) ванадий характеризуется большей степенью токсичности по сравнению с элементарным ванадием и его сплавами с другими металлами – феррованадием, карбидом ванадия. Отличается высокой реакционной способностью, проникает через гематоэнцефалический барьер, кумулирует во внутриклеточных и тканевых структурах. Характеризуются наряду с общерезорбтивным действием специфическими эффектами раздражающего и системного действия на органы и системы-мишени, в первую очередь органы дыхания (токсикологические профайлы Агентства по регистрации токсичных веществ и заболеваний США (ATSDR, 2009)) [9]. Известны определенные генотоксические и мутагенные эффек-

© Зайцева Н.В., Землянова М.А., 2016

Зайцева Нина Владимировна – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор (e-mail: znv@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-25-34).

Землянова Марина Александровна – доктор медицинских наук, заведующий отделом биохимических и цитогенетических методов диагностики (e-mail: zem@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

ты [16]. Негативные эффекты воздействия ванадия реализуются на клеточно-субклеточном уровне в виде индукции свободно-радикальных процессов в результате взаимодействия с белковыми комплексами I, III и IV дыхательной цепи, что приводит к развитию окислительного стресса, необратимым модификациям нуклеиновых кислот и белков и, как следствие, к нарушению их структуры и функциональной активности на молекулярном уровне [18].

Исследование протеомного профиля плазмы крови индивидов технологиями протеомного анализа и установление белков-мишеней, изменение спектра которых ассоциировано с воздействием мелкодисперсной пыли, содержащей ванадий, является актуальным для расширения доказательной базы причинения вреда здоровью при решении задач гигиенической экспертизы и расследований в связи с аэрогенным воздействием металлов в составе мелкодисперсной пыли, для повышения эффективности мер ранней диагностики и профилактики, принятия управленческих решений [4].

Данные исследования продолжают цикл работ по организации и проведению изучения у детей нарушений белкового профиля плазмы крови в условиях воздействия тяжёлых металлов, проводимых Федеральным научным центром медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения.

Материалы и методы. Гигиеническая оценка качества атмосферного воздуха на содержание мелкодисперсной пыли и пятиоксида ванадия выполнена на примере территории с размещением источников металлургического производства по переработке ванадийсодержащей руды на основании аналитического обобщения результатов многолетних мониторинговых наблюдений за период 2010–2015 гг. (данные ГУ Пермского ЦГМС и Роспотребнадзора по Пермскому краю) и натурных исследований (данные ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»), расчетов рассеивания загрязняющих веществ в атмосферном воздухе от стационарных источников методом пространственно-временного анализа в среде ГИС ARC/View (версия 3.2). Оценку полученных концентраций загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест проводили на основании сравнительного анализа с предельно допустимыми и референтными концентрациями для хронического ингаляционного воздействия ($ПДК_{cc}$ и RfC_{chr}) [1, 5].

Зоной влияния источника считали территорию, на которой достигаются приземные концентрации выше $0,05 ПДК_{cc}$ [6].

Комплексное углубленное исследование включало обследование 44 детей в возрасте 4–7 лет, постоянно проживающих в жилой застройке, расположенной в зоне влияния мелкодисперсной пыли, содержащей ванадий и поступающей в атмосферный воздух в составе выбросов металлургического производства по переработке ванадийсодержащих руд. Для проведения сравнительного анализа выбраны дети аналогичного возраста, проживающие на селитебной территории, максимально удаленной от зоны влияния компонентов выбросов металлургического производства (38 человек). Группы были сопоставимы по социально-бытовым условиям жизни, отсутствию отягощенного наследственного анамнеза, профессиональных вредностей у родителей, качеству питьевой воды. Обследование выполнено при обязательном получении письменного информированного согласия родителей детей, включенных в выборку, в соответствии с соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. (с изменениями и дополнениями 2008 г.). Качество исследований обеспечено систематическим участием в Федеральной и международной системе оценки качества.

Химико-аналитическое исследование содержания ванадия в крови детей выполнено методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в соответствии с [3]. Установленные концентрации ванадия в крови оценивали на основании сравнительного анализа с референтным уровнем в крови (RfL) [7]. Дети, имеющие концентрацию ванадия в крови выше референтного значения ($C_{Va} > RfL_{Va}$), составили группу наблюдения; имеющие концентрацию ванадия в крови на уровне или ниже референтного значения ($C_{Va} \leq RfL_{Va}$) – составили группу сравнения.

Для исследования изменений белкового состава (протеома) использовали термостабильную фракцию плазмы крови, подготовленную в соответствии с принятыми методами [4, 10, 14, 15]. Технология протеомного анализа включала фракционирование белков плазмы крови методом двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле, выполненное с использованием комплекса оборудования для проведения двухмерного электрофореза (Bio-Rad, США) и в соответствии с рекомендован-

ными методиками [12, 13]. Фотографирование геля осуществляли с помощью системы визуализации GelDoc XR (Bio-Rad, США) с разрешением 254 dpi. В результате фракционирования термостабильной фракции плазмы крови методом двухмерного электрофореза получены протеомные карты, содержащие информацию о конкретных белках и их характеристиках (молекулярной массе и изоэлектрической точке), необходимых для последующей идентификации белков. Анализ протеомных карт (распределение гелей по группам, нормализация гелей, распознавание пятен, вычисление относительного объёма пятен, выявление межгрупповых различий) осуществляли с помощью программного комплекса PDQuest 8.0 (Bio-Rad, США). Для каждого белкового пятна рассчитывали относительный объём, выраженный в процентах объёма от общего объёма значимых пятен на геле ($V\%$). Средний относительный объём пятен рассчитывали для каждой группы. В результате проведения двухмерного электрофореза плазмы крови детей исследуемых выборок получены протеомные карты, в которых интенсивность и площадь белковых пятен пропорциональна количеству белка в плазме крови. Оценку частоты встречаемости и относительно объёма белковых пятен в протеомных картах у детей с повышенным содержанием ванадия в крови проводили на основании сравнительного анализа с результатами детей, имеющих содержание ванадия в крови на уровне референтного значения.

Подготовка белковых пятен к идентификации методом ВЭЖХ-МС/МС включала вырезание белковых пятен и отмывку геля от серебра раствором тиосульфата натрия и гексацианоферрата (III) калия с последующим трипсинолизом белков в геле под действием диметилированного трипсина (производство Sigma) в соответствии с рекомендованными методиками [11, 17] и лиофилизацией полученного гидролизата белков на центробежном вакуумном концентраторе CentriVap (Labconco, США).

Хроматографирование белкового гидролизата после его предварительного растворения в 5%-ном ацетонитриле с добавлением 0,1%-ной муравьиной кислоты (FA) выполнено в оптимально подобранных условиях: подвижная фаза: А) вода, 0,1 % FA; В) ацетонитрил, 0,1 FA; градиент: уравнивание (5 % В) – 15 мин; 5–80 % В – 140 мин; 80 % В – 20 мин; скорость потока: 200 нл/мин; объём пробы: 20 мкл; $T\text{ }^{\circ}\text{C}$ колонки: 25,0 $^{\circ}\text{C}$; $T\text{ }^{\circ}\text{C}$ образца: 5,0 $^{\circ}\text{C}$.

Масс-спектрометрия полученных образцов выполнена в ходе информационно-зависимого эксперимента на тандемном масс-спектрометре 4000 QTRAP (AB Sciex, Канада) с источником ионов NanoSpray. По полученным спектрам строили последовательность аминокислот в пептиде, а затем осуществляли поиск данной последовательности пептидов в составе белков по доступным базам данных. Идентификация белков выполнена по спектрам дочерних ионов в базе данных SwissProt при помощи поисковой машины Mascot (Matrixscience, Великобритания). Критерием достоверности идентификации белка являлась идентификация пептидов со статистической значимостью $p \leq 0,05$.

Выявление и оценка связи относительного объёма выделенных белковых пятен в протеомной карте с концентрацией ванадия в крови выполнена на основании расчета показателя отношения шансов (OR) и его доверительного интервала (DI) [8]. Критерием наличия связи «концентрация ванадия в крови – показатель эффекта» являлось $OR \geq 1$.

Результаты и их обсуждение. Оценка качества атмосферного воздуха селитебной застройки в зоне влияния источников выбросов металлургического производств свидетельствует о неудовлетворительной ситуации в течение последних 5 лет по содержанию пыли ванадия пятиоксида на уровне до 1,2 ПДК_{сс}, взвешенных веществ – до 0,6 ПДК_{сс}, мелкодисперсной пыли фракций $PM_{2,5}$ и PM_{10} – 0,58–0,73 ПДК_{мр}. Превышение референтных уровней для хронического ингаляционного воздействия по ванадию составило 34 RfC_{chr} , взвешенным веществам – 1,2 RfC_{chr} . Зона загрязнения атмосферного воздуха пылью ванадия пятиоксида (на уровне от 1 до 2,2 ПДК_{сс}), в которой проживает около 20 тысяч населения, в том числе 4 тысячи детей в возрасте от 0 до 14 лет, распространяется от места расположения металлургического производства на селитебную территорию в южном, восточном, северном и северо-восточном направлениях.

Углубленные исследования показали, что в крови детей, подвергающихся длительной ингаляционной экспозиции мелкодисперсной пыли, содержащей ванадий, регистрируются повышенные концентрации ванадия. Установлено, что средняя концентрация ванадия в крови составила $0,00081 \pm 0,00018$ мг/дм³ и в 6,1–6,2 раза превысила аналогичные показатели в крови детей группы сравнения ($0,000132 \pm 0,00001$ мг/дм³, $p = 0,0001$) и референтный уровень. Средняя

концентрация ванадия в крови детей является маркером хронической экспозиции ванадия, что подтверждено наличием достоверной прямой зависимости ($r = 0,75$; $p = 0,0005$) концентрации ванадия в крови от среднегодовой концентрации ванадия в атмосферном воздухе исследуемой территории, описываемой линейным уравнением вида: $y = 0,00078x + 21,95$, где y – концентрация ванадия в крови, мг/дм³; x – среднегодовая концентрация ванадия в атмосферном воздухе, мг/м³.

Сравнительный анализ относительного объёма белковых пятен в протеомных картах плазмы крови детей обеих групп позволил выявить наличие достоверных различий в относительном объёме ряда белковых пятен. Данные по средним относительным объёмам белковых пятен с распределением по группам представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Сравнительный анализ протеомных карт плазмы крови в исследуемых выборках показал, что у детей с повышенным содержанием в крови ванадия увеличен относительный объём белкового пятна 0805 (в среднем в 1,84 раза);

уменьшен относительный объём пятен 2304 (в 1,35 раза), 2504 (в 1,85 раза), 1706 (в 1,61 раза) относительно аналогичных показателей у детей группы сравнения. В результате масс-спектрометрического детектирования отличающихся белков получены спектры дочерних ионов пептидов, пример которого представлен на рис. 2.

Идентификация белков с измененным относительным объемом показала, что изменение белкового профиля плазмы крови у детей с повышенным содержанием ванадия в крови характеризуется значимым ($p \leq 0,05$) увеличением относительного объёма кислого гликопротеина альфа-1, снижением относительного объёма кластерина, аполипопротеина A-IV, альфа-2-HS-гликопротеина. Оценка причинно-следственных связей «концентрация ванадия в крови – показатель эффекта» позволила установить, что у детей группы наблюдения вероятность изменения идентифицированных белков плазмы крови в 2,52–3,71 раза ($DI = 1,87–4,78$; $p = 0,0001–0,002$) выше, чем в группе сравнения (табл. 2).

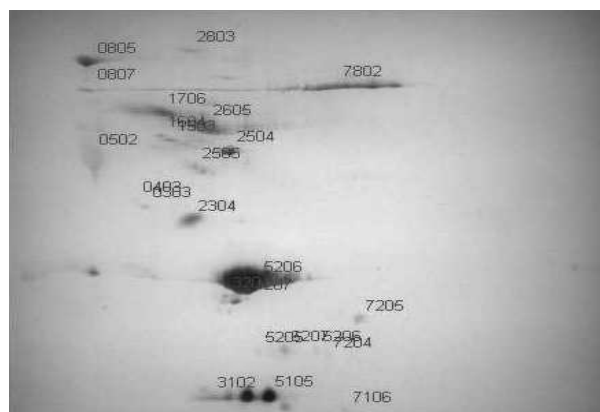
Таблица 1

Результаты денситометрического измерения относительного объёма белковых пятен плазмы крови у обследуемых детей ($p \leq 0,05$)

Номер белкового пятна	Среднее значение относительного объёма белкового пятна (относит. объем)		Кратность различий между группами (M_2/M_1)
	Группа сравнения (M_1)	Группа наблюдения (M_2)	
2304	60184,3	44755,8	0,74
0805	9566,7	17628,6	1,84
2504	40175,2	21613,7	0,54
1706	91964,8	57265,7	0,62



а



б

Рис. 1. 2DE-гели плазмы крови детей:
а – пример из группы сравнения; б – из группы наблюдения

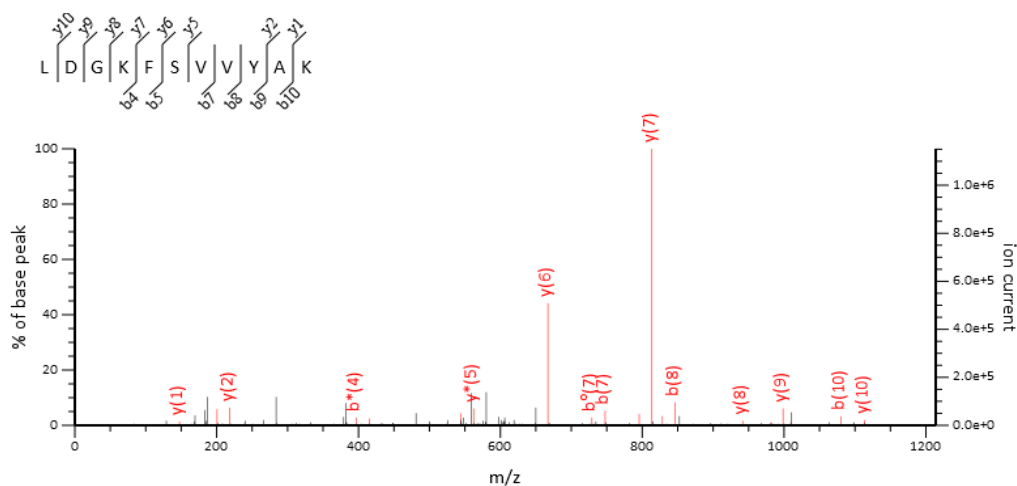


Рис. 2. Спектр пептида LDGKFSVVYAK, фрагмента FETUA_HUMAN (альфа-2-HS-гликопротеин) (база данных SwissProt) плазмы крови ребенка с повышенным содержанием ванадия в крови

Таблица 2

Показатели связи изменения протеомного профиля плазмы крови у детей от концентрации ванадия в крови

Показатель эффекта	Группа	Ответ на воздействие		OR	95 % DI
		есть	нет		
Снижение кластерина	Наблюдения	10	9	3,11	2,24–4,37
	Сравнения	5	14		
Увеличение кислого гликопротеина альфа-1	Наблюдения	9	10	2,52	1,87–3,44
	Сравнения	5	14		
Снижение аполипопротеина А-IV	Наблюдения	12	7	2,94	2,10–3,95
	Сравнения	7	12		
Снижение альфа-2-HS-гликопротеина	Наблюдения	12	7	3,71	3,06–4,78
	Сравнения	6	13		

Выводы. Выполненное исследование показало, что у детей с повышенным содержанием ванадия в крови (до 6 раз превышающем референтный уровень) технологиями протеомного анализа обнаружены достоверно значимые изменения протеомного профиля плазмы крови, представленные в виде повышения относительного объёма кислого гликопротеина альфа-1; снижения относительного объёма кластерина, аполипопротеина А-IV, альфа-2-HS-гликопротеина. Выявленные изменения показателей протеома доказанно связаны с концентрацией ванадия в крови. Установленные изменения протеомного профиля у детей с повышенным содержанием ванадия в крови позволяют предположить развитие на молекулярном уровне негативных эффектов, характеризующихся нарушением регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, снижением активности противовоспалительной и усилением активности воспалительной реакции, снижением активности минерализации костной ткани, дислипидемией.

Таким образом, результаты выполненных исследований позволили установить, что в условиях неудовлетворительного качества атмосферного воздуха селитебной застройки по содержанию мелкодисперсной пыли, содержащей ванадий (по пыли ванадия пятиоксида до 1,2 ПДК_{сс}, взвешенным веществам – до 0,6 ПДК_{сс}) у экспонированных детей уже в возрасте 4–7 лет формируется концентрация ванадия в крови, в 6,1–6,2 раза превышающая аналогичный показатель в крови неэкспонированных детей и референтный уровень. Изменения протеомного профиля плазмы крови, доказанно связанные с концентрацией ванадия в крови, характеризуются изменениями на молекулярном уровне в виде повышения относительного объёма кислого гликопротеина альфа-1, снижения относительного объёма кластерина, аполипопротеина А-IV, альфа-2-HS-гликопротеина. При отсутствии своевременных мер первичной и вторичной профилактики и сохранении устойчивой экспозиции можно про-

гнозировать в дальнейшем развитие функциональных нарушений на тканевом и органном уровне в виде раннего развития остеопороза и костно-суставной патологии, атеросклеротических изменений сосудов, аутоиммунных аллергических процессов на фоне нарушения иммунной регуляции, онкологических заболеваний. Использование идентифицированных белков в качестве маркеров негативных

эффектов у детей в зонах влияния источников выбросов металлургических производств по переработке ванадийсодержащих руд является целесообразным для расширения доказательной базы причинения вреда здоровью при решении задач гигиенической экспертизы и расследований раннего выявления и профилактики рискассоциированных заболеваний.

Список литературы

1. ГН 2.1.6.1338-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. – 2004. – 143 с.
2. 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. – С. 14–27.
3. МУК 4.1.3230-14. Измерение массовой концентрации химических элементов в биосубстратах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: методические указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2014.
4. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза / Е.И. Гоуфман, С.А. Мошковский, О.В. Тихонова, И.Г. Лохов, В.Г. Згода, М.В. Серебрякова, И.Ю. Торопыгин, М.А. Власова, М.Р. Сафарова, О.В. Макаров, А.И. Арчаков // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 4. – С. 445–453.
5. Р 2.1.10.1920-04. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 143 с.
6. РД 52.04.186-89. Руководство по контролю загрязнения атмосферы [Электронный ресурс]. – URL: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/44/44486/ (дата обращения: 10.11.2015).
7. Тиц Н.М. Клиническое руководство по лабораторным тестам. – М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003. – 943 с.
8. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. – М.: Медиа Сфера, 1998. – 352 с.
9. Draft Toxicological Profile for Vanadium: U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. – Atlanta, 2009. – 206 p.
10. Dodeca Silver Stain Kit. Instruction Manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110150B.pdf> (дата обращения: 16.06.2015).
11. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity / Farzin Gharahdaghi, Catherine R. Weinberg, Denise A. Meagher, Brian S. Imai, Sheenah M. Mische // Electrophoresis. – 1999. – № 20. – P. 601–605.
12. PROTEAN i12 IEF System. Instruction Manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10022069A.pdf> (дата обращения: 16.07.2015).
13. PROTEAN II xi 2D cell. Instruction Manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1651801.pdf> (дата обращения: 16.07.2015).
14. QuantiPro BCA assay kit. Technical bulletin [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/qpbcabul.pdf> (дата обращения: 16.06.2015).
15. ReadyPrep 2-D starter kit. Instruction Manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110009A.pdf> (дата обращения: 16.06.2015).
16. Stemmler A.J., Burrows C.J. Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium (IV) and vanadium (V) complexes // J. Biol. Inorg. Chem. – 2001. – № 6. – P. 100–106.
17. Trypsin from porcine pancreas. Proteomics grade, Bioreagent, Dimethylated. Technical bulletin [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/t6567bul.pdf> (дата обращения: 16.06.2015).
18. Vanadium induces oxidative stress in isolated rat liver mitochondria / M.-J. Hosseini, J. Pourahmad, F. Shaki, M. Ghazi-Khansari // Toxicology Letters. – 2012. – № 211. – 167 p.

References

1. Predel'no dopustimye koncentracii (PDK) zagryznajushchih veshchestv v atmosfernom vozduhe naselennykh mest GN 2.1.6.1338-03 [Maximum permissible concentration (MPC) of pollutants in the ambient air of the residential areas GN 2.1.6.1338-03]. Federal'nyj centr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2004, 143. (in Russian).
2. Zaitseva N.V., May I.V., Kleyn S.V. K voprosu ustanovlenija i dokazatel'stva vreda zdorov'ju naselenija pri vyjavlenii nepriemlegogo riska, obuslovlennogo faktorami sredy obitanija [On the determination and proof of damage to human health due to an unacceptable health risk caused by environmental factors]. *Analiz riska zdorov'ju*, 2013, no. 2, pp. 14–27. (in Russian).
3. Izmerenie massovoj koncentracii himicheskikh jelementov v biosubstratah (krov', mocha) metodom masspektrometrii s induktivno svjazannoj plazmoj: Metodicheskie ukazanija 4.1.3230-14 [Chemicals measurement in biosubstrates (blood, urine) by mass spectrometry with inductively coupled plasma: Guidelines 4.1.3230-14]. Moscow: Federal'nyj centr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2014. (in Russian).
4. Goufman E.I., Moshkovskij S.A., Tihonova O.V., Lohov I.G., Zgoda V.G., Serebrjakova M.V., Toropygin I.Ju., Vlasova M.A., Safarova M.R., Makarov O.V., Archakov A.I. Proteomnoe issledovanie termostabil'noj frakcii syvorotki pacientov s razlichnymi opuholjami s primeneniem dvumernogo jelektroforeza [Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor]. *Biohimija*, 2006, Vol. 71. no. 4, pp. 445-453. (in Russian).
5. Rukovodstvo po ocenke riska dlja zdorov'ja naselenija pri vozdejstvii himicheskikh veshchestv, zagryznajushchih okruzhajushhiju sredu R 2.1.10.1920-04 [Guide to health risk assessment when exposed to chemicals polluting the environment R 2.1.10.1920-04 P]. Moscow: Federal'nyj centr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2004, 143 p. (in Russian).
6. Rukovodstvo po kontrolju zagryznenija atmosfery RD 52.04.186-89 [Guidelines for air pollution control RD 52.04.186-89]. Available at: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/44/44486/ (10.11.2015). (in Russian).
7. Tits N.M. Klinicheskoe rukovodstvo po laboratornym testam [Clinical guidelines for laboratory tests]. Moscow: JuNIMED-press, 2003, 943 p. (in Russian).
8. Fletcher R., Fletcher S., Vagner Je. Klinicheskaja jepidemiologija [Clinical epidemiology]. *Osnovy dokazatel'noj mediciny*, Moscow: Media Sfera, 1998, 352 p. (in Russian).
9. Draft Toxicological Profile for Vanadium: U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, 2009, 206 p.
10. Dodeca Silver Stain Kit. Instruction Manual. Available at: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110150B.pdf> (16.06.2015).
11. Farzin Gharahdaghi, Catherine R. Weinberg, Denise A. Meagher, Brian S. Imai, Sheenah M. Mische. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, 1999, no. 20, pp. 601–605.
12. PROTEAN i12 IEF System. Instruction Manual. Available at: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10022069A.pdf> (16.07.2015).
13. PROTEAN II xi 2D cell. Instruction Manual. Available at: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1651801.pdf> (16.07.2015).
14. QuantiPro BCA assay kit. Technical bulletin. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/qpbcbul.pdf> (16.06.2015).
15. ReadyPrep 2-D starter kit. Instruction Manual. Available at: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110009A.pdf> (16.06.2015).
16. Stemmler A.J., Burrows C.J. Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium (IV) and vanadium (V) complexes. *J. Biol. Inorg. Chem*, 2001, no. 6, pp. 100–106.
17. Trypsin from porcine pancreas. Proteomics grade, Bioreagent, Dimethylated. Technical bulletin. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/t6567bul.pdf> (16.06.2015).
18. Hosseini M.-J., Pourahmad J., Shaki F., Ghazi-Khansari M. Vanadium induces oxidative stress in isolated rat liver mitochondria. *Toxicology Letters*, 2012, no. 211, 167 p.

ASSESSMENT OF VIOLATIONS OF THE PROTEOMIC PROFILE IN BLOOD PLASMA IN CHILDREN BEING UNDER INHALATION EXPOSURE TO FINE DUST CONTAINING VANADIUM

N.V. Zaitseva¹, M.A. Zemlyanova^{1,2}

¹ FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Russian Federation, Perm, 82 Monastyrskaya St., 614045

² FBSEI HPE “Perm State National Research University”, Russian Federation, Perm, 15 Bukireva St., 614990

The results of research and evaluation of the protein profile in blood plasma in children, that have been exposed to long-term effect of fine dust containing vanadium in the zone of influence of metallurgical production sources, are demonstrated. It was established that under conditions of poor air quality in the residential area due to vanadium pentoxide dust content at the level up to 1.2 mean daily MAC (34 RfC_{chr}), by the suspended solids – up to 0.6 mean daily MAC (1.2 RfC_{chr}), there is vanadium concentration in blood of the exposed 4–7 aged children, that exceeds up to 6 times the reference level. The technology of the proteomic analysis showed that children with high content of vanadium in blood have changes in proteomic profile in blood plasma in the type of increase of the relative volume of acid glycoprotein alpha-1; reduction of clusterin, apolipoprotein A-IV, alpha-2-HS-glycoprotein, that are associated with vanadium concentration in blood. In the absence of timely primary and secondary prevention and the preservation of vanadium sustained exposure the revealed cell-molecular abnormalities allow us to predict further development of functional disturbances on tissue and organ levels as the early development of osteoporosis and osteoarticular pathology, atherosclerotic vascular changes, autoimmune allergic processes on the background of disorders of immune regulation, oncology diseases.

Key words: proteomic profile, blood plasma, vanadium, molecular markers, inhalation exposure.

© Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., 2016

Zaitseva Nina Vladimirovna – fellow of RAS, Doctor of Medicine, Professor, director (e-mail: znv@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 237-25-34).

Zemlyanova Marina Aleksandrovna – Doctor of Medicine, Head of Department of Biochemical and Cytogenetic Diagnostics (e-mail: zem@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 236-39-30).