ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
МЕДИКО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
УПРАВЛЕНИЯ РИСКАМИ ЗДОРОВЬЮ НАСЕЛЕНИЯ

Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Монография

Пермь
2016

УДК 614.7; 575.22; 57.083
З17

Рецензенты:
профессор кафедры клинической фармакологии и иммунологии
Пермской государственной фармацевтической академии,
доктор медицинских наук *Т.А. Юшкова*;
профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности
Пермского государственного университета,
доктор медицинских наук *В.П. Рочев*

Зайцева, Н.В.
З17 Особенности иммунологических и генетических нарушений человека в условиях дестабилизации среды обитания : монография / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова. – Пермь : Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2016. – 300 с.

ISBN 978-5-91754-226-3

В основе монографии – технологии, методики и практические примеры идентификации иммунных и генетических маркеров иммунологического здоровья, модифицированного средовой гаптенной нагрузкой. Разработанные концепции, методы, алгоритмы идентификации и оценки маркеров эффекта и чувствительности позволили авторам монографии установить их персонифицированные комбинации при ранних нарушениях адаптационных процессов и иммунорегуляции для различных групп населения, их условий проживания и труда.

Монография предназначена для специалистов в области оценки риска здоровью, иммунологов, аллергологов, исследователей, занимающихся вопросами клеточных технологий, геномики, транскриптомики и экологии человека.

Авторы благодарят за оказанную помощь и предоставление материалов при формировании монографии канд. мед. наук Р.А. Предеину, канд. мед. наук А.В. Кривцова, Т.С. Лыхину, Е.А. Отавину, Н.А. Вдовину.

УДК 614.7; 575.22; 57.083

ISBN 978-5-91754-226-3

© Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г., 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6

1. ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ. ФАКТОРЫ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ И ЗДОРОВЬЕ НАСЕЛЕНИЯ 8

2. СРЕДА ОБИТАНИЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗДОРОВЬЕ 15

3. ИММУНОТОКСИКОЛОГИЯ ПРИОРИТЕТНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ-ИММУНОГЕНОВ 28

3.1. Иммунотоксикология отдельных гаптенов 30

3.2. Токсикология других токсикантов (краткая токсикологическая справка) 40

4. ИММУННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И ГАПТЕНЫ 49

4.1. Неспецифическая резистентность организма в условиях воздействия гаптенов (фагоцитоз) 49

4.2. Резистентность организма и специфические факторы иммунитета. Цитокины, их роль в иммунной регуляции 51

4.3. Факторы и механизмы сенсибилизации к гаптенам 61

4.3.1. Особенности сенсибилизации к низкомолекулярным соединениям 67

4.3.2. Участие иммунных механизмов в сенсибилизации к низкомолекулярным соединениям 69

4.3.3 Диагностика специфической сенсибилизации к низкомолекулярным химическим соединениям 73

4.3.4. Участие неиммунных механизмов в сенсибилизации к гаптенам 80

4.3.5. Аллергические реакции на гаптены, ассоциированные с метаболитами арахидоновой кислоты 83

4.3.6. Сравнительный анализ общей реагиновой и лейкотриеновой сенсибилизации 87

4.3.7. Особенности специфической реагиновой и лейкотриеновой сенсибилизации у детей к формальдегиду, марганцу, хрому 90

4.3.8. Индукция лейкотриеновой сенсибилизации *in vitro* 94

4.3.9. Характеристика специфического антителообразования к микро- и наноформам металлов (марганца и кремния) у детей 97
4.3.10. Метрологические подходы в диагностике маркеров эффекта.....105
4.4. Апоптоз и среда обитания.....108
4.4.1. Апоптоз и его роль в иммунном ответе 118
4.4.2. Особенности регуляции и формирования апоптоза в условиях средовой нагрузки 129
4.4.3. Особенности стронцийопосредованной регуляции апоптоза.....135
4.4.4. Экспериментальные модели нарушений апоптотической регуляции иммунного ответа в системе *in vitro* 143
5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ.....145
5.1. Полиморфизм генов и его верификация 147
5.2. Гены системы детоксикации ксенобиотиков 149
5.2.1. Гены 1-й фазы детоксикации 150
5.2.2. Гены 2-й фазы детоксикации 152
5.3. Гены иммунорегуляции.....156
5.4. Гены регуляции белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям 161
5.5. Соматические гены, участвующие в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях 162
5.6. Методы выявления генетического полиморфизма 166
5.7. ПЦР в реальном времени 169
5.8. Генетическое тестирование однонуклеотидных полиморфизмов с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....170
5.9. Кандидатные гены и их вариантные аллели в условиях различной факторной нагрузки.....177
5.9.1. Характер однонуклетидных полиморфизмов у работников металлургического производства, экспонированных тяжелыми металлами (ванадий, марганец).....184
5.9.2. SNP-особенности у работающих на химическом комбинате в условиях экспозиции ароматическими углеводородами.....185
5.9.3. Встречаемость вариантных аллелей генов у детей в условиях аэрогенной экспозиции фенолами 186
5.9.4. Вариантность аллелей генов у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции формальдегидом и бензолом 188

5.9.5. Однонуклеотидные замены у детей, проживающих в зоне влияния металлургического комбината 190
5.9.6. Аллели и генотипы детского населения, проживающего в зоне влияния крупного аэропорта 192
5.9.7. Ключевые однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), отражающие характер и особенности адаптации организма в условиях стронциевой геохимической провинции 193
5.9.8. Кандидатные гены нарушений иммунного ответа у детей, экспонированных хлороформом 196
5.10. Система ген-рецептор и особенности гендерных различий полиморфно измененных генов 200
5.11. Генетическая фиксациия в системе «мать–ребенок» 208

6. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА. ЕГО ОСОБЕННОСТИ И РЕЗУЛЬТАТЫ В УСЛОВИЯХ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ 214
6.1. Генетический полиморфизм и тандемные повторы в генах 214
6.2. Генетический полиморфизм и секвенирование на жидких биочипах 218

7. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И ГАПТЕННОЕ ОКРУЖЕНИЕ 231
7.1. Изучение и оценка экспрессии генов в условиях воздействии химических мутагенов 232
7.2. Технология идентификации индуцированной мутагенами генетической экспрессии 234

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 243

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 244

ТЕЗАУРУС 298

ВВЕДЕНИЕ

Концепция национальной стратегии устойчивого развития Российской Федерации (РФ) декларирует важнейшую составляющую прогресса – охрану и укрепление здоровья людей, снижение риска, связанного с вредным воздействием загрязнений окружающей среды. Сегодня характер и интенсивность воздействия неблагоприятных факторов среды на организм человека как на индивидуальном, так и на популяционном уровне становятся критическими [162, 180, 181, 250, 343]. Воздействие токсических химических веществ на человека существенно возросло в последнее время, когда были синтезированы миллионы соединений, около 70 000 из которых находят применение в производстве. Такая высокая химическая нагрузка не может не оказывать влияния на живой организм, в первую очередь на человека. Известно, что многие химические агенты обладают свойством биоаккумуляции, в результате чего в тканях организма человека обнаружено более 400 токсических веществ [199]. Урбанизированная среда обитания современного человека характеризуется наличием избыточных по количественным и качественным характеристикам неблагоприятных факторов, формирующих измененную генетику и серьезные риски здоровью экспонированного населения. Диагностика экологически обусловленных заболеваний требует внедрения в практику новейших методов исследований (определение биомаркеров эффекта). Одними из компонентов факторной нагрузки являются химические техногенные токсиканты, ставшие неотъемлемой частью экологической системы крупных промышленных городов. На присутствие токсикантов первыми реагируют наиболее чувствительные системы защиты, прежде всего, иммунная система человека. Иммунная система является основной защитной системой организма, которая контролирует поддержание гомеостаза внутренней среды и обеспечивает нормальное функционирование организма в целом.

В условиях хронического воздействия техногенных химических соединений возникает дисбаланс или нарушение адекватности адаптивного ответа, что может не сопровождаться проявлением первичных признаков клинической манифестации, но при соответствующей генетической детерминации формировать донозологические нарушения состоя-

ния организма [4, 95, 158, 160]. Адаптивный потенциал организма складывается из слаженности функционирования и особенностей генетической предрасположенности иммунного ответа на действие загрязнений среды обитания, которые в силу их в целом невысокой антигенной активности можно отнести к гаптенам, а также механизмов их детоксикации и оксигенации. Дезадаптация иммунной системы при воздействии гаптенов на организм человека ассоциирована с вариабельностью генетического полиморфизма. В целях создания платформы для персонифицированной медицины и решения задач ранней диагностики актуальным является изучение молекулярных, клеточных механизмов формирования аутоиммунных, аллергических, онкологических заболеваний с идентификацией особенностей отклонений генетических и иммунологических показателей в условиях гаптенной экспозиции [60, 154, 199, 266, 356, 392, 532, 574].

1. ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ. ФАКТОРЫ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ И ЗДОРОВЬЕ НАСЕЛЕНИЯ

По официальной статистике, только 15 % городского населения России проживает на территориях с загрязнением атмосферы, не превышающем гигиенических нормативов, в 84 городах и промышленных центрах регистрируются загрязнения выше 10 ПДК [7].

Динамика основных показателей рождаемости, смертности, продолжительности жизни в России за последние 5 лет свидетельствует об углублении демографического кризиса [149, 177, 373, 388]. Кроме того, на большей части территории России в последние годы зафиксировано ухудшение состояния здоровья населения и особенно наиболее чувствительной его части – детей [3, 44, 216, 223, 260].

На сегодня все больше исследований, в том числе проводимых по инициативе службы санитарного надзора, свидетельствуют о том, что здоровье населения, проживающего в относительно «чистых» регионах, лучше, чем в областях с интенсивно развитой промышленностью [18, 150, 211].

По материалам ВОЗ, здоровье населения в основном (на 50 %) определяется образом жизни, на 20 % – неблагоприятным воздействием среды обитания (в зонах экологического неблагополучия эта зависимость достигает 40 % [54, 225, 337, 380]), на 20 % – наследственностью и на 10 % – качеством медико-санитарной помощи [195]. Однако, по мнению ряда авторов, на сегодня в России техногенные факторы вышли на одно из первых мест среди факторов, формирующих здоровье (генетических, климатических, эндемических, эпидемиологических, профессиональных, социальных, биологических) [9, 109, 134, 146, 159, 277].

Изучению влияния экологических факторов на здоровье населения посвящены многочисленные исследования как отечественных, так и зарубежных авторов [2, 225]. В значительном количестве публикаций выделяется роль аэрогенных загрязнителей в формировании изменений общественного здоровья населения [318] и указывается, что

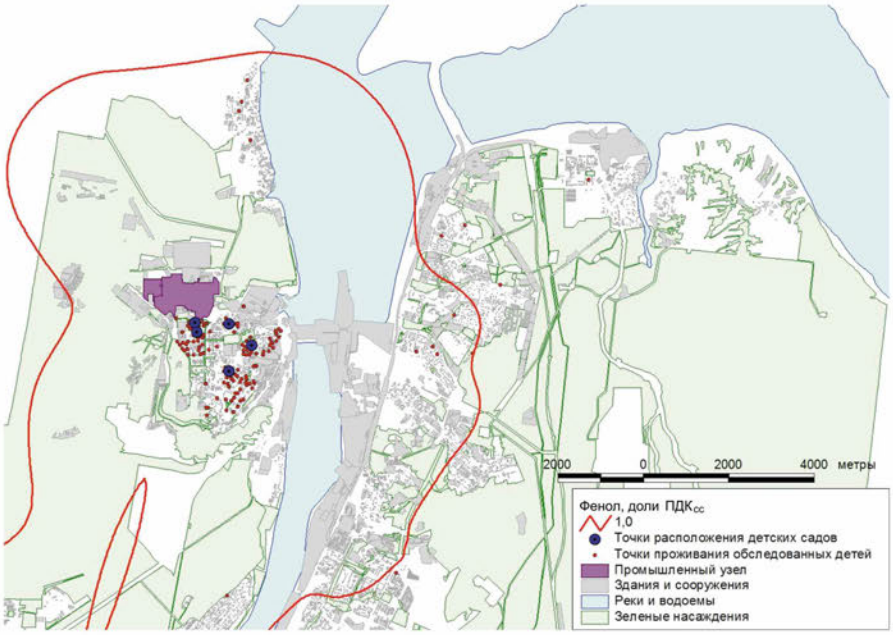
наибольшую опасность для здоровья людей представляет химическое загрязнение [1, 49–52, 360]. Согласно литературным данным, в России загрязнение воздушной среды является вредоносным фактором для 40 % населения, 50 % используют в пищевых целях воду, не соответствующую существующим гигиеническим требованиям, наконец, значительная часть населения проживает на территории, характеризующейся химическим загрязнением почвы [161, 254, 298, 335].

Эффект вредного воздействия атмосферных загрязнений зависит прежде всего от токсических свойств вещества и концентрации его в окружающей среде [92, 137, 280, 399]. Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют о связи уровней загрязнения окружающей среды и заболеваемости населения, прежде всего, проживающего на городских территориях [11, 70, 105, 165, 181, 240, 241, 244, 343].

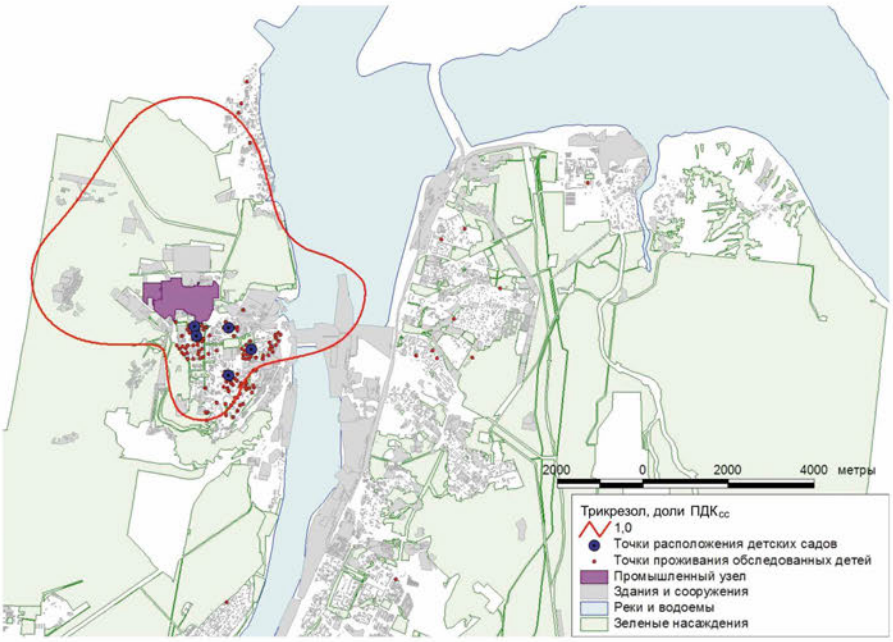
Преобладающее число исследований, посвященных изучению системы «среда – здоровье», связано с анализом воздействия атмосферных загрязнений на организм. Основными источниками токсикологически опасных атмосферных примесей являются: предприятия химии и нефтехимии [15, 155, 294, 376], металлургические заводы [274], целлюлозобумажные предприятия [114], предприятия энергетики [79, 284]. Нами проведены исследования на территории, где размещено крупное предприятие химической промышленности, формирующее аэрогенную экспозицию фенолом до 2,3 $ПДК_{сс}$ и трикрезолом на уровне до 4,0 $ПДК_{сс}$ и 7,4 $ПДК_{мр}$ (рис. 1), что влияет на уровень заболеваемости детского населения болезнями органов дыхания, в которых задействован иммунный механизм (рис. 2).

Проведенное углубленное клинико-функциональное обследование экспонированного детского населения позволило установить, что:

- патология органов дыхания у детей группы наблюдения встречалась в **2,4 раза чаще**, чем у детей группы сравнения (68,4 и 28,1 % соответственно);
- распространенность хронических болезней миндалин и аденоидов у детей группы наблюдения была в **2 раза выше**, чем у детей группы сравнения (21,7 и 10,6 % соответственно);
- хронические заболевания органов дыхания с аллергокомпонентом у детей группы наблюдения встречались в **2,7 раз чаще**, чем у детей группы сравнения (46,7 и 17,6 % соответственно).

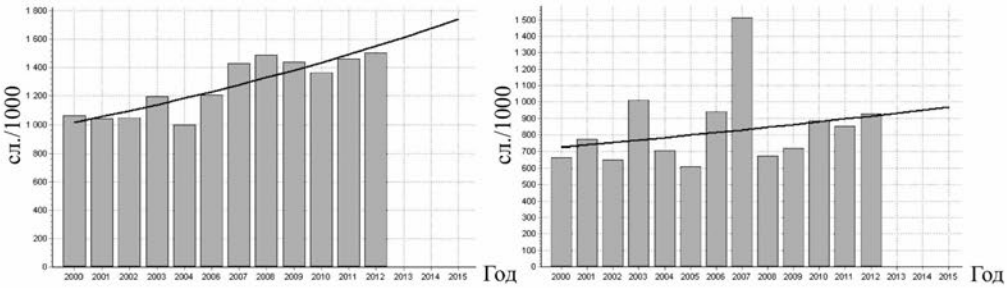


а



б

Рис. 1. Изолиния 1 ПДК$_{сс}$: *а* – трикрезола; *б* – фенола



а *б*

Рис. 2. Динамика заболеваемости детей болезнями органов дыхания (сл./1000 детей), проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия фенолов (*а*), а также в условиях относительного санитарно-гигиенического благополучия (*б*)

Анализ результатов исследований по оценке влияния антропогенных воздействий на здоровье свидетельствует о том, что наблюдается некоторая однотипность физиологических реакций на различные по химической структуре атмосферные загрязнители. Прежде всего, отмечается раздражающее действие на слизистые оболочки, что объясняется как их высокой чувствительностью, так и абсорбционной способностью. В связи с этим авторами отмечается тесная корреляция между концентрациями атмосферных загрязнений и распространенностью болезней органов дыхания [69], в первую очередь – бронхиальной астмы [23, 182, 220, 221].

Вместе с тем ряд авторов отмечает связь заболеваний нервной, эндокринной систем, кожи и подкожной клетчатки с различными загрязняющими веществами атмосферного воздуха [74, 91, 155, 239, 338].

В ряде работ показано воздействие химических загрязнений атмосферного воздуха, в первую очередь, на организм детей, что проявляется увеличением заболеваемости населения по целому ряду групп болезней и отдельным нозологиям [5, 65, 75, 86, 134, 144, 173, 210, 277, 340], а также ростом общей заболеваемости [210, 340].

Наряду с общими закономерностями воздействия неблагоприятных экологических факторов на организм человека существуют региональные особенности формирования изменений в состоянии здоровья населения в зависимости от комплекса воздействующих факторов [201].

Углубленные клинико-функциональные исследования показали, что истинная распространенность хронических воспалительных заболе-

ваний органов дыхания с аллергокомпонентом у детей, проживающих в условиях нефтехимического загрязнения среды обитания, в 3,5–4,0 раза выше официальных статистических данных. При этом заболеваемость детей бронхиальной астмой на территориях сосредоточения предприятий химической индустрии выросла в 1,5–2,5 раза (до 24,9 случая на 1000) и прогнозируется дальнейший ежегодный рост 2–5 %.

Исследования последнего десятилетия показали наличие четкой связи между уровнями загрязнения окружающей среды и состоянием здоровья населения [208], что подкрепляется выявленными количественными зависимостями между уровнями загрязнения окружающей среды и заболеваемостью населения [229], а также использованием методов математического моделирования и прогнозирования [183].

Результаты анализа причинно-следственных связей используются при организации мероприятий, направленных на улучшение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, на их основании органы управления осуществляют принятие управленческих решений. Проведенными нами исследованиями установлен ряд достоверных зависимостей состояния здоровья детского населения от уровня содержания фенолов в атмосферном воздухе (табл. 1).

Таблица 1

Причинно-следственные связи заболеваемости детей болезнями органов дыхания с повышенным содержанием фенолов в атмосферном воздухе

Вещество	Основные заболевания	*b0*	*b1*	*F*	*p*	R^2
Фенол	Болезни органов дыхания	0,145	135,72	85,70	0,0008	0,25
Трикрезол	Болезни органов дыхания	–4,860	1041,48	447,05	0,0005	0,92
Фенол	Аллергический ринит	–3,375	249,89	46,68	0,0005	0,17
Трикрезол	Аллергический ринит	–2,466	336,35	33,09	0,0007	0,13
Фенол	Астма с преобладанием аллергического компонента	–5,957	432,35	130,85	0,001	0,80
Трикрезол	Астма с преобладанием аллергического компонента	–4,350	651,29	273,17	0,0009	0,86
Трикрезол	Гипертрофия миндалин с гипертрофией аденоидов	–5,255	1346,280	1114,99	0,001	0,95
Фенол	Острый назофарингит (насморк)	–1,226	104,109	89,69	0,001	0,26
Фенол	Вазомоторный ринит	–7,170	478,87	165,58	0,001	0,64

В государственных докладах «О состоянии здоровья населения Российской Федерации» и «О состоянии окружающей природной среды Российской Федерации» первостепенное значение придается региональным подходам к решению проблем здоровья населения, связанным с воздействием факторов окружающей среды [1]. По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году», под воздействием вредных веществ, превышающих гигиенические нормативы ($ПДК_{сс}$) в 5 раз и более, в нашей стране в 2009–2014 гг. проживало до 2 млн человек. При этом загрязнение атмосферного воздуха регистрировалось на территориях 36 субъектов Российской Федерации [244]. Ведущими загрязнителями атмосферного воздуха в 2009–2014 гг. (превышающими ПДК в 5 раз и более) являлись формальдегид, 3,4-бенз(а)пирен, взвешенные вещества, этилбензол, азота диоксид, свинец и его неорганические соединения, меди (II) оксид, серы диоксид, ксилол, фенол, никеля оксид, углерода оксид, фтористые газообразные соединения, железа (II) оксид, сажа [240, 241, 338]. Так, в 2014 г. отмечены превышения максимальной разовой ПДК по веществам: взвешенные вещества (пыль) – 7 случаев до 1,6 ПДК; фторид водорода – 22 случая до 3,1 ПДК; диоксид азота – 50 случаев до 2,9 ПДК; оксид углерода – 4 случая до 2,2 ПДК; фенол – 25 случаев до 2,1 ПДК; формальдегид – 277 случаев до 6,2 ПДК; этилбензол – 40 случаев до 5 ПДК; хлорид водорода – 19 случаев до 3,6 ПДК; ксилолы – 7 случаев до 4,5 ПДК; сероводород – 6 случаев до 1,8 ПДК. При этом общее количество превышений ПДК за год – 457 случаев [333].

Водные объекты российских регионов испытывают высокие техногенные нагрузки, что приводит к ухудшению качества воды и, как следствие, к негативному влиянию на организм человека [91, 143, 334]. Концентрации наиболее распространенных загрязняющих веществ (нефтепродуктов, фенолов, соединений марганца, меди, железа, аммонийного азота, трудноокисляемых органических веществ) в поверхностных водах часто превышают допустимые нормы [334, 335]. Например, в Камском водохранилище в районе Соликамско-Березниковского промышленного узла в 2013 г. среднегодовые концентрации, превышающие ПДК, составили по содержанию соединений марганца – 10 ПДК, железа – 5 ПДК, фенолов – повысились с 1 до 2 ПДК, меди и нефтепродуктов – в пределах ПДК. Значение удельного комбинаторного индекса загрязненности воды при этом соответствовало 3-му классу качества разряда «*а*» – вода «загрязненная» [334].

Основными источниками загрязнения поверхностных вод являются предприятия химической, металлургической, машиностроительной и нефтеперерабатывающей промышленности. Потенциальными источниками загрязнения водоемов также являются полигоны твердых бытовых и промышленных отходов, животноводческие комплексы, площадки промышленных предприятий, территории населенных пунктов, оказывающих влияние на качество воды открытых водоемов [334, 335].

Тотальное загрязнение водных объектов и атмосферного воздуха привело к возрастанию в последние годы объема исследований в области минимизации воздействия факторов окружающей среды на здоровье населения, в том числе с использованием медико-экологической реабилитации, в основе которой лежат диагностические мероприятия с идентификацией маркеров экспозиции и эффекта [81, 153, 159, 161].

Ряд авторов отмечает, что биологический функциональный мониторинг и выявление детей с повышенной чувствительностью к химическим агентам представляется более важным, чем расширение программ экологического мониторинга по определению концентраций различных химических агентов [37].

Целый ряд научных, в том числе экспериментальных, исследований посвящен изучению вопросов накопления различных ксенобиотиков в различных биологических средах организма [133, 146, 184, 262]. Установлено, что накопление химических веществ в биосубстратах наступает ранее биохимических и клинических проявлений. Определение содержания ксенобиотиков в различных биологических средах организма рекомендуется использовать для оценки величины реальной химической нагрузки, а кинетика элиминации метаболитов и константы их связывания рекомендуются как критериально значимые тесты на уровне предпатологии. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует по критериям качества окружающей среды в связи с воздействием на организм человека наиболее токсичных веществ проводить биомониторинг с определением их содержания в биосредах [346, 348].

2. СРЕДА ОБИТАНИЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗДОРОВЬЕ

Загрязнение окружающей среды химическими веществами малой интенсивности обусловливает ряд сопряженных сдвигов в иммунной системе [24, 34, 250]. Это связано с тем, что иммунная система обладает высокой чувствительностью ко многим неблагоприятным факторам окружающей среды [34, 56, 69, 139, 165]. Иммунная система представляет собой исключительно сложную многокомпонентную сеть из быстроделящихся, репопулирующих и покоящихся клеток [152, 154, 532]. Организации с быстрым обновлением элементов более подвержены воздействию разнообразных антропогенных факторов [77, 87, 100]. В связи с этим любое токсическое влияние химического вещества может привести к модификации иммунного ответа, а кумуляция изменений отдельных компартментов иммунной защиты может реализоваться нарушениями структурной целостности и функциональной полноценности иммунной системы в целом [152].

В настоящее время принято считать, что изменение состояния здоровья является отражением сдвигов в механизмах адаптации организма к условиям внешней среды [257] (рис. 3). При этом важно подчеркнуть, что теоретической основой для изучения закономерностей адаптации организма человека к изменяющимся экологическим условиям является принцип единства организма и среды.

К числу важнейших направлений в исследовании адаптационных процессов к воздействию негативных антропогенных факторов относят изучение состояния иммунофизиологических и генетических механизмов защиты организма человека (см. рис. 3).

Иммунная система наряду с другими важнейшими регуляторными системами (нервной, эндокринной) реализует механизмы адаптации, компенсации и декомпенсации в современных условиях множественного химического загрязнения окружающей среды как факторов хронического стресса [69, 205] (рис. 4).

С позиции специфичности можно рассматривать характер иммунного ответа на ксенобиотики, реализумый последовательно в форме активации имунорегуляции (адаптация), функционально-количественного

дисбаланса основных звеньев иммунитета (компенсация, декомпенсация), как проявления вторичного иммунодефицита различной степени выраженности [53, 156, 375].

Рис. 3. Адаптивные реакции иммунного и генетического гомеостаза, экспонированного гаптенами

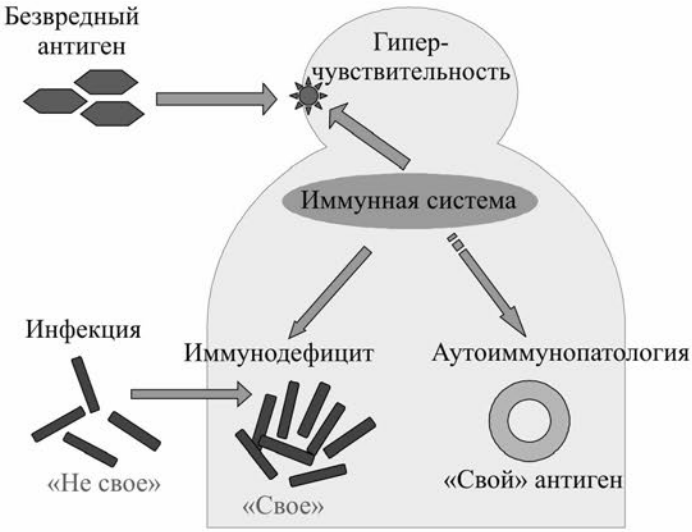
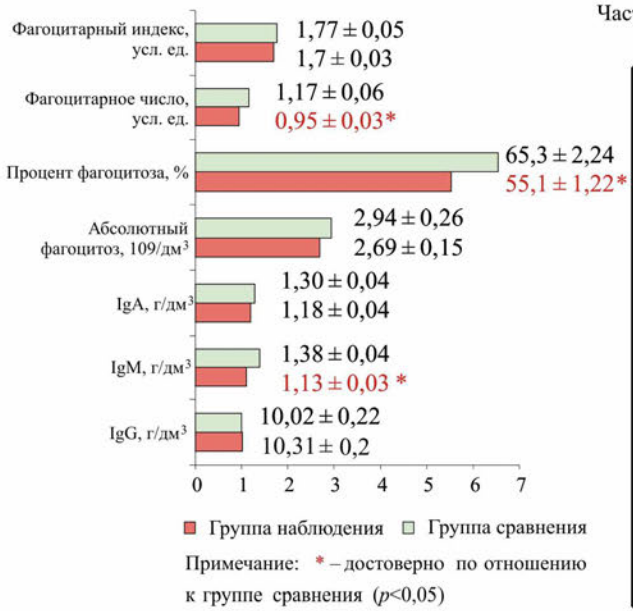


Рис. 4. Нарушения адаптивных реакций иммунного гомеостаза в условиях экспозиции гаптенами

Установлено, что у обследованных к 5-летнему возрасту формируется экологическая иммуносупрессия: снижается численность Т-лимфоцитов, возрастает количество В-клеток, уменьшается концентрация иммуноглобулинов класса G, вместе с тем отмечается стимуляция активности фагоцитоза. Возрастная динамика показателей выявила

к 9-летнему возрасту смену повышения активности фагоцитоза на ее угнетение [372].

Проведенная нами оценка иммунного статуса детей в условиях экспозиции трикрезолами позволила установить достоверное снижение показателей врожденного и прибретенного иммунитета (рис. 5).



Частота регистрации проб с показателями ниже физиологической нормы, %

Показатель	Группа наблюдения, $n = 265$	Группа сравнения, $n = 74$
Фагоцитарный индекс, усл. ед.	17,8	5,4
Фагоцитарное число, усл. ед.	27,7	8,1
Доля фагоцитоза, %	1,1	0,0
Абсолютный фагоцитоз, 10^9/дм^3	0,8	0,0
IgA, г/дм^3	53,4	0,0
IgM, г/дм^3	80,7	8,3
IgG, г/дм^3	32,2	10,4

Рис. 5. Состояние врожденного иммунитета по критериям фагоцитарной активности нейтрофилов и основных классов иммуноглобулинов у детей в условиях экспозиции трикрезолами

Направленность и глубина изменений иммунной системы в значительной степени определяются структурой и условиями воздействия химических факторов и, в первую очередь, их интенсивностью и комплексностью. Сложные процессы антигенной конкуренции и статус поливалентной сенсибилизации истощают защитные иммунные резервы организма, следствием чего являются частые инфекционно-вирусные воспаления в процессе формирования бронхолегочной патологии.

В условиях высокой загрязненности атмосферного воздуха экологически обусловленные изменения здоровья чаще всего реализуются в виде вторичных иммунодефицитных состояний, которые в свою очередь способствуют распространенности сенсибилизации [20, 391].

Токсические реакции со стороны иммунной системы в первую очередь зависят от количества или дозы химического вещества, а также от

биологической активности и физико-химических свойств антропогенов [71, 199] (рис. 6). Ксенобиотики как факторы химической или биологической природы чрезвычайно разнообразны по своей химической природе. С развитием техногенной цивилизации число химических веществ, токсичных для иммунной системы и организма в целом, растет в геометрической прогрессии [199]. Кроме того, немаловажное значение уделяется изучению влияния ионов металлов на развитие иммунных нарушений [288, 342]. Известно, что металлы сами по себе не являются антигенами, но способны выступать в роли гаптенов, т.е. индуцировать иммунный ответ, будучи в модифицированном состоянии (соединении с белками, пептидами, аминокислотами, нуклеиновыми кислотами или синтетическими полимерами) [192].

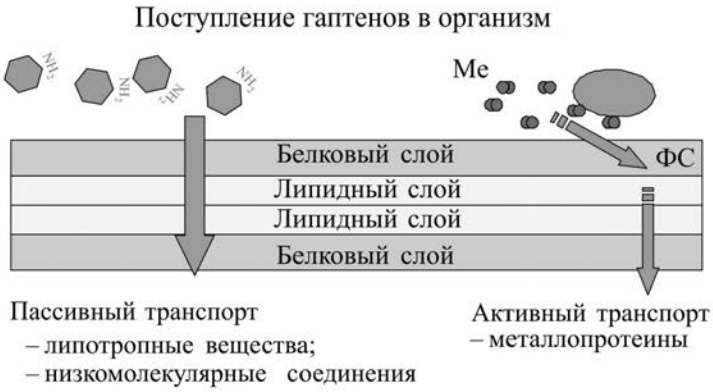


Рис. 6. Особенности поступления и транспортировки гаптенов через биологическую мембрану в зависимости от их химической структуры

Для изучения состояния иммунитета как интегрированного показателя, отражающего состояние экологических и медико-биологических процессов, очень важным является выбор параметров (тестов), а также лежащих в их основе биотехнологий, характеризующих взаимосвязь «окружающая среда – здоровье населения» [37, 139, 343, 348].

Привлекаемые биотехнологии, отражающие характер взаимодействия в системе «среда – здоровье»:

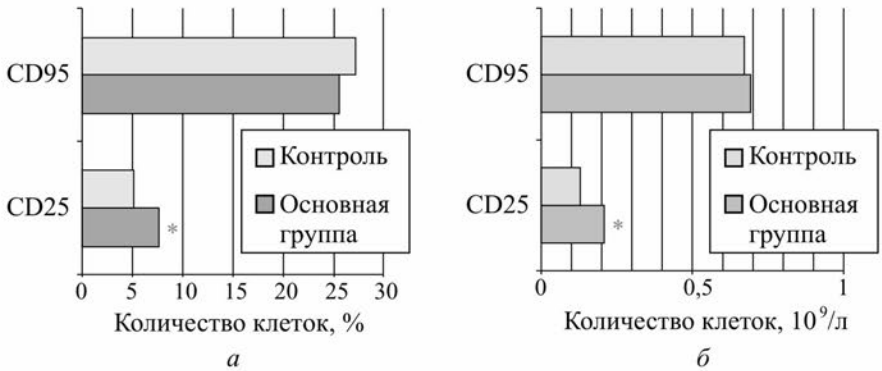
- генетические – ДНК-диагностика вирусных антигенов и генного полиморфизма (ПЦР в режиме реального времени; секвенирование участков генома; оценка экспрессии генов);
- клеточное фенотипирование проточной цитометрией;

♦ специфическая аллергодиагностика – определение специфических IgE и IgG к бытовым, пищевым, инфекционным и профессиональным аллергенам (биоконструктор);

♦ типирование медиаторов иммунонейроэндокринной регуляции (IL-1-бета, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, ИНФ-гамма, альфа-ФНО, p53, bcl2, Treg, АКТГ, серотонин, лейкотриены, фетальные белки и др.) – ИФА с предварительным экстрагированием;

♦ экспериментальные исследования *in vitro* на клеточных культурах с оценкой экспрессии мембранных, транскрипционных факторов, цитокинов и генов.

Перспективным является изучение роли фагоцитирующих клеток периферической крови [72], уровня и соотношений маркеров клеточной дифференцировки, факторов межклеточной регуляции и показателей запрограммированной гибели клеток в обеспечении адаптационных возможностей иммунологического гомеостаза в изменяющихся условиях окружающей среды [56]. Так, в условиях экспозиции ванадием и марганцем у детей наблюдалась повышенная активность IL-2-опосредованных реакций, что фенотипически выражалось в достоверно завышенной экспрессии CD25+-лимфоцитов по отношению к контрольной группе детей (рис. 7).



Примечание: * – $p<0,05$ в сопоставлении с контролем

Рис. 7. Экспрессия CD25+ и CD95+-лимфоцитов в условиях экспозиции металлами (*а* – относительное число клеток; *б* – абсолютное число клеток)

Избыточная гаптенная активация формирует стрессовое состояние иммунорегуляции, что может привести в дальнейшем как к инверсии иммунного ответа, так и к истощению прежде всего адекватного клеточного иммунного ответа. В современных условиях экологического

химического прессинга важное значение приобретает индивидуальная чувствительность организма к химическим воздействиям на генетическом уровне, определяющая направленность иммунного ответа через Th1- и (или) Th2-лимфоциты с включением положительных обратных связей межклеточных взаимодействий, реализуемых системой цитокинов [119]. Установлено, что для различных условий экотоксикантной нагрузки характерны определенные и весьма специфичные иммунные профили [65, 69, 71]. Последние можно рассматривать как критерии риска развития экообусловленной заболеваемости с обоснованием тактики иммунопрофилактики [65, 238]. Одним из основных направлений в области экологической иммунологии являются исследования иммунной системы людей, прежде всего детей, проживающих в экологически неблагополучных регионах [356, 357]. По данным ВОЗ, вклад факторов окружающей среды и, особенно, загрязнения атмосферного воздуха составляет 33 % всех болезней детей в возрасте до 5 лет [9]. По мнению ряда авторов, для детей младшего возраста, проживающих в экологически неблагополучных регионах, характерно: снижение числа Т-лимфоцитов, умеренное повышение количества В- и О-клеток; а у детей старшего возраста – снижение В- и Т-лимфоцитов, повышение О-клеток, умеренное повышение IgA и IgM при резком повышении IgG [73, 77, 264, 277, 278, 340, 361]. Рядом исследователей выявлено, что у 98,8 % часто болеющих детей вторичный иммунодефицит обусловлен угнетением Т-системы иммунитета, гипогамма-глобулинемией А, снижением активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов [156, 375]. Ряд авторов отмечает у часто болеющих детей, проживающих в экологически неблагополучной обстановке выбросов химического комбината, абсолютный и относительный лимфоцитоз и эозинофилию без статистически достоверных изменений В- и Т-лимфоцитов и дисбаланс иммуноглобулинов – повышение IgM при снижении IgA [34].

Актуальным направлением в настоящее время является идентификация различных биомаркеров ответа на воздействие факторов окружающей среды на организм [218, 305]. При этом ученые отмечают сложность диагностики экологически обусловленных заболеваний, что связано с затратностью методов диагностики состояния окружающей среды, отсроченностью ответа организма на эффект воздействия, длительным скрытым периодом и многообразием воздействующих факторов окружающей среды [272]. Сложный характер изменения иммуноло-

гических показателей ставит вопрос о выборе наиболее информативных из них при постановке и решении задач изучения влияния окружающей среды на иммунологическое и генетическое здоровье человека [65, 139, 198, 200, 291, 303, 358].

Задачи, решаемые идентификацией иммунологических маркеров эффекта и чувствительности при оценке вреда здоровью экспонированных групп населения:

- определение ранних нарушений в состоянии здоровья экспонированных групп и генетической предрасположенности к их развитию;
- оценка специфической сенсибилизации к профессиональным аллергенам, в том числе к их наноформам (марганец);
- оценка адекватности процесса запрограммированной клеточной гибели (от иммуносупрессии до канцерогенеза и аутоагрессии);
- изучение и оценка репродуктивных нарушений с использованием патогенетических маркеров женского и мужского здоровья;
- оценка комбинированного эффекта химической и вирусной контаминации;
- оценка влияния экспозиции на формирование поствакцинального иммунитета;
- изучение влияние пищевого фактора (нутриенты, пищевые добавки и ГМО) на здоровье с позиций геномики и эпигеномики;
- анализ ассоциаций аллелей генов в системах «гены родителей – гены ребенка» и «ген – рецептор – лиганд»;
- идентификация ключевых однонуклеотидных полиморфизмов с проведением индивидуальной и популяционной генодиагностики для установления риска развития конкретной патологии или наличия уникальных способностей;
- подбор и секвенирование «виновных» экзонов генома человека, анализ транскриптома (экспрессии генов).

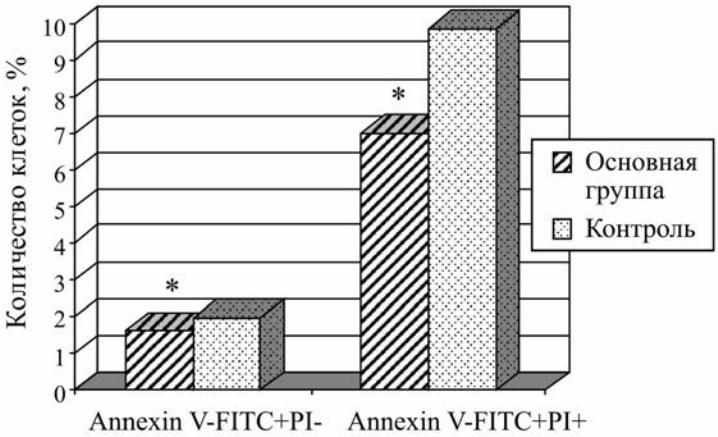
При решении данных задач необходимо выявить в популяции те группы, которые имеют повышенный риск срыва работы иммунной системы и возникновения синдрома иммунологической недостаточности [1, 219, 305, 318, 322, 358]. Для обеспечения решения поставленных задач по идентификации иммунных, генетических нарушений, опосредованных особенностями среды обитания, алгоритм исследования должен быть достаточным как с точки зрения методологической, так и приборной базы (рис. 8).

Рис. 8. Обеспеченность критических технологий приборной базой

Организация и проведение фундаментальных исследований в области изучения ответов организма на гаптенную экспозицию включает следующие современные подходы:

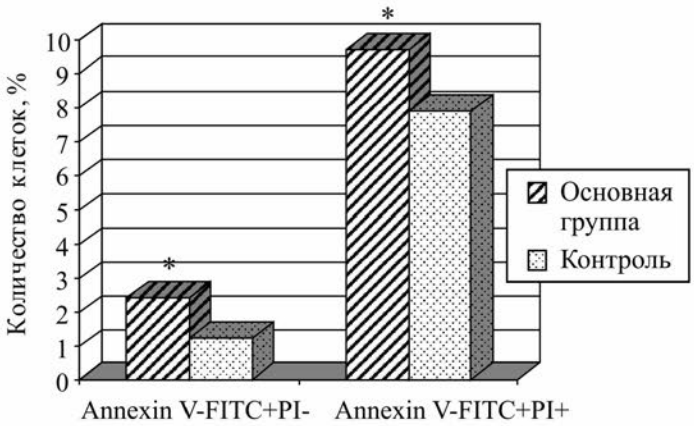
- геномика (анализ аллельных вариантов генов – сиквенс, ПЦР), секвенирование адресных экзонов и ампликонов генома человека;
- эпигеномика (анализ спонтанной и индуцированной специфической экспрессии генов);
- биоконструирование;
- митогенная индукция;
- оценка спонтанного и индуцированного апоптоза на культурах иммуноцитов (*ex vivo*).

В развитии вариабельного иммунодефицита (ВИД) в условиях измененной среды ведущую роль играет дисбаланс в процессах программированной клеточной смерти, который может быть вызван действием поступающих извне сигналов [53, 227, 326, 375]. Этот тип гибели иногда обозначают как самоубийство клетки или процесс апоптоза. Многие исследователи относят изучение влияния факторов среды на события апоптоза к числу определяющих в реализации взаимодействия в системе «факторы окружающей среды – иммунитет». При этом органические соединения и тяжелые металлы имеют зачастую разнонаправленный характер действия на процесс вступления клеток в стадию апоптоза, как активируя, так и подавляя данную реакцию (рис. 9, 10).



Примечание: * – $p<0,05$ в сопоставлении с контролем

Рис. 9. Показатели клеточной гибели у детей, экспонированных хлороформом



Примечание: * – $p<0,05$ в сопоставлении с контролем

Рис. 10. Апоптоз иммуноцитов в условиях экспозиции ванадием и марганцем

Рассматривая возрастные изменения иммунокомпетентных показателей в условиях неблагоприятной экологической среды, ряд авторов сообщают, что с возрастом число лиц с отклонениями от нормы увеличивается [56, 372] (рис. 11).

Имеется определенная возрастная зависимость иммунокомпетентных факторов от экологической ситуации: с возрастом в неблагоприятных экологических условиях происходит усиление аллергизации организма и синтеза IgE [13, 179, 180].

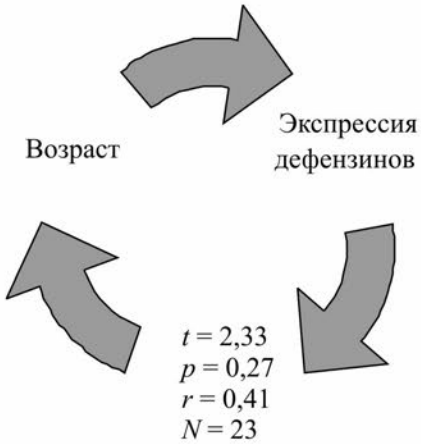


Рис. 11. Возрастание экспрессии регуляторного гена дефензина с возрастом (собственные исследования)

Высокая техногенная нагрузка создает экстремальные условия для развивающегося организма ребенка, приводя к истощению защитно-приспособительных механизмов и росту детской заболеваемости, в том числе болезней аллергической природы [2, 13, 65, 73, 77, 151, 204, 382].

По данным ВОЗ, заболеваемость бронхиальной астмой, хотя это и не самое распространенное аллергическое заболевание, превышает в развитых странах заболеваемость такими инфекциями, как туберкулез и ревматизм [23].

Значительный и всевозрастающий удельный вес аллергопатологии в структуре заболеваемости и ухудшение экологической ситуации дают основание рассматривать проблемы экологической аллергологии с точки зрения сенсибилизирующего действия низкомолекулярных соединений [106, 382].

Авторами отмечается тесная корреляция между концентрациями атмосферных загрязнений и распространенностью аллергических заболеваний [21, 90, 391, 411, 520, 565, 577]. Так, по данным ВОЗ, в настоящее время наблюдается как абсолютный рост числа аллергических заболеваний, так и увеличение их доли в структуре общей заболеваемости. Многие промышленные загрязняющие вещества по своей природе обладают сенсибилизирующим действием и после адсорбции на белковом носителе могут приобретать свойства полноценных аллергенов [258]. Кроме того, по данным А.С. Цыбиной и соавт. [258], под действием техногенного загрязнения атмосферного воздуха может изменяться

структура и повышаться иммуногенность пыльцы и других «натуральных аллергенов». V. Morgenstern et al. [411] отмечают связь между экспозицией диоксидом азота (NO_2) и развитием экземы у детей. Исследования показывают, что распространенность аллергических заболеваний (проявлений сенсибилизации, поллинозов, респираторных аллергозов) в более загрязненных районах может превышать таковую в относительно «чистых» в несколько раз [57, 69, 382, 411, 436]. Особое внимание авторами уделяется изучению влияния химических соединений на развитие бронхиальной астмы (БА) [134, 158, 182, 221, 344, 421, 430, 432, 473]. Распространенность БА в среднем составляет 10–15 % среди детского и 8–10 % среди взрослого населения разных стран.

Работы многих авторов посвящены изучению канцерогенных свойств химических факторов [167, 191, 235, 365, 571]. Так, в работе S.M. Snedeker [571] установлено влияние металлов, органических растворителей, пестицидов и др. на развитие рака молочной железы у женщин. Показано влияние металлов на развитие злокачественных новообразований кожи, лимфатической и кроветворной систем, предстательной железы и легких [189, 342].

В многочисленных исследованиях установлено влияние химического состава питьевой воды на состояние здоровья и заболеваемость населения [161, 207, 273, 285, 289, 347, 555, 593]. Результаты исследований состояния здоровья детей, проживающих в условиях загрязнения питьевой воды продуктами гиперхлорирования (хлороформ, тетрахлорметан, дихлорэтан, дихлорбромметан, дибромхлорметан) и атмосферного воздуха пылью, сероводородом и формальдегидом, свидетельствуют, что обращаемость детского населения за медицинской помощью по поводу заболеваний желудочно-кишечного тракта в 4,6 раза выше, иммунодефицитов – выше в 4,0 раза, болезней глаз – в 8,6 раза, расстройств вегетативной нервной системы – в 7,2 раза, чем у детей, использующих воду хозяйственно-бытового назначения, соответствующую СанПиН «Санитарно-эпидемиологический надзор за системами горячего водоснабжения», который вошел в новый СанПиН 2.1.4.2496–09 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения» [76, 347].

Анализируя причины роста числа больных аллергозами, нельзя не думать о роли повышенной чувствительности (предрасположенности) организма современного человека к действию аллергенов [10, 442]. Дей-

ствительно, если учащение микробной сенсибилизации можно в известной степени объяснить развитием в условиях современной эффективной профилактики и антибактериальной терапии абортивных инфекционно-аллергических процессов, а рост числа больных с аллергозами пищевого генеза – повышением проницаемости желудочно-кишечного барьера в результате характерных для нашего времени обменных нарушений и расстройств пищеварения, то чем же еще можно объяснить рост аллергических заболеваний от воздействия природных аэроаллергенов, например, пыльцовых и пылевых. Неблагоприятное влияние химических аллергенов не ограничивается опасностью развития аллергических заболеваний (дерматит, экзема, крапивница, токсидермия, фарингит, ринит, конъюнктивит, бронхиальная астма), но чревато также развитием состояния скрытой (бессимптомной) сенсибилизации, способствующей повышению чувствительности организма к действию других аллергенов (пыльцовых, пылевых, пищевых, микробных и т.д.). Действительно, сенсибилизированный природным аллергеном организм становится более восприимчив к действию малых доз даже слабого химического аллергена [10].

Из промышленных аллергенов существенную роль в возникновении сенсибилизации играют углеводороды, формальдегид, тяжелые металлы. В литературе существуют разрозненные данные, касающиеся особенностей клинических проявлений и изменений клинико-лабораторных тестов при воздействии экологических факторов, в частности, некоторых химических, на организм человека [76, 89, 103, 269, 365].

Одним из важнейших положений в ходе исследований влияния экологического окружения на состояние иммунитета является сравнение идентифицируемых отклонений с показателями контрольной группы и нормой [372] (табл. 2).

Развитие концепции нормы с учетом понятия региональных норм и фоновых уровней в условиях изменяющейся экологической обстановки и разработка показателей здоровья являются насущной и перспективной задачей экологической иммунологии [230, 305, 372].

Нами проведены исследования по изучению ряда показателей, для которых нет признанных нормативных величин.

Это, прежде всего, показатели, индикация которых происходит методом проточной цитометрии. В качестве примера приведены значения иммунологических показателей детей в возрасте 3–7 лет, не страдающих острыми и хроническими заболеваниями и проживающих в экологически чистом регионе Пермского края.

Таблица 2

Нормальные величины показателей иммунологического гомеостаза детей 3–7 лет

Показатель, единицы измерения	Норма
$CD95^+$, 10^9/дм^3	0,56 ± 0,20
$CD95^+$, %	16,71 ± 4,29
p53, %	1,41 ± 0,75
$CD4^+CD25^+$ $CD127^-$, %	1,43 ± 0,16
$CD4^+CD25^+$ $CD127^-$, 10^9/дм^3	0,042 ± 0,005
TNFRI, %	0,87 ± 0,28
bcl-2, %	0,72 ± 0,42
bax, %	9,94 ± 5,98
IL-17, пг/см^3	1,19 ± 0,05
TNF-α, пг/см^3	2,04 ± 1,20
VEGF, пг/см^3	335,23 ± 26,02
PGF2, пг/см^3	21,60 ± 1,96
Ampli-sRANKL, пг/см^3	15,037 ± 5,19
AnnexinV-FITC$^+$7AAD$^-$, %	2,11 ± 0,51
AnnexinV-FITC$^+$7AAD$^+$, %	6,96 ± 0,37

Таким образом, все исследователи сходятся во мнении, что результатом изменений функционального состояния иммунной системы в условиях воздействия низкомолекулярных соединений антропогенного характера является состояние вторичного иммунодефицита [53, 174]. В то же время распространенность вторичных иммунодефицитных состояний будет причиной формирования повышенной чувствительности иммунной системы к низкомолекулярным антропогенным факторам, что проявляется состоянием сенсибилизации к токсикантам-аллергенам [106, 174, 518]. Четкой закономерности в характере адаптационных процессов и их динамике не прослеживается, что обусловлено комбинированным многокомпонентным воздействием антропогенных факторов, разной степенью его интенсивности, пластичностью компенсаторных возможностей растущего организма и особенностями параметрической популяционной оценки разнонаправлено меняющихся показателей иммунного статуса. Тем не менее в силу своей высокой чувствительности иммунная система и ее гентическая база служат отражением воздействия на организм различных антропогенных факторов, являются чувствительной индикаторной системой наличия в регионе экологически неблагоприятной ситуации.

3. ИММУНОТОКСИКОЛОГИЯ ПРИОРИТЕТНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ-ИММУНОГЕНОВ

Условно иммунотропные химические соединения можно разбить на следующие группы:

– продукты полного и частичного сгорания (полициклические ароматические углеводороды, в том числе бенз(а)пирены);

– продукты химической промышленности: бензол, фенолы, формальдегид, анилин;

– продукты бытовой и сельскохозяйственной химии (пестициды, лекарства, пищевые добавки, моющие средства);

– металлы (свинец, марганец, никель, хром, ртуть, кобальт, молибден); неорганическая пыль (сварочный аэрозоль, двуокись кварца);

– биологические поллютанты (аллергены растительные пыльцевые, вирусы, грибы, бактерии).

Различные химические вещества запускают разнообразные механизмы поражения иммунной системы: например, бензол, озон, тяжелые металлы – иммунносупрессию из-за повреждения ДНК; токсические радикалы азота, окиси серы, асбест – недостаточность местного иммунитета, фагоцитоза; тиоловые яды, ртуть, метан – изменение генотипа лимфоцитов, CD-рецепторов [27, 32, 89, 142, 146].

Обезвреживание жидких токсических веществ, а также растворимых паров и газов в органах дыхания осуществляется на обонятельном, бронхиолярном и альвеолярном уровнях. Высокой ферментативной активностью в 77 процессах обезвреживания обладает апикальная часть обонятельного эпителия и клетки узелков Боумана. В респираторном тракте биотрансформация осуществляется эпителиальными клетками Кларка, количество которых возрастает в терминальных бронхиолах. В альвеолах в процессах обезвреживания задействованы альвеолярные макрофаги, лейкоциты и пневмоциты второго типа. В самом общем виде систему обезвреживания химических веществ в организме можно представить как состоящую условно из трех звеньев: биотрансформации, конъюгации и антиоксидантной защиты. Задача первой фазы обезвреживания – биотрансформации – заключается в повышении растворимости поглощенных молекул, что облегчает их выведение из орга-

низма. Главная роль в реакциях первой фазы принадлежит ферментам монооксигеназам, основным компонентом которых является цитохром Р-450. При этом происходит образование не только нетоксичных, но и токсичных метаболитов, в том числе активных форм кислорода (АФК). Во второй фазе детоксикации как нетоксичные, так и токсичные метаболиты в результате ферментативной реакции конъюгации присоединяют глюкуроновую кислоту или другие акцепторы. Образующиеся растворимые соединения выводятся из организма. Однако токсичные метаболиты успевают частично взаимодействовать и с другими эндогенными макромолекулами – с ДНК, оказывая на них канцерогенное влияние, с белками, выступая в роли гаптенов и придавая им свойства химических аллергенов техногенной природы. Третье звено системы обезвреживания ксенобиотиков включает в себя ферментативные и неферментативные средства защиты от токсического действия АФК, возникающих как на первых этапах обезвреживания, так и образующихся под влиянием веществ, обладающих прооксидантными свойствами, – озона, оксидов азота и других. Выход высокотоксичных АФК при этом может быть столь значительным, что именно ими определяются пагубные последствия и клинические проявления воздействия исходного ксенобиотика.

Цитотоксическое действие самых разных токсикантов (цианидов, четыреххлористого углерода, свинца, метилртути, хлордекона, оловоорганических соединений, алкилирующих агентов, диоксина и т.д.) связано с повышением уровня кальция внутри клеток. Цитотоксический эффект в результате стойкого повышения содержания кальция в цитоплазме ведет к повреждению целостности цитоскелета и неконтролируемой активации катаболических энзимов, таких как фосфолипаза. Стимуляция фосфолипазы кальцием приводит к усилению разрушения фосфолипидов мембран и повреждению клеток. В основе цитотоксического действия ксенобиотиков лежит повреждение субклеточных систем: энергетического обмена и стабильности клеточных мембран; гомеостаза внутриклеточных микро- и макроэлементов; свободнорадикальных процессов и антиоксидантной защиты; пластического обмена. Цитотоксический эффект в результате стойкого повышения содержания кальция в цитоплазме в настоящее время связывают с развивающимся при этом повреждением целостности цитоскелета и неконтролируемой активацией катаболических энзимов, таких как фосфолипаза. Фосфолипазы А2 являются Ca_2+- и кальмодулинзависимыми энзимами, и, следовательно, чувствительными к повышению кальция в цитоплазме. Стимуляция

фосфолипазы кальцием приводит к усилению разрушения фосфолипидов мембран и повреждению клеток. Ксенобиотики могут трансформироваться в радикалы как энзиматическим, так и неэнзиматическим путем. Происходит самоокисление ксенобиотиков и параллельно осуществляется продукция АФК – высокореакционных кислородных соединений, образующихся в результате неполного восстановления молекулярного кислорода или спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях. Появление неспаренного электрона на внешней орбитали делает метаболит чрезвычайно реакционноспособным. Активные радикалы вступают внутри клетки в многочисленные реакции, в том числе связываются с ненасыщенными жирными кислотами [331]. Супероксидный анион-радикал (O_2-) вызывает окислительное поражение мембранных структур клеток и одновременно проявляет бактерицидное действие, участвует в биосинтезе простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов [332]. В условиях гипоксии при восстановлении кровообращения происходит повышение уровня молекулярного кислорода и кальция, что ускоряет образование свободных кислородных радикалов. Данные изменения приводят к образованию перекисей липидов, которые увеличивают проницаемость мембран для кальция и активируют фосфолипазу А2. В свою очередь эти реакции запускают дальнейшую экспрессию iNOS, адгезивных молекул и выделение фактора, который активирует тромбоциты, лейкотриены, тромбоксан А2 и другие индукторы воспаления [314].

3.1. Иммунотоксикология отдельных гаптенов

Формальдегид

По химическим свойствам формальдегид принадлежит к числу наиболее реакционноспособных органических соединений, отличаясь как по своей химической активности, так и во многих иных отношениях от других соединений, содержащих карбонильную группу. Эти различия объясняются особенностью его химической структуры – в формальдегиде карбонильная группа связана с двумя водородными атомами. Вследствие этого характерные свойства карбонильной группы в формальдегиде не подвергаются изменениям, вызываемым присутствием других радикалов [63].

Формальдегид (муравьиный альдегид, метаналь) – первый член ряда альдегидов. В газообразном состоянии представляет собой мономер, в водных растворах почти полностью гидратирован:

$$H_2C = O + H_2O \leftrightarrow H_2C(OH)_2.$$

Газообразный формальдегид легко растворяется в воде и полярных растворителях. В растворе всегда присутствуют небольшие количества негидратированного мономера CH_2O [349].

Поступление в организм формальдегида происходит ингаляционным, пероральным и накожным путем. При ингаляции формальдегид адсорбируется в верхних дыхательных путях и начинает превращаться в формиат. Формальдегид может присутствовать в продуктах питания как метаболит, консервант или загрязнитель. В рыбных продуктах образуется из триметиламина под действием ферментов или бактерий, в копчености поступает с дымом, в зерно, сыр добавляется как консервант. Общее поступление формальдегида в организм человека в день в среднем составляет: с пищей 1,5–5,0 мг; с атмосферным воздухом – 1,0–5,0 мг; с питьевой водой – 0,2 мг [63, 76].

Поступившие в кровь кислородсодержащие органические соединения разносятся ею по всему организму. Распределение их в различных органах и тканях неравномерно и зависит от физических и химических свойств: от растворимости в воде, жирах и других липидах, диссоциации, состава и функциональных особенностей органов и тканей.

Поступившие в организм кислородсодержащие органические соединения под влиянием ферментов подвергаются биотрансформации с образованием метаболитов.

Распределение формальдегида по органам и тканям неравномерно. При содержании в плазме крови $1{,}07 \pm 0{,}25$ мг/л, в печени определяется $1{,}7 \pm 0{,}87$ мг/кг. В почках содержание формальдегида меньше, чем в печени. При введении формальдегида животным в дозах, вызывающих гибель некоторых животных, максимальный уровень вещества отмечался в тканях с интенсивным клеточным делением: в кроветворных органах, лимфоидной системе, слизистой тонкого кишечника, а также в органах с высокой скоростью синтеза белка: в поджелудочной железе и слюнных железах. При внутрижелудочном введении через 12 часов наибольшее количество формальдегида обнаруживалось в костном мозге [48].

Метаболизм формальдегида представляет интерес, так как формальдегид является активным метаболитом ряда различных метилированных соединений. Он образуется в печени при действии микросомальной диметилазы из диметиламиноэтанола, N-метил-альфа-аминокислот, а также при N-деметилировании аминопирина, доксепина,

N,N-диметиланилина, при биотрансформации дигалоидпроизводных метана и метилметакрилата [349]. A. Ulsamer указывает, что основной источник эндогенного формальдегида – это разрушение серина и в меньшей степени других аминокислот.

При попадании в кровь формальдегид претерпевает ферментативные превращения, окисляясь до муравьиной кислоты. Описаны и неферментативные реакции превращения. Он легко взаимодействует с аминами, амидами, белками, нуклеопротеидами, нуклеозидами, нуклеиновыми кислотами [32, 63, 76]. Часть формальдегида, не подвергшаяся биотрансформации в крови, быстро проникает в органы и ткани.

Основные метаболические превращения формальдегида происходят в печени, где он может взаимодействовать с рядом ферментных систем (альдегиддегидрогеназой, алкогольдегидрогеназой, альдегидоксидазой, ксантиндегидрогеназой, ксантиноксидазой) [63]. В этом же процессе может участвовать и каталаза. В печени формальдегид превращается в муравьиную кислоту и метиловый спирт (явление дисмутации) [48, 63]. В дальнейшем муравьиная кислота метаболизирует при действии формиатдегидрогеназы до CO_2 или вовлекается через систему тетрагидрофолиевой кислоты в обмен одноуглеродных остатков.

Формальдегид – раздражающий газ. Оказывает общетоксическое действие на организм. Вызывает поражение центральной нервной системы, легких, печени, почек, органов зрения. Возможно кожно-резорбтивное действие. Обладает мутагенным, раздражающим, сенсибилизирующим действием. Свободный формальдегид инактивирует ряд ферментов в органах и тканях, угнетает синтез нуклеиновых кислот, нарушает обмен витамина С [10, 63, 103, 503, 552].

В контролируемых условиях при исследовании ингаляционного действия формальдегида на добровольцах в возрасте 18–35 лет, вдыхавших пары формальдегида в концентрации 2 млн$^{-1}$ в течение 40 мин, установлено уменьшение объема форсированного вдоха за 1 с и изменение диффузионной способности легких. В отдельных случаях при физической нагрузке наблюдались явления бронхоспазма.

Хроническое отравление сопровождается раздражением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, сенсибилизацией, поражением легких [63, 199, 349].

Отмечаются расстройства пищеварения, гиперестезии, возбуждение, потливость, астматические явления.

Формальдегид оказывает мутагенное действие на животных и человека. Альдегид мутагенен для вирусов, бактерий, растений, грибов и насекомых [63, 348].

При действии в течение ряда лет в концентрациях 317,0, 130,0, 30,5 мкг/м^3 формальдегид вызывал зависимое от уровня воздействия увеличение числа аберрантных клеток у лабораторных животных.

Среди 15–18-летних учеников, занимавшихся в помещениях училища, построенного с использованием ДСП, обнаружено более высокое по сравнению с контролем число лиц с аберрированными клетками и измененными показателями гуморального иммунитета. Зафиксированы явления генотоксического и иммунотоксического действия формальдегида [42].

Канцерогенное действие формальдегида отмечено в опытах на животных [63].

Для человека предполагаемая канцерогенность окончательно не подтверждена. Эпидемиологические исследования на людях дают возможность заключить, что при воздействии формальдегида риск возникновения рака относительно невелик [63]. Формальдегид относят к группе 2А – вероятный канцероген для человека.

Формальдегид оказывает раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки. Формалин иногда вызывает заболевание ногтей, боли в концах пальцев, крапивницу по всему телу, уменьшение потоотделения на соприкасающихся с ним участках кожи. Такие заболевания могут вызывать даже очень разведенные растворы формальдегида (до 0,015 %). Отмечаются зуд, легкая гиперемия и инфильтрация, сопровождающаяся образованием нарывов с поверхностным некрозом. Иногда может развиться мокнущая экзема [63, 199].

Марганец

Марганец является химическим элементом VII группы периодической системы элементов. Относится к первой серии переходных элементов, как и все переходные элементы, обладает рядом свойств: металл, может иметь разные степени окисления и образует большое число окрашенных и парамагнитных соединений.

В элементарном состоянии марганец представляет собой серовато-белый, ломкий и химически активный металл, имеющий точку плавления 1244 °С и точку кипения 1962 °С. Это наиболее распространенный металл после железа и титана. Наибольшее значение имеют соединения марганца со степенью окисления +2, +3, +7. Соли двухвалентного марганца в основном растворимы в воде.

Марганец (+2) во многих отношениях сходен с Mg (+2) и способен замещать его во многих биологических молекулах. Марганец может образовывать ряд различных комплексов, особенно в состоянии +2, состояние +1 характерно для гексациановых комплексов [51].

Марганец образует различные металлоорганические соединения, например, пентакарбомилманганат натрия и мангонацен. Однако наибольший практический интерес представляет метилциклопентадиенилмарганецтрикарбонил (ММТ, или антидетонатор 33Х), является присадкой к топливной нефти как ингибитор дымообразования и как антидетоноторная присадка, особенно в сочетании с тетраэтилсвинцом.

В токсикологическом отношении представляют интерес две группы органических соединений марганца. Основной представитель первой группы марганецэтиленбис-дитиокарбамат используется в качестве фунгицида для обработки сельскохозяйственных культур. Другая группа соединений – трикарбонильные производные марганца. Они применяются в качестве присадок к неэтилированному бензину [51].

Марганец является одним из биологически необходимых микроэлементов как для животных, так и для человека. Играет важную роль в образовании соединительной ткани и костей, роста организма, в липидном и углеводном обмене, в эмбриональном развитии вестибулярного аппарата. Из специфических биохимических функций марганца следует упомянуть его роль как катализатора образования связи «глюкозамин – серин» при синтезе мукополисахаридов хрящевой ткани.

Входит в состав витамина К. Суточная потребность: 2–3 мг – взрослые; 1,25 мг – дети [51].

Основные пути поступления в организм – респираторный и через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Хотя количественные данные в этом отношении отсутствуют, по-видимому, маловероятно, что кожный путь играет важную роль в поступлении неорганических соединений марганца, в то время как органические соединения марганца могут сорбироваться кожей.

Степень абсорбции марганца, поступившего ингаляционным путем, неизвестна.

Имеющееся небольшое число данных о желудочно-кишечном всасывании марганца у человека свидетельствует о том, что уровень такого поглощения у здоровых взрослых не превышает 5 %, но что он выше у лиц, страдающих анемией [51].

Общее содержание марганца в организме 10–20 мг. Он поступает в плазму, связываясь с β_1-глобулином (трансманангин), и далее распределяется по всему организму. Марганец концентрируется в митохондриях, при этом наиболее высокие его концентрации образуются в печени, поджелудочной железе, почках и кишечнике. Он способен также проникать через гематоэнцефалический и плацентарный барьер [67].

Период полувыведения марганца из организма в целом составляет около 37 дней. Содержание марганца в тканях стабильно на протяжении всей жизни.

Известно, что вариабельность выведения играет важную роль в гомеостазе марганца в организме, однако большее значение имеет вариабельность поглощения.

Неорганические соединения марганца выводятся главным образом через желудочно-кишечный тракт. Основной путь выведения – с желчью, часть которой реабсорбируется в процессе кишечной циркуляции. Частично имеет место также выведение с соком поджелудочной железы. Было установлено, что в норме с мочой выделяется только около 13 % потребляемого в сутки марганца. Однако при воздействии органических трикарбонильных соединений через почки выводится его значительное количество; это свидетельствует о том, что указанные соединения, используемые в качестве присадок к бензину, метаболизируются в организме [51].

Основные токсикологические эффекты марганца связывают с его воздействием на центральную нервную и сердечно-сосудистую системы, марганец обладает сенсибилизирующим и мутагенным действием [4, 51, 74].

Хром

Хром твердый блестящий металл. $T_{пл.}$ = 1890 °С, $T_{кип.}$ = 2480 °С, плотность 6,92. Химически мало активен при обычных условиях устойчив к кислороду и влаге. Царская водка и азотная кислота пассивируют хром. Степени окисления +3, +6. Основные соединения хрома: окись хрома (+3) – используется в составе хромовых катализаторов, для получения хрома, красок для стекла и керамики; окись хрома (+6) – применяется для электролитического хромирования; хромат натрия, хромат калия, хромат аммония используются в производстве пигментов как окислители в органическом синтезе, как протрава при крашении; бихромат натрия, бихромат калия, бихромат аммония – в металлообрабатывающей, кожевенной, текстильной, химической, лакокрасочной,

фармацевтической, керамической промышленности, для протравки семян; хлорид хрома (+3) – для получения хрома [51]. Хром – микроэлемент, являющийся активатором ряда ферментов и витаминов. Важна биологическая роль хрома – взаимодействие с инсулином в процессах углеводного обмена, участие в структуре и функциях нуклеиновых кислот и, очевидно, щитовидной железы [4, 51].

В организме взрослого человека содержится около 6 мг хрома с концентрацией в тканях 0,02–0,04 мг/кг в расчете на сухую массу. С возрастом хром аккумулируется в легких, но в количествах, не опасных для здоровья. В норме содержание в цельной крови составляет 1,44–3,08 нМ/л. Большая часть хрома сосредоточена в эритроцитах (60 %). С мочой выделяется менее 1,0 мкг/сут. Волосы содержат 0,44 мг/кг. У детей концентрация хрома в волосах выше, чем у их матерей [51].

Концентрация хрома в пище довольно низкая. Применение хрома в промышленности считается умеренно опасным [48, 51, 186, 369].

Повышенное содержание хрома в крови отмечается при лейкозах и аллергии, снижение – при гастрогенной железодефицитной и апластической анемии.

Соединения хрома в производственных условиях могут оказывать общетоксическое действие, мутагенный, сенсибилизирующий и канцерогенный эффекты [31, 48, 51, 369].

Хром (III) наименее токсичен, более высокой токсичностью обладают соединения хрома (VI), однако сенсибилизирующий эффект связывают прежде всего с хромом 3^+ [369].

Желудочно-кишечная абсорбция хрома низкая – менее 3 %, независимо от типа пищи и дозы [186]. Некоторые хелатированные комплексы хрома остаются и абсорбируются в кровь. В кровяном русле хром специфически связывается с трансферрином, который служит переносчиком не только железа, но и хрома.

Соединения хрома (VI) абсорбируются через легкие и ЖКТ легче, чем хром (III). На всасывание хрома оказывают влияние цинк и железо. При недостатке этих микроэлементов (МЭ) усвоение хрома возрастает, а при их одновременном поступлении снижается, что свидетельствует об общих путях поступления цинка, железа и хрома, взаимный антогонизм на уровне всасывания существует и между хромом и ванадием [369].

Концентрация хрома в тканях в 10–100 раз выше, чем в крови. Содержание хрома в тканях новорожденных, как правило, значительно выше, чем у взрослых, и быстро снижается в течение всей жизни [4, 51, 186].

Доказано активное участие хрома в процессе метаболизма углеводов. Хром способен вызывать значительные изменения в ядерных структурах клетки, что свидетельствует о его канцерогенности, в большей степени это относится к соединениям хрома (VI) [48, 51]. По данным Л.Н. Дворянинович [48, 51], хром вызывает патологические процессы во внутренних органах, способствует изменению иммунного статуса, обладает аллергизирующим действием. Наиболее выраженное повреждающее действие на лимфоидную ткань оказывает введение соединений хрома в комплексе со свинцом, медью и серебром.

Выделение хрома из организма происходит в основном с мочой, и лишь небольшая его часть удалятся с желчью, потом и волосами [186].

Никель

Никель – металл, $T_{пл.}$ = 1453 °С, $T_{кип.}$ = 3000 °С, плотность 8,9 г/см^3, устойчив по отношению к воде.

Природный никель состоит из смеси изотопов (Ni^{58}, Ni^{60}, Ni^{61}, Ni^{62}, Ni^{64}).

Содержание в земной коре $8 \cdot 10^{-3}$ вес %.

Сплавы никеля с хромом, железом обладают сочетанием высокой жаростойкости и высокого электрического сопротивления. Применяются в реактивной технике, при создании газотурбинных установок, в конструкциях атомных реакторов.

Для химической аппаратуры, работающей в высокоагрессивной среде, применяются сплавы никеля и молибдена.

Значительное количество никеля расходуется для производства щелочных аккумуляторов и антикоррозийных покрытий. Ковкий никель в чистом виде применяют для изготовления листов, труб, специальной химической аппаратуры и как катализатор многих химических процессов [32].

Никель относится к числу «новых» биоэлементов, жизненная необходимость которых установлена только после 1970 г. [4].

В 1979 г. никель был отнесен к числу важнейших биоэлементов.

По механизму биологического действия никель обнаруживает заметное сходство с другими 3d-элементами – железом и кобальтом

[5, 69]. В последнее время биологический эффект МЭ интенсивно исследуется в связи с глобальным загрязнением окружающей среды. В частности, по данным Я.М. Грушко (1972), ежегодно в атмосферу и на поверхность почвы поступало в среднем 15 000 т никеля. Более поздние данные свидетельствуют о возрастании выбросов никеля в атмосферу ($47 \cdot 10^3$ т никеля в год), причем это количество будет увеличиваться в течение последующих лет. В программе глобального мониторинга, принятой ООН в 1980 г. [4], никель упомянут как один из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды. Действительно, в перспективе ожидается десятикратное увеличение поступления никеля в атмосферу только в результате сжигания каменного угля. Ориентировочно можно полагать, что на протяжении года в биологическую миграцию вовлекаются сотни тысяч тонн никеля. Потребление в пищу продуктов растительного и животного происхождения приводит к повышенному поступлению в организм человека этого микроэлемента. Другой источник проникновения никеля в организм – локальные техногенные геохимические аномалии, формирующиеся вблизи предприятий по переработке никеля [4].

Никель – микроэлемент, являющийся одним из активаторов окислительно-восстановительных процессов, стимулирующий гемопоэз, в норме в цельной крови составляет 0,08–0,12 мкг/мл [51], в моче – 9,4 мкг/сут. В крови мужчин никеля несколько больше, чем у женщин.

Повышенное содержание никеля в плазме отмечено при атеросклерозе, анемиях, в развернутую фазу лейкоза, при ревматизме, недостаточности кровообращения, инфаркте миокарда, вирусных гепатитах, воспалительных заболеваниях почек, мочекаменной болезни, пневмонии, лимфогранулематозе, аллергии; снижение – у больных хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, уремией. Никельдефицитные состояния у человека не описаны [186].

Большое количество исследований, посвященных изучению содержания никеля в цельной крови здоровых людей, показывает значительные отличия и колебания в пределах 2,2–32,7 на 100 г крови [51].

Всасывание никеля даже при его повышенном содержании в рационе колеблется в пределах 1–10 %, требует затраты энергии и осуществляется, по-видимому, общей с железом транспортной системой, функционирующей в проксимальной части тонкой кишки [122]. Большая часть никеля выделяется с калом и мочой. С потом удаляется в су-

тки около 8 мкг никеля, но при обильном потоотделении это количество существенно возрастает. У человека с калом выделяется 260 мкг никеля, что в 20 раз превышает количество этого микроэлемента, выделяемого с мочой [51].

Никель поступает в организм и через легкие, особенно у рабочих, находящихся в профессиональном контакте с этим металлом. Если вдыхаемые соединения никеля хорошо растворимы в воде, и они вскоре выделяются с мочой, тогда как нерастворимые соединения могут задерживаться в легких в течение длительного времени. По некоторым данным, период полувыведения никеля из легких может достигать 330 дней [51].

Транспорт этого МЭ в крови осуществляется в основном альбумином, который образует с ним пентакоординированный комплекс. Различие между медью и никелем в данном случае заключается в том, что последний имеет меньшее сродство к альбумину, чем медь, и большее – к гистидину. Возможно, что именно этим объясняется быстрое выделение с мочой никеля, введенного парентерально, в то время как выделение меди происходит в основном с желчью [4, 235].

В транспорте и обмене никеля принимают участие, по-видимому, еще два белка. Это богатый гистидином гликопротеид (БГГ) и никелеплазмин.

Рассматривая жизненную необходимость никеля для животных и человека, следует, как и в случае с кобальтом, различать два главных аспекта: его косвенное воздействие на организм через симбиотические микроорганизмы и экзогенные ферменты пищеварительного тракта и его прямое участие в метаболизме [4, 235].

Населяющая желудочно-кишечный тракт микрофлора содержит целый ряд ферментов, в составе которых обнаружен никель. Эти ферменты, принимая участие в пищеварительных процессах животных, могут оказывать заметное влияние на физиологическое состояние организма [4, 51, 235].

Никель способствует всасыванию железа в пищеварительном тракте, будучи кофактором неидентифицированного биолиганда, связывающего железо, или участвуя в ферментном механизме, превращающем Fe^{+3} в легкоусвояемое Fe^{+2} [4, 51, 235]. Имеются наблюдения, что сразу после родов, но еще до отделения плаценты, содержание никеля в сыворотке крови рожениц повышается в 20 раз, однако уже через 60 мин возвращается к норме [46, 51, 235]. Эти наблюдения дают основание полагать, что

данный МЭ необходим для отделения плаценты или предупреждения атонических кровотечений в послеродовом периоде [46, 51, 235].

Биологическое действие никеля на животный организм объясняется, по-видимому, также и тем, что он принимает участие в структурной организации и функционировании основных клеточных компонентов – ДНК, РНК и белка. Наряду с этим высказано предположение, что никель участвует в гормональной регуляции организма. В частности, имеются данные о его вовлечении в обмен пролактина [4, 235]. Некоторые изменения организма при дефиците никеля могут быть объяснены именно дисбалансом гормонов.

Суточная потребность в никеле у человека – около 60 ммоль в сутки [235].

3.2. Токсикология других токсикантов (краткая токсикологическая справка)

Анилин [16, 118]

Эмпирическая формула: $C_6H_5NH_2$.

Молекулярная (атомная) масса: 93,00.

Экологическая безопасность. Трансформируется в окружающей среде, малостабилен, факторы деструкции – физический, химический.

Острое отравление. Цианоз, головная боль, головокружение, обратимая потеря сознания, одышка, тахикардия, падение АД, эйфория, тошнота, рвота, что обусловлено метгемоглобинемией, изменениями со стороны центральной и вегетативной нервной системы.

Хроническое отравление. Изменения красной крови типа анемии, имеющей гипохромный характер. Повышение уровня метгемоглобина, телец Гейнца, падение кислородной емкости крови, усиление процессов регенерации в сфере эритропоэза. При длительном контакте с анилином – вегетососудистая дистония и неврастения.

Наиболее поражаемые органы и системы: красная кровь, центральная и вегетативная нервная система, паренхиматозные органы.

Поступление в организм: через верхние дыхательные пути, кожу.

Накопление в организме: в паренхиматозных органах, жировой ткани.

Выделение из организма: через мочевыделительную систему.

Гигиенические нормативы:

– воздух атмосферный: $ПДК_{сс}$ = 0,03 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– воздух рабочей зоны: $ПДК_{рз}$ = 0,10 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– вода водоисточников: ПДК $_{вр}$ = 0,10 мг/л, 2-й класс опасности;

– лимитирующий показатель вредности (ЛПВ): органолептический;

– почва: нет данных.

Дополнительные сведения. Введенный в организм анилин выделяется с мочой в виде конъюгатов п-аминофенола, о-аминофенола, м-аминофенола, N-фенилглюкоронида, фенилсульфаминовой кислоты, ацетиланилина, свободного анилина. Фоновая концентрация в моче – 0,015317 мг/м^3. Обладает кумулятивным, раздражающим, кожно-резорбтивным, сенсибилизирующим, тератогенным и мутагенным действиями.

Бензол [27, 48]

Эмпирическая формула: C_6H_6.

Молекулярная (атомная) масса: 18,00.

Экологическая безопасность. Трансформируется в окружающей среде, малостабилен, факторы деструкции – физический, химический.

Острое отравление. При очень высоких концентрациях – почти мгновенная потеря сознания и смерть в течение нескольких минут. Окраска лица синюшная, мутные слизистые оболочки, часто вишнево-красные. При меньших концентрациях – возбуждение, затем сонливость, общая слабость, головокружение, тошнота, рвота, головная боль, потеря сознания, мышечные подергивания. Зрачки часто расширены, не реагируют на свет. Дыхание сначала учащенное, затем замедленное. Температура тела резко снижается. Пульс учащенный, малого наполнения. Кровяное давление понижено.

Хроническое отравление. Головные боли, чрезвычайная утомляемость, одышка, головокружение, слабость, нервность, сонливость или бессонница, расстройство пищеварения, тошнота, иногда рвота, отсутствие аппетита, многочисленные мелкие кровоизлияния в коже, кровь в испражнениях, маточные кровоизлияния, кровоизлияния в сетчатку, часто сопутствующая им лихорадка.

Наиболее поражаемые органы и системы: кровь и кроветворные органы, в меньшей степени – нервная система. Отмечается патология со стороны других органов и систем.

Поступление в организм: через верхние дыхательные пути, кожу.

Накопление в организме: в паренхиматозных органах, жировой ткани, костном мозге, крови.

Выделение из организма: через дыхательные пути, мочевыделительную систему.

Гигиенические нормативы:

– воздух атмосферный: $ПДК_{сс}$ = 0,1 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– воздух рабочей зоны: $ПДК_{рз}$ = 15,0 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– вода водоисточников: $ПДК_{вр}$ = 0,5 мг/л, 2-й класс опасности;

– ЛПВ: нет данных;

– почва: ПДК = 0,3 мг/кг.

Дополнительные сведения. Метаболиты вещества: фенол, гидрохинон, пирокатехол, которые экскретируются как конъюгаты глюкоуронида.

Бензол обладает кумулятивным, раздражающим, кожно-резорбтивным, сенсибилизирующим, мутагенным и канцерогенным действиями.

Фенол

Эмпирическая формула: C_6H_5OH.

Молекулярная (атомная) масса: 94,00.

Экологическая безопасность. Трансформируется в окружающей среде, малостабилен, факторы деструкции – физический, химический.

Острое отравление. Происходит главным образом при попадании фенола на кожу. Тяжесть интоксикации зависит от размеров и степени поражения кожи. При поступлении яда внутрь возникают тошнота, рвота, боли в полости рта, глотке, животе, понос, профузный пот, сильная одышка, жажда, цианоз. Возбуждение сменяется угнетением. Падает артериальное давление, отмечаются судороги, отек легких. Смертелен прием фенола в количестве от 1 до 10 грамм.

Хроническое отравление. При хроническом отравлении развиваются нарушения в ЦНС, затем в сердечно-сосудистой системе, поражается желудочно-кишечный тракт, изменяется витаминный обмен.

Наиболее поражаемые органы и системы: печень, почки, миокард, надпочечники, головной мозг, слизистая оболочка.

Поступление в организм: через желудочно-кишечный тракт, верхние дыхательные пути, кожу.

Накопление в организме: в жировой ткани.

Выделение из организма: через мочевыделительную систему.

Гигиенические нормативы:

– воздух атмосферный: $ПДК_{сс}$ = 0,003 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– воздух рабочей зоны: $ПДК_{рз}$ = 0,30 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– вода водоисточников: $ПДК_{вр}$ = 0,001 мг/л, 4-й класс опасности;

– ЛПВ: нет данных;

– почва: нет данных.

Дополнительные сведения. Допустимое содержание в моче, по данным литературы, 7,00 мг/дм^3.

Метаболиты вещества: в процессе биотрансформации частично образуется CO_2, гидрохинон, пирокатехин. Фенол связывается с глюкуроновой кислотой и выводится почками.

Обладает сильным кумулятивным, раздражающим, сенсибилизирующим, тератогенным, мутагенным действиями.

Поскольку фенол используется во многих производственных процессах и во многих изделиях, воздействие фенола может быть везде – там, где вы работаете, или в очень низких концентрациях дома. Фенол присутствует в ряде потребительских товаров, которые глотают, растирают или прикладывают к различным частям тела. К ним относятся мази, капли для ушей и носа, лосьоны от герпеса, жидкости для полоскания рта, капли от снижения зубной боли, анальгезирующие ромбы, пастилки для горла и антисептические лосьоны.

Фенол обнаружен в питьевой воде, воздухе, в выхлопных газах автомобилей, табачном дыме, дыме марихуаны и в некоторых пищевых продуктах (например, копченые колбасы, жареные цыплята, горный сыр, некоторые разновидности рыбы).

Фенол может поступать в организм, когда человек пьет загрязненную воду, ест загрязненную пищу или глотает изделия, содержащие фенол. Фенол, пролитый на кожу, легко проникает через нее в организм. Также фенол может поступать через легкие, когда человек курит или вдыхает воздух или дым, содержащий фенол.

Количество фенола, поступающего в организм, зависит от контакта кожи с водой, которая содержит фенол, зависит от того, сколько фенола находится в воде, как долго происходит контакт с кожей, и какая площадь кожи соприкасается с загрязненной водой. Если человек подвергается воздействию воздуха, содержащего фенол, фенол может проникать в организм через кожу и легкие. Через кожу в организм может поступать более половины фенолов, содержащихся в воздухе [76].

Фенол – нервный яд, обладающий сильным местным раздражающим и прижигающим действием. Оказывает помимо общетоксического, ферментопатическое действие [48]. Фенол и его производные являются разобщителями клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования. Фенол имеет сильный запах, граница восприятия 0,004 мг/л. Действие фенола на человека: острые отравления: головокружение, тяжесть в голове, оглушение с шумом в ушах, слабость в ногах, потливость, слабый учащенный пульс, одышка, осложнения в легких, охриплость [48]. Хрони-

ческие отравления: раздражение дыхательных путей, расстройства пищеварения, тошнота, рвота по утрам, общая и мышечная слабость, потливость, слюнотечение, кожный зуд, раздражительность, бессонница, реже почечные заболевания. Местное действие: зависит от длительности воздействия и площади соприкосновения, 2–3 % раствор может привести к раздражению и даже омертвению кожи [48]. В организме фенол концентрируется больше всего в легких, печени, мозге и крови. Предельно допустимая концентрация – 0,005 мг/л (НСП 101-51) [48].

Изменения в состоянии здоровья экспериментальных животных при воздействии фенола. Эксперимент, проводимый на белых беспородных крысах, подвергавшихся изолированной затравке фенолом и пылью, показал, что отмечалось изменение показаний мышечной силы. Незначительное отставание прироста массы тела при длительном воздействии фенола возможно по причине большой чувствительности митохондрий головного мозга к повреждающему действию фенола. При исследовании макрофагальной системы у экспериментальных животных было отмечено содержание фосфолипидов в альвеолярных макрофагах легких. В нейтрофилах и моноцитах достоверно возросло содержание фосфолипидов, а активность НТС-теста увеличилась почти в 3 раза.

Исследования по воздействию фенола на здоровье детей. При обследовании 127 детей дошкольного возраста, проживающих на условно неблагополучной территории с превышением ПДК в атмосферном воздухе, предъявлявших жалобы на хроническую усталость, сонливость, снижение памяти, эмоциональную лабильность, были выявлены сдвиги гормонального, биохимического и окислительно-восстановительного гомеостаза, находящихся в причинно-следственных связях с уровнем содержания в крови фенолов. Длительное стрессовое воздействие невысоких доз фенолов, уровни которых коррелируют с повышенным содержанием в крови адаптивных гормонов и нейротрансмиттеров холиэнергетических нейронов (кортизол, серотонин), способствует развитию дисфункций высшей нервной системы (ВНС). У детей, проживающих в условиях загрязнения атмосферного воздуха фенолом и его производными, в 50 % случаев выявлена ваготония, что могло способствовать снижению адаптивных возможностей организма ребенка. У детей с максимальным содержанием фенола в крови были наиболее выражены дезадаптивные процессы [116, 276].

При обследовании 127 детей дошкольного возраста, проживающих на территории, где превышена ПДК по содержанию в атмосферном воз-

духе фенола (до 2,3 ПДК$_{сс}$) и крезолов (до 2,0 ПДК$_{сс}$, до 7,4 ПДК$_{мр}$), было выявлено увеличение концентрации в крови фенола (0,088 ± 0,01 мкг/см^3) и о-крезола (0,205 ± 0,02 мкг/см^3) относительно фонового уровня (0,010 ± 0,0012 и 0,0 ± 0,0 мкг/см^3 соответственно) в 7,5 и 2,05 раза (p_1 = 0,037 и p_2 = 0,022). При хроническом воздействии фенола и крезолов индексы опасности развития патологии ЦНС – 9; нервной системы – 10; сердечно-сосудистой системы – 16. Вклад крезола в индексы опасности развития патологии нервной системы достигает до 99,77 %; вклад фенола в индексы опасности развития патологии ЦНС – 65,34 %; сердечно-сосудистой системы – 32,47 %. Наиболее выраженные дезадаптивные процессы регистрировались у детей с асимпатико-тонической реактивностью (10 % всех обследованных) и максимальным содержанием фенола и крезола в крови. Установлена зависимость регистрируемых изменений показателей вегетативного тонуса и вегетативной реактивности от уровня содержания в крови фенола или его производных. Выявлены прямые корреляции между показателями напряжения адаптационно-компенсаторных процессов и наличием в крови о-крезола.

Выборочное обследование 110 детей в возрасте 3–7 лет показало, что в атмосферном воздухе в районах проживания пациентов средние годовые концентрации формальдегида регистрировались на уровне до 2,4 ПДК$_{сс}$, фенола – до 3,5 ПДК$_{сс}$.

В биосредах детей с респираторной патологией, проживающих на территориях с неблагоприятным влиянием техногенных химических факторов, отмечается повышение содержания фенола и формальдегида. У детей с контаминацией биосред фенолом и формальдегидом в 1,2 раза чаще, чем в группе сравнения, отмечались хронические воспалительные заболеваний рото- и носоглотки с гипертрофией лимфоидной ткани. Дети предъявляли жалобы на частые простудные заболевания. Острые респираторные заболевания у них протекали с наличием приступообразного кашля, который принимал затяжной характер. Также отмечались жалобы диспепсического характера: вздутие живота, периодические боли в животе, неустойчивый стул. Сравнительный анализ результатов клинико-лабораторного обследования показал, что для пациентов характерно повышение в общем анализе крови содержания лейкоцитов. У детей с респираторной патологией и контаминацией биосред фенолом и формальдегидом в 42,3 % случаев отмечался повышенный уровень иммуноглобулина класса А по сравнению с физиологической нормой, в 33,3 % – пониженный уровень, увеличение процента фагоцитоза [116].

Свинец [30, 48, 199, 260, 383]

Эмпирическая формула: Pb.

Молекулярная (атомная) масса: 207,00.

Физико-химические параметры:

– агрегатное состояние вещества: твердое;

– температура кипения: 1743 °С;

– температура плавления: 327,4 °С;

– плотность: ρ = 11,3 г/см^3;

– растворимость:

в воде – нерастворим;

в жирах – нет данных;

в органических растворителях – нет данных;

– смешиваемость (вещество – вода): нет;

– запах: нет;

– реакционная способность: окисляется при нагревании, реагирует с щелочью, не реагирует с фтороводородом, разбавленными серной и соляной кислотами, реагирует с разбавленной азотной кислотой, горячими концентрированными серной и соляной кислотами.

Экологическая безопасность. Не трансформируется в окружающей среде, стабилен, факторы деструкции – физический, химический.

Острое отравление. Гиподинамия, одышка, диарея, снижение температуры тела, тремор. Свинцовая кайма по краю десен, преимущественно у передних зубов. «Свинцовый колорит» – землисто-серая окраска кожи; ретикулоцитоз свыше 10 %. Появление в крови базофильно-зернистых эритроцитов в количестве не менее 15 на 10 000 эритроцитов. Повышение содержания порфиринов в моче свыше 50–60 мкг/л. Увеличение содержания дельта-аминолевулиновой кислоты в моче (свыше 2 мг%). Снижение активности дегидратазы в эритроцитах, сохраняющееся несколько лет после отравления. Повышение содержания свинца в крови и моче.

Хроническое отравление. Изменения в нервной системе: астенический синдром, энцефалопатии, двигательные расстройства, чувствительная форма полиневрита, поражение анализаторов на ранних этапах интоксикации.

Изменения в системе крови: на начальных стадиях интоксикации – ретикулоцитоз и нарастание содержания базофильно-зернистых эритроцитов. В дальнейшем развивается олигохромная, реже нормохромная анемия. Содержание гемоглобина падает до 9–10 г% или ниже. Свинец способен изменять антигенную структуру эритроцитов. Одной из основных причин свинцовой анемии является нарушение порфиринового

обмена, лежащего в основе синтеза гемоглобина. Отмечаются значительные сдвиги в свертывающей и антисвертывающей системах крови.

Обменные и эндокринные нарушения: свинец нарушает синтез порфиринов и гема на разных стадиях: угнетает ряд ферментов, участвующих в обмене порфиринов (дегидратазу, декарбоксилазу, гемсинтетазу). Свинец подавляет активность также SH-содержащих ферментов, холинэстеразы; повышает активность в сыворотке крови альдолазы, некоторых аминофераз и трансаминаз. Изучено действие на половые железы, течение беременности и развивающийся плод. Поражение щитовидной железы проявляется в нарушении накопления йода и снижении секреции тироксина.

Изменения в желудочно-кишечном тракте: нарушены секреторная и моторно-эвакуаторная функции желудка. Возможно снижение функции поджелудочной железы и увеличение секреции слюнных желез на фоне угнетения амилолитической активности слюны, возникновение свинцовой колики. Поражение печени проявляется в нарушении пигментной, углеводной, антитоксической, белковой и жировой функций.

Изменения в сердечно-сосудистой системе: снижение вольтажа и деформация зубцов ЭКГ, удлинение электрической систолы желудочков, нарушение внутрипредсердной, предсердно-желудочковой и внутрижелудочковой проводимости. Возможно развитие гипертонии или гипотонии, а также атеросклероза.

Наиболее поражаемые органы и системы: нервная система, кровь, эндокринная система, желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистая система.

Поступление в организм: через желудочно-кишечный тракт, верхние дыхательные пути.

Накопление в организме: в паренхиматозных органах, волосах.

Выделение из организма: через мочевыделительную систему, желудочно-кишечный тракт.

Гигиенические нормативы:

– воздух атмосферный: $ПДК_{сс}$ = 0,0003 мг/м^3, 1-й класс опасности;

– воздух рабочей зоны: $ПДК_{рз}$ = 0,01 мг/м^3, 1-й класс опасности;

– вода водоисточников: $ПДК_{в}$ = 0,03 мг/л, 2-й класс опасности;

– ЛПВ: общесанитарный;

– почва: ПДК = 6,0 мг/кг.

Дополнительные сведения. Фоновые концентрации в биосредах по данным литературы:

– моча: 0,25 мг/дм^3;

– кровь: 0,10 мг/дм^3.

Обладает сильным кумулятивным, а также раздражающим, гонадотропным, тератогенным, иммунотропным, мутагенным и канцерогенным действиями.

Дихлорэтан [199]

Эмпирическая формула: $C_2H_4Cl_2$.

Молекулярная (атомная) масса: 99,00.

Физико-химические параметры:

– агрегатное состояние вещества: жидкость;

– температура кипения: 57,3 °С;

– плотность: $\rho_4^{20} = 1{,}174$ г/см^3;

– растворимость:

в воде – растворим,

в жирах – нерастворим,

в органических растворителях – нет данных;

– смешиваемость (вещество – вода): нет данных;

– запах: выраженный;

– реакционная способность: гидролизуется.

Острое отравление. Сильная слабость, головокружение, рвота, болезненность в подложечной области, увеличение печени, наклонность к гипотонии, боли в области сердца, кашель, жжение в горле, ощущение горечи во рту, кожный зуд.

Хроническое отравление. Наблюдаются головные боли, усталость, тошнота, раздражение дыхательных путей, поражения печени и почек, изменения в сердечной мышце, бледность кожных покровов, понижение артериального давления.

Наиболее поражаемые органы и системы: паренхиматозные органы.

Поступление в организм: через кожу.

Накопление в организме: в паренхиматозных органах.

Выделение из организма: через мочевыделительную систему, желудочно-кишечный тракт.

Гигиенические нормативы:

– воздух атмосферный: $ПДК_{сс}$ = 3,0 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– воздух рабочей зоны: $ПДК_{рз}$ = 10 мг/м^3, 2-й класс опасности;

– вода водоисточников: нет данных;

– ЛПВ: нет данных;

– почва: нет данных.

Дополнительные сведения. Обладает раздражающим, иммунотропным, кожно-резорбтивным и мутагенным действиями.

4. ИММУННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И ГАПТЕНЫ

4.1. Неспецифическая резистентность организма в условиях воздействия гаптенов (фагоцитоз)

Фагоцитоз – поглощение клеткой крупных частиц, видимых в микроскоп (например, микроорганизмов, крупных вирусов, поврежденных тел клеток и т.д.). Процесс фагоцитоза можно подразделить на две фазы. В первой фазе происходит собственно поглощение частицы и ее дальнейшее разрушение. Различают две основные группы клеток фагоцитов – мононуклеарные и полинуклеарные. Полинуклеарные нейтрофилы составляют первую линию защиты от проникновения в организм разнообразных бактерий, грибов и простейших. Они уничтожают поврежденные и погибшие клетки, участвуют в процессе удаления старых эритроцитов и очистки раневой поверхности. Мононуклеарные фагоциты участвуют как в разрушении, так и в инициации и стимуляции фибропластических процессов. Они способствуют синтезу биологически активных веществ и формированию иммунного ответа путем модификации антигенов и представление их лимфоцитам. Таким образом, клетки мононуклеарной – фагоцитарной системы играют важную роль в инициации иммунного ответа посредством захвата антигена, представления его Т-лимфоцитам и секреции интерлейкина-1 (основного активатора Т-лимфоцитов).

Изучение показателей фагоцитоза имеет значение в комплексном анализе и диагностике иммунодефицитных состояний: часто рецидивирующих гнойно-воспалительных процессах, длительно не заживающих ран, склонности к послеоперационным осложнениям. Исследование системы фагоцитоза помогает в диагностике вторичных иммунодефицитных состояний, вызванных лекарственной терапией. В связи с тем что фагоциты участвуют в элиминации иммунных комплексов и активность фагоцитоза тесно связана с активностью компонентов комплемента, а именно С3, концентрацией IgG-антител, наличием других опсонизирующих факторов, исследование активности фагоцитоза играет важную роль в диагностике, оценке активности и эффективности терапии при ревматических заболеваниях, коллагенозах. Наиболее информативными для оценки активности фагоцитоза считают фагоцитарное число,

количество активных фагоцитов и индекс завершенности фагоцитоза. О бактерицидной активности нейтрофилов судят по тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) или лизосомально-катионному тесту (ЛКТ).

Заболевания и состояния, при которых изменяются фагоцитарная активность нейтрофилов, следующие:

1. Повышение показателя:

– антигенное раздражение вследствие бактериального воспаления (продромальный период острого проявления инфекции) при нормальной активности фагоцитоза;

– лейкоцитоз;

– аллергия;

– аутоаллергические заболевания;

– усиление антителозависимой цитотоксичности и реакции на донорский трансплантант.

2. Снижение показателя:

– хронические воспалительные заболевания бактериальной и вирусной природы;

– врожденные дефекты фагоцитарной системы, синдром Чедиака–Хигаси, болезнь Дауна, СКВ, коллагенозы, болезни иммунных комплексов, недостаток иммуноглобулинов, комплемента;

– лечение цитостатиками и иммунодепрессантами, облучение ионизирующей радиацией;

– вторичные и первичные иммунодефициты;

– новообразования;

– тяжелые ожоги, травмы, стресс;

– кишечные и почечные синдромы потери белка;

– недостаточность питания;

– недостаточность фагоцитоза;

– хронизация воспалительного процесса.

Результаты иммунологического тестирования *in vitro* выявили достоверное снижение индуцированного гаптенами (марганец, формальдегид) ответа по основным критериям показателей фагоцитоза (табл. 3, 4).

Несмотря на то что показатели фагоцитарного звена находятся в диапазоне нормы, в пробах крови с нагрузкой марганцем и формальдегидом наблюдается достоверное ($p<0,05$) снижение фагоцитарной активности по отношению к аналогичным показателям контрольных проб.

Таблица 3

Показатели фагоцитарной активности в нагрузочном тесте с марганцем (Mn)

Параметр	Процент фагоцитоза	Фагоцитарное число	Фагоцитарный индекс
Контрольная проба	58,88	1,118	1,866
Нагрузка Mn	47,94	0,818	1,695
Межгрупповое различие (*p*)	1,41286E-07	2,11275E-06	0,001877766
Границы нормы	35–60	0,8–1,2	1,5–2

Таблица 4

Показатели фагоцитарной активности в нагрузочном тесте с формальдегидом

Параметр	Процент фагоцитоза	Фагоцитарное число	Фагоцитарный индекс
Контрольная проба	58,88	1,118	1,866
Нагрузка формальдегидом	42,32	0,726	1,701
Межгрупповое различие (*p*)	1,96404E-12	9,27666E-09	0,006027842
Границы нормы	35–60	0,8–1,2	1,5–2

Достоверный дефицит был установлен по критериям процента фагоцитоза, фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса ($p<0,05$). Результаты свидетельствуют о том, что даже концентрации гаптенов на уровне референтных снижают активность показателей фагоцитарного звена. Уровень снижения не ведет к критическим нарушениям системы, но доказывает стрессорное влияние марганца и формальдегида на функционирование системы фагоцитоза, что позволяет отнести гаптены к факторам экзогенной нагрузки, модифицирующих активность системы фагоцитоза.

4.2. Резистентность организма и специфические факторы иммунитета. Цитокины, их роль в иммунной регуляции

Одним из основных механизмов межклеточной коммуникации иммунных клеток является секреция данными клетками цитокинов. Цитокины – белковые продукты клеток, выполняющие в организме важные регуляторные функции. Связываясь с клеточными рецепторами, они запускают каскад реакций, в результате которых инициируется экспрессия или угнетается транскрипция определенной группы генов.

Следствием этих событий может быть как стимуляция, так и подавление какого-либо функционального акта клетки. Цитокины регулируют дифференцировку и созревание многих иммунокомпетентных клеток, поддерживают их пролиферацию, направляют миграцию, контролируют продукцию антител и цитотоксическую активность, определяя, таким образом, интенсивность и продолжительность иммунного ответа [168, 392, 450].

К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 индивидуальных полипептидных веществ [190]. Классификация цитокинов может проводиться по их биохимическим и биологическим свойствам, а также по типам рецепторов, посредством которых цитокины осуществляют свои биологические функции. В зависимости от того, какие клетки иммунной системы преимущественно синтезируют тот или иной цитокин, различают интерлейкины (IL), монокины и лимфокины [168, 181, 448]. В настоящее время 37 интерлейкинов имеют цифровые обозначения (IL-1-IL-37), остальные цитокины буквенные: CSF (колониестимулирующие факторы), OSM (онкостатин М), LIF (фактор, ингибирующий лейкозные клетки), NGF (фактор роста нервов), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), TNF (фактор некроза опухолей), INF (интерфероны) и т.д. [181, 190].

В зависимости от механизма действия выделяют 5 основных групп цитокинов [181, 190]:

1. Гемопоэтические цитокины регулируют пролиферацию и дифференцировку всех клеток кроветворной системы. К ним относят CSF для гранулоцитарно-моноцитарной клетки-предшественника (GM-CSF), для предшественника моноцитов (M-CSF), для предшественника гранулоцитов (G-CSF), эритропоэтин, тромбопоэтин, IL-3 (мульти- CSF), IL-5 (CSF для эозинофилов), IL-7 (CSF для лимфоцитов), IL-1α и фактор стволовых клеток (SCF) [181, 190, 356].

2. Иммунорегуляторные цитокины – регулируют пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов и NK-клеток в периферических лимфоидных органах и тканях. К этой группе относятся IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, INF-γ [181, 190, 356, 392].

3. Первичные провоспалительные цитокины – IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, ФНО-α, INF-γ. При этом IL-1 причастен к запуску начальных событий иммунного ответа, в частности, к вовлечению в него Т-хелперов; IL-2 служит дифференцировочным фактором для Т-киллеров и способствует реализации функции Т-хелперов, усиливая выработку INF-γ; IL-6 играет

ключевую роль в развитии воспаления и иммунного ответа на инфекцию и повреждение тканей; IL-8 известен как фактор активации нейтрофилов; ФНО-α обладает противовирусной и противоопухолевой активностью; INF-γ – противовирусным, противопаразитарным и противоопухолевым действием, а также многочисленными иммуномодуляторными эффектами [181, 190, 356].

4. Цитокины – медиаторы воспаления, являются продуктами активированных Т-лимфоцитов и вызывают активацию лейкоцитов общевоспалительного назначения: INF-γ, IL-5, лимфотоксины [190, 356].

5. Противовоспалительные (иммуносупрессорные) цитокины. К ним относят IL-10 (продуцируемый макрофагами и ингибирующий макрофаги), ТФР-β (ингибирующий пролиферацию лимфоцитов), а также IL-4 и IL-13 – ингибирующие макрофаги [181, 190, 356].

Спектры биологических активностей цитокинов в значительной степени перекрываются: один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более чем одним цитокином [168, 190]. Во многих случаях в действиях цитокинов наблюдается синергизм. Так, антигенная стимуляция приводит к секреции цитокинов «первого поколения» – IL-1 и IL-6, TNF-α, которые индуцируют биосинтез центрального регуляторного цитокина IL-2, а также IL-3, IL-4, IL-5, INF-γ и др. В свою очередь цитокины «второго поколения» влияют на биосинтез ранних цитокинов. Такой принцип действия позволяет не только регулировать иммунный ответ, но и амплифицировать его, вовлекая в реакцию все возрастающее число клеток [190].

Основными клетками-продуцентами цитокинов иммунной системы являются Т-хелперы (Th) и макрофаги, которые выполняют главные функции в поддержке приобретенного и врожденного иммунитета [181, 190, 356]. В зависимости от спектра продуцируемых цитокинов Th делятся на 2 основных типа: Th1 и Th2. Th1-клетки продуцируют IL-2 и INF-γ. Ростовым фактором для Th1-клетки является IL-2, образующийся как в Th0-лимфоцитах, так и в самих Th1-клетках. Все цитокины, синтезируемые Th1-лимфоцитами, способствуют в основном развитию клеточных типов ответа (включая активацию $CD8^+$-лимфоцитов). Th2-лимфоциты синтезируют IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13 и потенцируют развитие гуморального иммунного ответа. Ростовыми факторами для этих клеток являются IL-2 и IL-4 [165, 168, 181, 190, 356, 448].

Известно, что IL-12 стимулирует образование Th1-клеток, повышает синтез INF-γ, подавляющего образование Th2-клеток. Кроме того,

сам INF-γ способен направлять дифференцировку Th0 в сторону Th1-клеток. При недостаточном уровне продукции IL-12 дифференцировка идет в сторону Th1-клеток, а продукт Th2-клеток – IL-10 – в свою очередь угнетает образование Th1-клеток. Таким образом, имеет место взаимный антагонизм Th1- и Th2-клеток [181, 190, 356].

Многочисленные исследования подтверждают, что баланс Th1/Th2 играет важную роль в регуляции иммунного ответа [142, 165, 168, 181, 190, 356, 357, 448, 517, 562], а нарушение баланса цитокинпродуцирующей активности Th1- и Th2-типа играет значительную роль в развитии аутоиммунных состояний, хронизации и прогрессировании заболеваний [190, 356, 530]. Так, если при инфекциях, вызванных внутриклеточными вирусами и микробами, произойдет переключение защитного клеточного иммунитета на гуморальный, то будет наблюдаться осложнение течения заболевания [190]. Иммунный ответ, обусловленный Th2-клетками, типичен для аллергических заболеваний [56, 165, 166, 168, 181, 190, 215, 287, 356, 450, 451, 536, 561]. Так, по данным H. Nakajima и K. Takatsu [536], в развитии и усилении аллергического воспаления при астме значительную роль играют цитокины, продуцируемые Th2-клетками, такие как IL-4, IL-5 и IL-13.

В последнее время широкое распространение получила «гигиеническая гипотеза», согласно которой современный образ жизни в больших мегаполисах и низкий контакт с микробными антигенами приводят к нарушению баланса цитокиновой регуляции и формированию Th2-типа иммунного ответа, предрасполагающего к развитию атопии [165, 190]. В связи с этим актуальными в настоящее время являются также исследования по изучению влияния химических факторов окружающей среды на регуляцию иммунного ответа [45, 75, 113, 116, 117, 269, 279, 297, 301, 459].

Так, по данным Г.М. Бодиенковой с соавт. [317], у лиц, работающих в условиях воздействия нейротропных веществ различной химической природы (паров металлической ртути, хлорированных углеводородов), и пациентов с хронической ртутной интоксикацией различной степени выраженности выявлена гиперпродукция IL-1β, IL-2, TNF-α на ранних этапах развития профессиональной нейроинтоксикации, что свидетельствует о напряжении компенсаторно-приспособительных механизмов, а снижение сывороточных концентраций про- и противовоспалительных цитокинов при нарастании тяжести клинических проявлений – о дисрегуляции в системе иммунитета.

При исследовании *in vitro* влияния газообразного формальдегида на эпителиальные клетки легких, интактные и обработанные TNF-α, обнаружилось, что в результате экспозиции формальдегидом произошло увеличение продукции IL-8 клетками, сенсибилизированными TNF-α, это показывает роль формальдегида как инициатора неспецифического воспаления [552].

Схема проведения исследования гаптениндуцированной экспрессии цитокинов приведена на рис. 12.

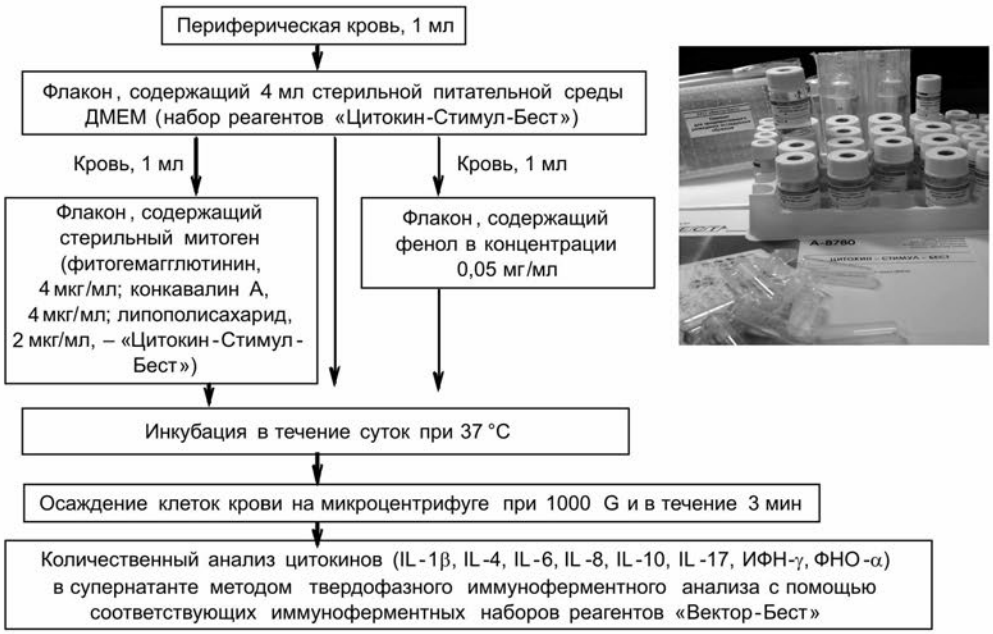


Рис. 12. Идентификация гаптениндуцированной экспрессии цитокинов

Процесс миграции нейтрофилов через слизистую полости рта на фоне воздействия предполагаемых аллергенов (гаптенов) у сенсибилизированных к ним лиц отражает неспецифическую реакцию. Обследованы пациенты с металлическими протезами, в состав сплава которых в виде микропримесей входили некоторые гаптены. Реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) проводилась с хромом, никелем, кобальтом, титаном, медью, цинком, золотом, серебром, палладием, магнием, марганцем и акрилом. Положительная или резко положительная РТМЛ чаще всего наблюдалась на титан, хром, никель, кобальт, медь, цинк, акрил. Реже отмечались положительные реакции на марганец, магний, палладий, серебро и золото. Эндогенную интоксикацию можно определить как

неспецифический синдром несоответствия между образованием и выведением продуктов нормального обмена и накоплением веществ нарушенного метаболизма в крови. В крови женщин с носительством марганца с увеличением возраста отмечено достоверное возрастание числа нейтрофилов и снижение числа лимфоцитов. Полученные данные об увеличении содержания олигопептидов в плазме и снижение их количества в эритроцитах, изменение числа нейтрофилов и лейкоцитов в крови женщин могут служить первыми признаками интоксикации марганцем.

Хром вызывает сенсибилизирующее действие. Установлена слабая корреляция между содержанием хрома в моче и IL-5 в сыворотке. Продукция IL-6 митогениндуцированными лимфоцитами у лиц, проживающих на территории с повышенным содержанием хрома, составила 64 % от выработки цитокина в контрольной группе. Отмечено повышение секреции IL-1 и TNF-α моноцитами/макрофагами после обработки липополисахаридами и хромом [448].

В кератиноцитах белых морских свинок шестивалентный хром может привести к увеличению образования АФК, активизации клеточной сигнализации и стимуляции высвобождения цитокинов ФНО-α и IL-1α – одних из главных участников в патогенезе контактной гиперчувствительности [549].

Трихлорэтилен и тетрахлорэтилен повышают выброс гистамина антигенстимулированными тучными клетками и базофильными лейкоцитами крысы в зависимости от дозы. Кроме того, увеличивается синтез IL-4 и TNF-α антигенстимулированными базофилами. Таким образом, под влиянием органических растворителей наблюдается модуляция иммунного ответа: увеличивается высвобождение гистамина и синтез провоспалительных цитокинов антигенстимулированными тучными клетками. Кроме того, воздействие трихлорэтилена и тетрахлорэтилена может привести к увеличению числа аллергических заболеваний [470].

R. Klein et al. [448] в своем обзоре описывают особенности цитокиновой регуляции у лиц, подвергшихся экспозиции различными металлами. При этом обнаружено, что никель вызывает продукцию цитокинов как Th1-типа (IFN-γ), так и Th2-типа (IL-5). Содержание хрома в моче коррелировало с содержанием сывороточных IL-2 и IL-5. При исследовании комбинированного влияния кобальта и хрома обнаружено повышение уровня TNF-α и снижение количества IL-6. Сульфат бериллия стимулирует выработку IL-2, IL-6, IL-10, IFN-γ и TNF-α лимфоцитами и активирует преимущественно Th1-клетки [448]. Согласно иссле-

дованиям других авторов, у детей с повышенной контаминацией биосред ванадием также наблюдается преобладание медиаторов Th1-типа (IFN-γ, TNF-α) [310].

Многочисленные исследования посвящены изучению влияния низкомолекулярных органических соединений на регуляцию иммунного ответа [17, 45, 147, 174, 207, 286]. Так, хлорорганические соединения вызывают дестабилизацию цитокиновой сети с преобладанием продукции Th2 медиаторов клеточной регуляции (IL-4, IL-6) и снижением проапоптических регуляторов клеточной гибели (TNF-α) [207].

Результаты клинических исследований доказывают, что фенолсодержащие соединения модифицируют иммунный ответ человека [17, 94, 95, 110, 116, 117, 128, 153, 206, 207, 364, 384, 574]. Ряд авторов утверждает, что в системе *in vitro* фенолы способны повышать продукцию IL-8 и снижать синтез IL-1β, IFN-γ иммуноцитами человека [94, 363, 367]. Фенолы ингибируют продукцию TNF-α, причем данный процесс является зависимым от времени и дозы воздействия гаптенов на клетки, где ключевая роль принадлежит блокированию NF-kB-активации, основного регулятора TNF-α-транскрипции в клетках иммунной системы [184, 363]. В эксперименте на мышах также выявлено, что обработка иммунокомпетентных клеток фенолом приводит к нарушению их функциональной активности, подавляя синтез провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α [161].

Нами проведено изучение влияния фенола на спонтанную и индуцированную митогенами продукцию цитокинов (рис. 13).

Примечание: * – достоверно по отношению к группе сравнения (p<0,05)

Рис. 13. Характеристика модулирующего действия фенола на показатели регуляции иммунной системы в условиях эксперимента *ex vivo (спонтанная продукция)*

Оценка спонтанной продукции цитокинов клетками периферической крови, характеризующая текущую активацию клеток иммунной системы, показала достоверное ($p<0,05$) повышение IL-1β, IL-6, IL-8 в 3,4; 4,1 и 5,8 раза соответственно у детей группы наблюдения по отношению к аналогичным показателям группы сравнения. При этом в группе наблюдения обнаружено достоверное ($p<0,05$) снижение спонтанной продукции IL-17, ФНО-α и ИФН-γ в 2,8; 1,9 и 2,6 раза соответственно по отношению к группе сравнения.

В совокупности полученные результаты свидетельствуют, что у детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия фенолов, наблюдается супрессия иммунного ответа с замедлением апоптотической активности лимфоцитов (снижение ФНО-α) и нарушением баланса цитокинпродуцирующей активности иммуноцитов, характеризующимся интенсификацией регуляции иммунного ответа за счет примитивных лейкоцитарных ростков (IL-1β, IL-8) и угнетением Th1-звена иммунитета (снижение ИФН-γ).

В рамках эксперимента установлены особенности механизма действия фенолов на иммунную регуляцию у детей. Выявлено цитокинстимулирующее влияние фенола в концентрации 0,05 мг/дм^3 в отношении как про-, так и противовоспалительных цитокинов. При этом фенол обладает более существенной способностью активировать синтез цитокинов при взаимодействии с клетками крови у детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия фенолов.

Фенолиндуцированная продукция IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 и ФНО-α у детей группы наблюдения (табл. 5) достоверно ($p<0,05$) оказалась выше спонтанного уровня продукции этих цитокинов в 59,4; 143,6; 10,7; 10,1 и 18,3 раза соответственно (см. рис. 14). У детей группы сравнения уровень стимулированной фенолом продукции цитокинов достоверно ($p<0,05$) превысил спонтанный уровень в 48,3 раза по отношению к IL-1β; в 117,2 раза – к IL-6; в 2,9 – к IL-8; в 8,5 – к IL-10; в 11,1 – к ФНО-α, что ниже аналогичных показателей, зарегистрированных в группе наблюдения, в 1,2; 1,2; 3,7; 1,2 и 1,6 раза соответственно. Индуцированная фенолом продукция IL-17 у детей группы сравнения была достоверно ($p<0,05$) выше его спонтанного уровня в 1,3 раза. При этом не обнаружено достоверных изменений фенолиндуцированной продукции этого цитокина у детей группы наблюдения (рис. 14). Не установлено достоверных изменений индуцированной фенолом продукции ИФН-γ в обеих группах (см. табл. 5).

Таблица 5

Характеристика модулирующего действия фенола на показатели регуляции иммунной системы в условиях эксперимента *ex vivo* *(спонтанная и индуцированная фенолом продукция)*

Показатель	Спонтанный уровень		Уровень, индуцированный фенолом		p^1	p^2	p^3	p^4
	Группа наблюдения (n=85)	Группа сравнения (n=30)	Группа наблюдения (n=85)	Группа сравнения (n=30)				
IL-1β	13,45 ± 2,90	4,00 ± 1,07	799,49 ± 133,29	193,10 ± 10,95	**0,003**	**0,0001**	**0,0001**	**0,001**
IL-6	65,30 ± 9,79	15,79 ± 5,09	9373,95 ± 970,08	1850,69 ± 307,58	**0,022**	**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**
IL-8	1900,62 ± 294,56	325,04 ± 79,83	20296,24 ± 1921,33	935,02 ± 203,51	**0,001**	**0,0001**	**0,010**	**0,0001**
IL-10	2,68 ± 0,76	2,07 ± 0,28	27,07 ± 4,85	17,52 ± 1,88	0,171	**0,0001**	**0,0001**	0,166
IL-17	1,40 ± 0,13	3,97 ± 0,15	**1,40 ± 0,19**	5,09 ± 0,24	**0,000**	0,290	**0,0001**	**0,0001**
ФНО-α	**5,00 ± 0,91**	9,51 ± 0,96	91,66 ± 8,67	105,39 ± 8,88	**0,001**	**0,0001**	**0,0001**	0,385
ИФН-γ	2,18 ± 0,49	5,60 ± 0,85	**3,07 ± 0,51**	7,85 ± 1,05	**0,001**	0,213	0,101	**0,0001**

Примечание:

p_1 – достоверность межгрупповых различий спонтанных уровней продукции цитокинов;

p_2 – достоверность различий спонтанного и индуцированного уровней продукции цитокинов у детей группы наблюдения;

p_3 – достоверность различий спонтанного и индуцированного уровней продукции цитокинов у детей группы сравнения;

p_4 – достоверность межгрупповых различий индуцированных фенолом уровней продукции цитокинов.

В крови детей группы наблюдения достоверно (p<0,05) по отношению к группе сравнения повышалась фенолиндуцированная продукция IL-1β, IL-6 и IL-8 в 4,1; 5,1 и 21,7 раза соответственно. При этом обнаружено статистически значимое (p<0,05) снижение стимулированной фенолом продукции IL-17, ИФН-γ в 3,6 и 2,6 раза соответственно, и не обнаружено достоверных изменений синтеза ФНО-α (см. табл. 5).

При исследовании комбинированного воздействия металлов (свинца, хрома, марганца) и органических соединений (формальдегида, фенола, метанола) у детей обнаружено повышение IL-4 при одновременном снижение IFN-γ, что указывает на преимущественный Th2-тип регуляции иммунного ответа [269].

Проведенные нами исследования по изучению митогеновой активации цитокинообразования, когда в качестве митогена выступает формаль-

дегид, показали повышенный уровень экспрессии IL-6 и ФНО-α. Причем индуцированная формальдегидом экспрессия IL-6 превышала аналогичную в условиях стимуляции универсальным митогеном (рис. 14).

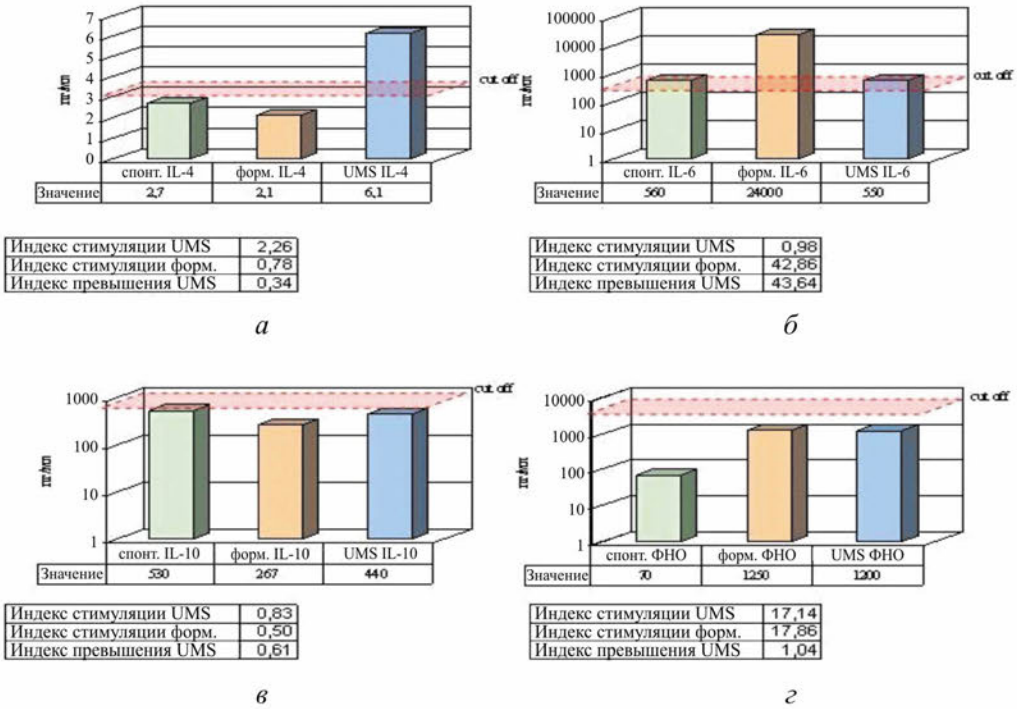


Рис. 14. Индуцированная формальдегидом и универсальным митогеном продукция: *а* – IL-4; *б* – IL-6; *в* – IL-10; *г* – ФНО-α

Таким образом, цитокины выполняют в организме важные регуляторные функции, а нарушение баланса цитокинпродуцирующей активности Th1- и Th2-типа играет значительную роль в развитии аутоиммунных состояний, хронизации и прогрессировании заболеваний. Особое внимание при изучении цитокиновой регуляции авторами уделяется и влиянию различных химических факторов окружающей среды, также вызывающих дисбаланс цитокиновой сети с преобладанием продукции Th1- или Th2-медиаторов клеточной регуляции, что свидетельствует о влиянии данных факторов на иммунокомпетентные клетки и развитие неадекватного иммунного ответа.

4.3. Факторы и механизмы сенсибилизации к гаптенам

Доказательством участия токсикантов в развитии аллергических заболеваний является выявление специфических аллергических антител и идентификация специфических реакций иммунокомпетентных клеток на антигены [10, 179, 382]. В качестве маркера реагинового механизма аллергических реакций используется уровень содержания иммуноглобулина Е. Измерение общего IgE в пробах крови является важным критерием в дифференциальной диагностике аллергических заболеваний. Однако только обнаружение диагностически значимых концентраций специфичных IgE указывает на участие конкретного химического аллергена в реакциях гиперчувствительности немедленного типа [106, 290].

Иммуноглобулин Е

IgE-гликопротеин с M_r 190 000 и коэффициентом седиментации 8S. Аналогично другим Ig, молекула IgE состоит из 4 цепей – 2 легких и 2 тяжелых. Тяжелые цепи ε-типа, определяющие классовую специфичность этого белка, содержат 5 доменов (1 в вариабельной и 4 в константных областях). При расщеплении папаином образуются Fc-фрагмент, содержащий 2 ε-Аг-детерминанты, и 2 Fab-фрагмента, в которые входят связывающие Аг участки. Третичная структура Fc-фрагмента обеспечивает способность молекулы к фиксации на FcεRI-рецепторе мембраны тучных клеток и базофилов [356].

Экспрессию FcεRII-рецептора (CD23) усиливает IL-4. Связывание IgE с FcεRII-рецептором приводит к активации многих эффекторных клеток [356].

Локализация IgE-продуцирующих плазматических клеток была изучена иммуногистохимически при помощи антител к Fc-фрагменту IgE. Продуценты IgE обнаружены в лимфоидной ткани миндалин, перибронхиальных и перитонеальных лимфатических узлах, а также непосредственно в слизистой оболочке дыхательных путей и кишечника, их редко находят в селезенке и подкожных лимфатических узлах [290].

Среднее значение общего пула IgE в кровотоке составляет 3,3 мкг на 1 кг массы тела, что существенно ниже общего пула циркулирующего IgG (500 000 мкг/кг) [290]. Период полувыведения IgE из кровотока – 2–3 суток при скорости продукции 2,3 мкг/кг/сут, период полужизни реагиновых антител в коже человека значительно выше – от 8 до 14 суток [290, 356]. Прямое определение тотального содержания IgE-антител

в крови по сравнению с фиксированными на поверхности базофилов IgE показало, что на каждую молекулу IgE, фиксированную на поверхности базофила, приходится от 100 до 4000 молекул IgE в циркуляции [290].

Регуляция синтеза IgE

Продукция IgE-антител требует кооперации Т- и В-лимфоцитов [179]. В-клетки становятся плазматическими – продуцентами IgE-антител, Т-клетки выполняют хелперную функцию; снижение Т-клеточной активности может привести к пролонгированной гиперпродукции IgE [179, 181]. Исходящие от Т-клеток сигналы специфичны по изотипу и предназначены для регуляции синтеза IgE [290]. В 1986 г. была продемонстрирована определяющая роль IL-4 для запуска синтеза IgE [372]. В регуляции этого процесса участвуют также антигены МНС, молекулы адгезии, FcεRII-рецепторы, а также IL-5 и IL-6 [356].

IL-4 действует на предшественники В-лимфоцитов, способствуя переключению синтеза тяжелых цепей на тип ε [290]. Наряду с IL-4 для включения ε-мРНК необходим второй сигнал, обеспечиваемый прямым контактом с $CD4^+$-Т-хелпером, а именно взаимодействие CD40-лиганда на активированных Т-клетках с рецептором для CD40 на В-клетках, примированных IL-4 [290]. Функциональным антагонистом IL-4 является γ-ИФН. Действуя на те же самые механизмы, он угнетает выработку IgE. Подавляют синтез IgE α-ИФН, трансформирующий фактор роста *p*, IL-8, IL-12 [290].

В процессе вторичного ответа на поверхности коммитированного В-лимфоцита происходят связывание аллергена с IgE, его интернализация и деградация, продукты которой затем представляются Т-клеткам в виде пептидов в комплексе с молекулами МНС класса II, способствуя последующему взаимодействию Т- и В-клеток, взаимному обмену цитокинами и сигналами межклеточного контакта и в конечном итоге усилению выработки аллергенспецифических IgE-АТ.

Роль IgE в норме и патологии

Плод человека приобретает способность вырабатывать IgE на 11-й неделе развития. Количество общего IgE в сыворотке пуповинной крови в момент рождения составляет от 13 до 202 нг/мл [290] и не коррелирует с содержанием IgE в сыворотке крови матери, подтверждая тот факт, что IgE не способен проходить через плаценту. У детей уровень IgE постоянно растет, достигая пика к 10–15 годам жизни.

Исследования содержания сывороточного IgE, проведенные у детей, показали значительные географические и этнические отличия: так,

в Швеции уровень IgE составлял в среднем 160 нг/мл, в Эфиопии – 860 нг/мл [290]. При исследовании содержания сывороточного IgE у больных атопическими заболеваниями и не страдающих ими лиц разного возраста (от 6 до 75 лет) было показано, что пик концентрации IgE приходился на 6–14 лет, постепенно снижаясь по мере увеличения возраста; у мужчин уровень IgE был выше, чем у женщин.

Обнаружение IgE-антител на поверхности тучных клеток, могущих выбрасывать гистамин и гепарин, указывает на контролирующую роль IgE в процессах микроциркуляции; тучным клеткам придается большое значение как участникам первой линии противомикробной защиты.

Наиболее детально исследована роль IgE-антител при паразитарной инфекции.

Как у детей, так и у взрослых, больных аллергическим ринитом и бронхиальной астмой, обусловленными внешними факторами, отмечена тенденция к повышению уровня сывороточного IgE [290]. Примерно у 50 % таких больных уровни общего IgE соответствуют величине, превышающей среднее значение в контрольной группе на 2 стандартных отклонения. Однако высокие уровни общего IgE, сопоставимые с выявляемыми у пациентов с поллинозом и атопической бронхиальной астмой (БА), обнаруживают и у здоровых лиц, в связи с чем уровень общего IgE в сыворотке не может служить специфическим чувствительным диагностическим тестом на наличие этих заболеваний.

Уровень общего IgE в сыворотке может быть значительно повышен при атопическом дерматите, коррелируя с тяжестью экземы и с наличием аллергического ринита, бронхиальной астмы или того и другого заболевания. У больных атопическим дерматитом без тяжелых кожных проявлений или сопутствующей бронхиальной астмы или поллиноза содержание IgE может не превышать нормы.

В результате всесторонних исследований регуляции продукции IgE получены данные, позволившие раскрыть иммунные механизмы атопического фенотипа [356]. Открыты 2 различных типа Т-хелперных клеток (Th1 и Th2) [356], различающихся по спектру вырабатываемых цитокинов: Th1-клетки вырабатывают IL-2, γ-ИФН и лимфотоксин, тогда как Th2-клетки продуцируют IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10. Именно с преобладанием у атопических индивидуумов Th2-клеток и продукцией IL-4 ассоциирована способность к гиперпродукции IgE, а с выработкой IL-5 – пролиферация и активация эозинофилов [356]. Th2-клеткам, вы-

деленным и клонированным из дыхательных путей больных атопической БА [356], отводится ведущая роль в поддержании хронического воспаления [166, 290, 356, 561].

Продуцируемые активированными Th2-клетками IL-4 и IL-10 наряду со стимуляцией IgE-ответа оказывают угнетающее действие на Th1-хелперы. При этом отменяется контроль последних за активностью Th2, осуществляемый посредством реципрокного действия γ-ИФН. Вместе с выработкой тучными клетками и базофилами IL-4 [356] это приводит к персистирующей гиперпродукции IgE при продолжающемся воздействии аллергена, что замыкает порочный круг заболевания.

Таким образом, возникновение IgE-ответа определяет формирование аллергенспецифической сенсибилизации (повышения чувствительности) тканей организма. Выражением такой сенсибилизации становится, при условии повторного (разрешающего) действия аллергена на сенсибилизированный организм, аллергенспецифическая воспалительная реакция тканей (органов) [88].

Итогом описанных процессов является формирование полноценного аллергенспецифического воспалительного ответа [88]. В зависимости от того, в каком органе или ткани произойдет встреча аллергена с фиксированными на клетках воспаления IgE-антителами, возникают характерные проявления, создающие клиническую картину аллергического заболевания: на конъюнктиве глаз – аллергического конъюнктивита с характерными симптомами зуда, слезотечения, светобоязни, на слизистой носа – аллергического ринита с симптомами обильного выделения слизи, зуда, чихания, заложенности носа, в бронхолегочном аппарате – бронхиальной астмы с признаками обратимого нарушения проходимости бронхов вследствие сокращения гладкой мускулатуры бронхов, отека слизистой, гиперсекреции слизи и закупорки ею просвета мелких бронхов, в поверхностных слоях кожи – аллергической крапивницы, в глубоких слоях дермы – отека Квинке и др. Если в реакцию одномоментно включается значительное количество эффекторных клеток аллергии, распределенных в разных тканях, то возникает общая системная реакция – анафилактический шок [88].

Итак, приведенные выше сведения иллюстрируют то, что IgE, возникший в ходе эволюции позже всех других классов иммуноглобулинов, имеет всю атрибутику общих закономерностей строения, запуска синтеза, сборки молекулы, механизмов регуляции, присущих другим

мономерным иммуноглобулинам [88]. Принципиальным эволюционным приобретением является появление в молекуле нового иммуноглобулина участка с высоким сродством к рецепторной структуре клеток воспаления. Это обеспечивает появление качественно новой формы реактивности, обладающей высокоспецифическим иммунологическим распознаванием чужеродного, с одной стороны, и универсальностью реакции воспаления в осуществлении функции отграничения зоны действия и элиминации повреждающего агента – с другой [88].

Измерение IgE

С открытием в 1967 г. IgE появилась возможность не только измерять количество общего IgE, но и оценивать содержание специфических IgE-антител как к комплексным, так и к очищенным аллергенам. Для количественного определения аллергенспецифических антител используют разнообразные методы, в основе которых лежит радиоаллергосорбентный тест (РАСТ), принцип которого заключается в следующем: ковалентно-связанный с твердофазными частицами (например, бумажными дисками) аллерген инкубируют с сывороткой больного, исследуемой на наличие специфичных в отношении данного аллергена IgE-антител. Находящиеся в сыворотке антитела связываются с аллергеном, фиксируясь на частицах твердой фазы. После тщательного отмывания к дискам добавляют меченные радиоактивным изотопом анти-IgE-антитела. Радиоактивность связанных анти-IgE-антител отражает количество специфического IgE, связанного с аллергеном. Результаты обычно выражают в единицах РАСТ или в международных единицах (МЕ), используя для этого стандартный препарат [106].

При исследованиях на больших группах больных показана статистически достоверная корреляция между результатами РАСТ, уровнем специфических IgE-антител и результатами кожных проб. Однако степень кожной чувствительности к аллергену у лиц с одинаковым уровнем общего IgE и специфических IgE-антител может существенно (до 100 раз) различаться.

Уровень IgE-антител в РАСТ коррелирует с провокационным тестом на реактивность бронхов, конечной точкой разведения в кожных пробах и выраженностью клинических симптомов. В последнее время отдается предпочтение основанным на принципе РАСТ методам с использованием анти-IgE-антител с флюоресцентной или ферментной меткой, что избавляет от необходимости использовать радиоактивные препараты.

Разработаны методы определения абсолютного количества аллергенспецифических IgE-антител [402].

По мере развития сенсибилизации и трансформации клинических проявлений аллергии у детей с атопией в зависимости от возраста поэтапно формируется «атопический марш». В формировании «атопического марша» обнаружен патогенетический вклад мутантной аллели 299Gly. В связи с этим можно рассматривать механизмы сенсибилизации при бронхиальной астме, аллергическом рините и атопическом дерматите как проявление единого процесса (рис. 15).

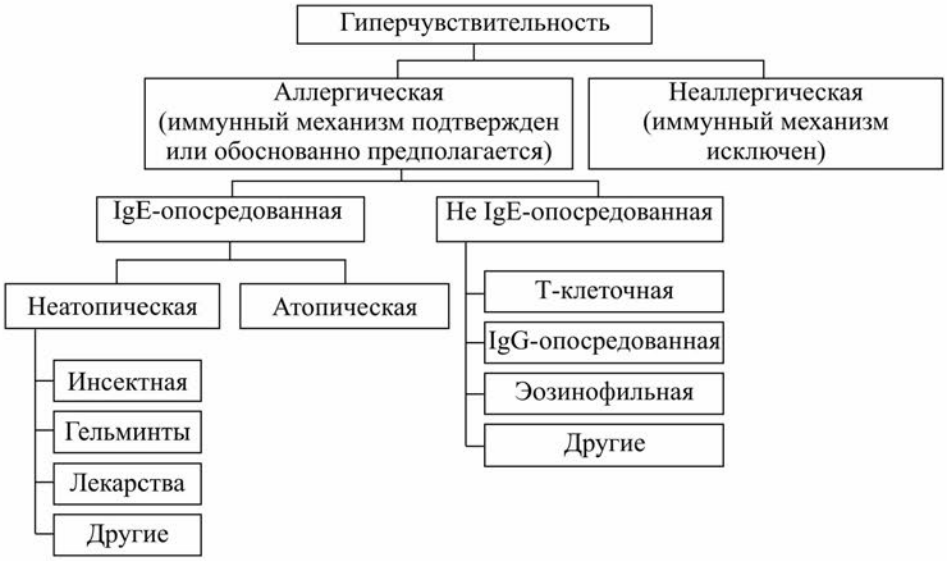


Рис. 15. Механизмы реализации гиперчувствительности

На органы, подвергшиеся данными заболеваниями – кожу и респираторный тракт и соответственно эпидермальный и слизистый покровы, контактирующие с внешней средой, представляющие собой естественные барьерные ткани, в первую очередь приходится химическая антигенная нагрузка. Существуют предпосылки для развития на данных участках аллергических процессов. Эпителиальные структуры индуцируют аллергический ответ путем увеличения проницаемости для аллергенов и гаптенов за счет изменения межклеточных контактов и эндоцитоза аллергенов; *in vitro* клетки эпителия бронхов при бронхиальной астме высокопроницаемы для аэроаллергенов; имеется наследственно обусловленное различие эпителия здоровых лиц и страдающих бронхиальной астмой (на примере изучения легкой астмы у детей). У лиц с атопическим дерматитом установлена повышенная проницаемость

эпидермального барьера, более выраженная на пораженных участках; происходит усиление реакции на разрешающее действие аллергена. Клетки эпителия осуществляют секрецию сигнальных молекул, ответственных за начало аллергического ответа. Продуцируя повышенный уровень триады цитокинов: тимического стромального лимфопоэтина – TSLP (Thymic stromal lymphopoieten), IL-25, IL-33, TSLP вызывает миграцию дендритных клеток в лимфоузлы; увеличивает пролиферацю Th2, вызываемую дендритными клетками; влияет на пролиферацию В-клеток. Таким образом, эпителий не может рассматриваться лишь как структурный барьер, необходимо учитывать его активную роль в патогенезе астмы и других аллергических заболеваний.

На клетках эпителия легких имеются Toll-подобные рецепторы (TLR). Их активация приводит к продукции цитокинов, развитию воспаления и аллергии. Существует «гигиеническая гипотеза», объясняющая повышенную распространенность аллергических заболеваний (в том числе и БА) в развитых странах меньшим воздействием микробных агентов и слабой стимуляцией Th1 в сравнении с Th2. Стимуляция TLR4 вызывает дифференцировку Th1. При стимуляции TLR клетки выделяют IL-12 и ИФНg. В промышленных зонах обнаруживается широкий, разнообразный спектр лигандов ксенобиотиков, которые, стимулируя TLR клеток, приводят к активации Th2. Эта активация ведет к развитию IgE-ответа и аллергии.

Пептидогликан через TLR2 стимулирует выделение из базофилов IL-4 и IL-13. На них выявлена высокая экспрессия TLR2 и TLR4 по сравнению с другими гранулоцитами. Предварительная обработка базофилов пептидогликаном усиливала секрецию ими гистамина, ЛТС4 и IL-4 в ответ на стимуляцию анти-IgE-антителами

4.3.1. Особенности сенсибилизации к низкомолекулярным соединениям

В литературе существуют разрозненные данные, касающиеся особенностей клинических проявлений и изменений клинико-лабораторных тестов при воздействии экологических, в частности, некоторых химических факторов на организм человека, в том числе формальдегида, не до конца отражающие картину интоксикации в условиях, когда происходит сближение эффекта воздействия производственных вредностей на работающих и людей, проживающих в непосредственной близости от производства [5, 73, 77, 264].

Из промышленных аллергенов существенную роль в возникновении сенсибилизации играют углеводороды, формальдегид, тяжелые металлы (рис. 16). По данным литературы, повышение IgE в крови установлено при контакте с бенз(а)пиреном, тяжелыми металлами, сернистым газом, формальдегидом [5, 100, 103]. Выявлена сенсибилизация к промышленным химическим аллергенам (хром, никель, формальдегид) у детей с атопической бронхиальной астмой [134, 158, 258].

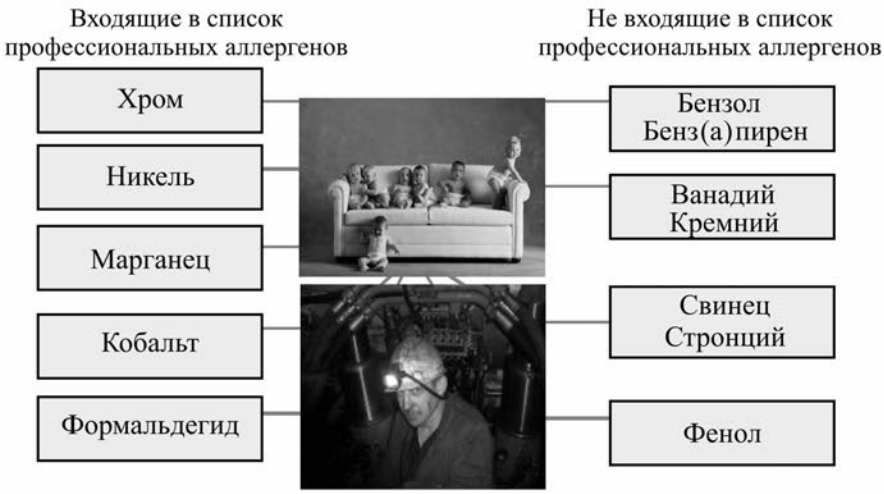


Рис. 16. Перечень гаптенов, вызывающих выработку специфических антител (IgE и IgG)

К ингаляционным веществам, реакция на которые опосредована иммунными механизмами, относятся соли платины, хрома и никеля [290].

Среди 200 известных к настоящему времени химических соединений, способных вызвать развитие аллергопатологии, большинство – высокомолекулярные (>3 кД) белки растительного, животного или микробного происхождения [427]. Низкомолекулярные химические соединения (гаптены) приобретают свойства полноценных аллергенов только в том случае, если они связываются с собственными белками организма [290, 546].

В эксперименте показана возможность формальдегида выступать в качестве иммуногена, образуя формальдегидно-белковые комплексы [290].

Часто упоминается формальдегид в качестве причины аллергопатологии и при воздействии в низких концентрациях (>1 %) [568]. Развитие респираторных аллергозов могут вызвать также глутаровый альдегид [436], этилендиамин (производство лаков и фотография), хлорамин, азокрасители [410], пиперазин и диметилэтаноламин.

Аналогичным иммунотропным эффектом обладают ароматические углеводороды (бензол) [27]. Ряд тяжелых металлов способны инициировать сенсибилизацию организма. Доказана аллергенность бериллия, кобальта, хрома, никеля, марганца. Избыточное содержание в организме металлов, в том числе тяжелых, органических и неорганических компонентов характеризует не только токсическое воздействие, ведущее к нарушению функции важнейших органов и систем, но и его специфическую сенсибилизацию (табл. 6). Так, нарушение баланса марганца, хрома, никеля, цинка обусловливает сенсибилизацию организма, формирующую в дальнейшем развитие аллергических реакций со стороны кожи, верхних дыхательных путей.

Таблица 6

Содержание низкомолекулярных химических соединений в крови детей с аллергопатологией

Показатель, мг/дм^3	Допустимый фоновый уровень	Контрольная группа $M \pm m$, $n = 47$	Исследуемая группа $M \pm m$, $n = 168$	Доля детей с повышенным уровнем контаминанта, %
Формальдегид	0,0050 ± 0,0014	0,003 ± 0,001	0,011 ± 0,001*	35,3
Хром	0,0194 ± 0,0015	0,010 ± 0,002	0,026 ± 0,002*	42,8
Марганец	0,0165 ± 0,0014	0,011 ± 0,001	0,025 ± 0,004*	32,1

Примечание: * – достоверная разница по отношению к фоновому уровню и контрольной группе.

Содержание тяжелых металлов и органических соединений в крови детей с аллергопатологией, проживающих в зоне экологического неблагополучия, повышено относительно контрольной группы, где таковое находилось в пределах фонового уровня

4.3.2. Участие иммунных механизмов в сенсибилизации к низкомолекулярным соединениям

В конце XX в. были выяснены иммунные механизмы воздействия ксенобиотиков. Соли металлов в легких вступают в контакт с легочной тканью и бронхолегочной лимфоидной тканью. Существует общая закономерность иммунотоксических реакций: воздействие многих ксенобиотиков на развивающийся организм в раннем онтогенезе ведет к изменениям тимуса и системы Т-лимфоцитов. При этом механизмы иммунотоксического действия тяжелых металлов включают: образование аддуктов ДНК, нарушение репарации ДНК; генотоксический эффект; изменение

молекулярной структуры мембранных рецепторов, антигенов, эпитопов лимфоцитов. Снижается число циркулирующих клеток с маркером дифференцировки CD16, повышается число CD8-лимфоцитов, повышается активность CD4-лимфоцитов субкласса Th2, а также уровень IgE в крови, снижается уровень циркулирующих CD25-лимфоцитов. До настоящего времени наблюдаются темпы роста аллергопатологии, связанной с гиперчувствительностью I типа, одной из причин которой называют воздействие экологических токсикантов [189]. Тяжелые металлы способны изменять структуру антигенных белков на пептидные фрагменты таким образом, что они могут связываться с молекулами II класса главного комлекса гистосовместимости (МНС) и активировать Th2-клетки, в результате чего возникает секреция IL-4, что обеспечивает необходимый сигнал для синтеза IgE (табл. 7).

Таблица 7

Особенности специфического реагинообразования у детей с БА, проживающих на промышленно развитой территории Пермского края

Показатель	Фоновый уровень (МЕ/мл), *M±m*	Содержание (МЕ/мл), *M±m*	Обследуемые с повышенным уровнем, %
$IgE_{спец.}$ к формальдегиду	2,11 ± 0,501	2,81 ± 1,089	48,0
$IgE_{спец}$к марганцу	1,21 ± 0,380	1,53 ± 0,357	45,0
$IgE_{спец}$ к хрому	1,01 ± 0,192	1,20 ± 0,496	41,0

Примечание: в крови детей с аллергопатологией, проживающих в зоне экологического неблагополучия, содержание IgE специфического к формальдегиду, хрому и марганцу повышено относительно фонового уровня.

У больных аллергическим хейлитом при проведении аппликационных накожных тестов в качестве аллергена был выявлен марганец.

В качестве биомаркеров воспалительного процесса анализировали уровень металлов в мокроте у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями легких. Марганец был повышен при бронхиальной астме и бронхоэктатической болезни. В нефтегазодобывающем регионе потенциальный риск, связанный с водным фактором, для здоровья подростков представляет марганец [376].

В сердечной мышце при высоких дозах токсический эффект убывает в ряду Pb > Cd > Zn > Hg > Cu > Mn, однако при концентрации, всего в два раза превышающей нормальную, наиболее выраженное токсическое действие оказывает ртуть, марганец и цинк. Высокая токсичность металлов в действии на основную функцию митохондрий (синтез легкодоступного для использования источника энергии АТФ) обусловлена стимулированием тяжелыми металлами утечки протонов, снижая тем самым эффективность окислительного фосфорилирования [398].

Наибольшую роль в возникновении сенсибилизации к металлическим протезам играют содержащиеся в них гаптены (никель, хром, кобальт, марганец). Они становятся антигенами только после соединения с белками тканей организма. В результате образуются так называемые конъюгированные антигены (табл. 8).

Таблица 8

Уровень специфической сенсибилизации детского населения при комбинированной техногенной нагрузке (г. Нижний Тагил)

Показатель	Физиологическая норма	Группа сравнения (n = 57)	Группа наблюдения (n = 113)
IgE спец. к марганцу, МЕ/см³	0–1,21	1,148 ± 0,579	1,135 ± 0,372
IgE спец. к никелю, МЕ/см³	0–1,55	1,014 ± 0,349*	0,308 ± 0,083
IgE спец. к формальдегиду, МЕ/см³	0–1,5	1,01 ± 0,628	1,207 ± 0,416**
IgG спец. к бенз(а)пирену, усл. ед.	0–0,3	0,122 ± 0,074	0,134 ± 0,038
IgG спец. к ванадию, усл. ед.	0–0,11	0,127 ± 0,062	0,143 ± 0,037**
IgG спец. к бензолу, усл. ед.	0–0,15	0,187 ± 0,093	0,143 ± 0,031**
IgG спец. к фенолу, усл. ед.	0–0,13	0,049 ± 0,054	0,147 ± 0,049*/**

Внутри клетки Cr (VI) разлагается до трехвалентного хрома Cr (III). Трехвалентный хром, присоединяясь к протеинам, создает гаптены, которые включают иммунную реакцию, после чего чувствительность к хрому не пропадает. В этом случае даже контакт с текстильными изделиями, окрашенными хромсодержащими красками, или с кожаными, обработанной хромом, может вызвать раздражение кожи. Витамин С и другие агенты реагируют с хроматами и создают Cr (III) внутри клетки [563].

Вдыхание аэрозолей металлов (например, хрома, ванадия, никеля, железа) является причиной изменений функции клеток иммунной системы и снижения местной противобактериальной защиты. Вариации степени вызванной иммуномодуляции зависели не только от количества металла, накопленного в легких, но и от специфического соединения.

Если специфичность соединения определяет иммуномодулирующее действие, то из этого следует, что физико-химические свойства металлов могут играть роль в вызываемом воздействии. Особенностью иммуномодулирующего потенциала любого соединения металла при местном воздействии являются его окислительно-восстановительная реакция, валентность и/или растворимость. Используя изменения местной противобактериальной защиты в качестве основного показателя, количественно определили различия иммунотоксического потенциального воздействия на легкие соединений хрома (insoluble calcium chromate (VI), and soluble sodium chromate (VI), potassium bis (dipicolinato) chromate (III) and sodium bis (dipicolinato) chromate (II)). Результаты показали, что среди последних трех соединений шестивалентный хром (Cr (VI)), будучи сильным окислителем, оказывает самое выраженное воздействие на антибактериальную защиту, в то время как востанавливающее двухвалентное и слабореактивное трехвалентное соединения хрома не оказывали эффекта при одинаковом уровне воздействия. Нерастворимый Cr (VI) оказывал более сильное влияние, чем его растворимая форма. Анализ данных в контексте предварительного заражения легких хромом показал, что не было значительных различий в иммуномодулирующем действии обоих соединений Cr (VI); тем не менее комплексы металлов с различной степенью окисления вызывали разный ответ организма, свидетельствуя, что различное воздействие может быть обусловлено их окислительно-восстановительной реакцией. Определенные физико-химические свойства, вероятно, являются важными для иммунотоксического действия в легких (например, его окислительно-восстановительная реакция является более критичной по сравнению с его растворимостью). Полученные данные объясняют, почему определенные металлы могут иметь больший риск для здоровья человека, чем другие, даже при одинаковом содержании в организме.

Провокационный бронхиальный тест подтвердил диагноз профессиональной астмы вследствие воздействия хрома.

В результате исследования местных и системных иммунных ответов у мышей, подвергшихся воздействию солей хрома, обнаружен специфический IgE к соединениям хрома при профессиональном контакте.

Формальдегид связывает белки и нуклеиновые кислоты, образуя аддукты, которые трудно устранить в результате обмена веществ. У детей даже небольшие количества формальдегида могут инициировать и поддерживать атопический дерматит, симптомы астмы [413].

Газообразный формальдегид, кроме его раздражающего действия, приводит к IgE-опосредованной сенсибилизации. Поскольку дети более чувствительны к токсичным веществам, чем взрослые, пороговые уровни формальдегида в помещении должны быть снижены для детей.

У пациентов, находящихся на диализе и имеющих длительный контакт с формальдегидом, входящим в состав обрабатывающих препаратов, были обнаружены в небольшом числе случаев специфические IgE [404].

В ряду веществ, представляющих опасность для развития астмы, формальдегид имеет индекс опасности 1 [548].

Доза-реакция человеческой иммунной системы может быть определена с помощью индукции на экспериментальных моделях, таких как динитрохлорбензол (DNCB). Эта доза-реакция отражает эффект увеличения концентрации сенсибилизатора на фиксированной области.

В исследовании на мышах показано, что повторная аппликация 2,4-dinitrofluorobenzene (DNEB) вызывала Th1-зависимую гиперчувствительность замедленного типа. Это подтвердилось высоким уровнем экспресси IFN-γ и IL-2 mRNA в поврежденной коже. После пятого применения аллергена в течение одного часа развилась Th2-зависимая гиперчувствительность немедленного типа с высоким уровнем экспресси IL-4 и IL-5 mRNA и CD-40 в шейных лимфатических узлах, что коррелировало с повышением уровня гаптенспецифического IgE в сыворотке. Пролиферация В-лимфоцитов привела к появлению mRNA в шейных лимфоузлах и селезенке. Контактный аллерген вызвал явления кожной контактной аллегии и аллегии немедленного типа с продукцией гаптенспецифического IgE без вовлечения респираторной системы.

В 26 % случаев астмы у лиц, контактирующих с низкомолекулярными химическими соединениями, были обнаружены специфические IgE к гаптену-протеину. Изучается механизм воздействия гаптенов на клетку [548].

4.3.3 Диагностика специфической сенсибилизации к низкомолекулярным химическим соединениям

При диагностике принципиально важно выявить механизмы, приводящие к развитию аллергических реакций: необходимо выяснить, связано ли заболевание с IgE-опосредованными иммунными механизмами или речь идет о неспецифическом высвобождении медиаторов, или раздражающем эффекте веществ, оказывающих стимулирующее влияние

на парасимпатическую систему через ноцицептивные рефлексы [290]. Для ответа на эти вопросы используют данные эпидемиологических исследований, а также выявление антигенспецифических IgE- или IgG-антител [290].

Специфическими маркерами воздействия на организм химических веществ являются модифицированные белки (комплексные антигены), антигаптенные антитела, а также продукты их взаимодействия (специфические иммунные комплексы). В промышленной токсикологии в настоящий момент известна система тестов *in vitro* с химическими аллергенами, высокая информативность которых определяется не только их чувствительностью и специфичностью, но и возможностью количественной характеристики интенсивности иммунного ответа организма на воздействие ксенобиотиков. Важно подчеркнуть, что одно из основных условий постановки тестов *in vitro* – это использование гаптенов в высоких разведениях (по сравнению с действующими по токсическому эффекту), что с современных позиций можно объяснить биорезонансным механизмом усиления специфического волнового взаимодействия гаптена и белковых структур. Система тестов *in vitro* является ценной как для практики токсикологии (гигиеническое нормирование промышленных аллергенов в окружающей среде и классификация промышленных химических аллергенов), так и для установления экологической обусловленности аллергических заболеваний. Системы тестов *in vitro* позволяют выявлять специфические белковые структуры, модифицированные различными иммунотоксическими агентами (например, тяжелыми металлами), причем с высокими титрами на фоне вторичного иммунодефицита [437]. Причем запуск гиперчувствительности к гаптенам происходит не только в условиях «иммуногенного утяжеления» его белком, но при обязательном удвоении стимуляционного сигнала на гипервариабельном комплементарном гаптену участке IgE или IgG (рис. 17).

Однако положительные результаты лабораторной диагностики указывают только на наличие специфических IgE-антител к аллергену, а не свидетельствуют о наличии у больного аллергического заболевания [106].

Лабораторные методы диагностики заболеваний, в основе которых лежит гиперчувствительность немедленного типа, основаны на определении аллергенспецифических IgE-антител [202, 341]. В последнее время вместо радиоактивной метки (РАСТ) чаще используют фермент или флюоресцентное вещество (ФАСТ). Последние модификации привели к снижению себестоимости и уменьшению времени, затра-

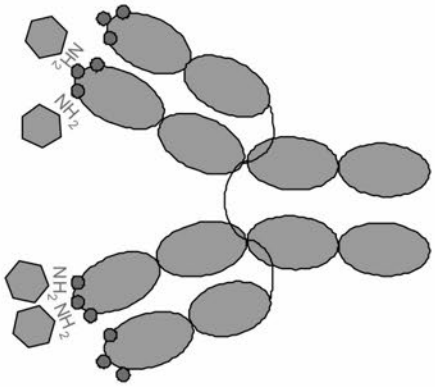


Рис. 17. Механизм гиперчувствительности к гаптенам, имеющим в своем составе аминогруппу

чиваемого на проведение теста, позволяя получить ответ уже через 6–7 ч. Спектр аллергенов, выявляемых с помощью этих методов, весьма широк и составляет у отдельных фирм 150 наименований и более, включая аллергены различных клещей, в том числе домашней пыли и амбарных, плесневых грибов, аллергенов животных, пыльцы различных растений, пищевых продуктов, промышленных аллергенов, лекарственных препаратов. Если предполагаемый антиген относится к гаптенам, его конъюгируют с белковыми носителями (например, сывороточным альбумином) и используют для кожных тестов или аллергосорбентного анализа с ферментной меткой [401].

При трактовке результатов лабораторных тестов возникают те же проблемы, что и при кожном тестировании. Кроме того, при использовании тест-систем от различных фирм могут быть получены несовпадающие результаты. Исследования сопоставимости результатов кожного тестирования, оцениваемых по конечной величине разведения аллергена и РАСТ, показали достаточно высокую степень корреляции [401, 457, 538].

Существуют определенные клинические ситуации, при которых лабораторная диагностика аллергии выходит на первый план. К ним относятся:

- невозможность отмены на время тестирования медикаментов, прежде всего антигистаминных препаратов, постоянное применение которых делает невозможным постановку кожных проб;
- чрезмерно высокая чувствительность больных к аллергену и, как следствие, высокий риск развития системных реакций;

- ложноположительные реакции, обусловленные дермографизмом;
- обширные кожные поражения;
- тяжелые аллергические реакции (например, анафилактический шок) в анамнезе, а также развитие системных аллергических реакций при предыдущем тестировании (прежде всего при лекарственной и инсектной аллергии);
- обследование в период обострения заболевания.

К недостаткам метода следует отнести высокую стоимость обследования.

РАСТ, равно как и другие приемлемые методы лабораторной диагностики аллергии, относится к методам исследования, успешно дополняющим аллергологический анамнез и кожное тестирование [401].

После сбора анамнеза и объективного обследования следует провести кожное тестирование для определения спектра причинно-значимых аллергенов. Для правильной интерпретации результатов кожных тестов необходимо учитывать, что у пациентов с аллергозом положительные результаты могут быть получены не только с клинически значимыми аллергенами. РАСТ применяют и с диагностической целью [401, 513, 543]. Специфические IgE-антитела обнаружены и в носовых секретах больных сезонным аллергическим ринитом [401].

Выявлена четкая корреляция между уровнем IgE-антител в секрете, сыворотке крови и выраженностью кожных тестов. Это наблюдение подтверждает то обстоятельство, что вне зависимости от места синтеза аллергенспецифические IgE-антитела равномерно распределены в коже, слизистой оболочке носа и сыворотке больных респираторным аллергозом.

Диагностика аллергенспецифических IgG- и IgE-антител к профессиональным аллергенам важна не только для обнаружения уже развившейся аллергопатологии, но и для выявления лиц с повышенным риском развития заболевания.

Для выявления лиц, склонных к развитию аллергозов, полезны профилактические иммунологические обследования в динамике [179].

Важность учета химической структуры соединения, его способности соединяться с белками, образовывать конъюгаты, участвовать в процессах иммуносорбции как *in vivo*, так и *in vitro*, с образованием прочных ковалентных связей, связаны не только с представлениями об иммунологии аллергического процесса, но и с прикладными аспектами проблемы и прежде всего – с разработкой и реализацией способов идентификации сенсибилизирующего действия простых и сложных химических соедине-

ний [12, 296]. Вопросы специфической аллергодиагностики в этом контексте представляются особенно важными.

В настоящее время специалистами в области прикладной аллергологии большое внимание уделяется вопросам разработки диагностических систем как для использования их в научно-исследовательских целях, так и для задач лабораторной диагностики в практическом здравоохранении [12]. Основное внимание специалистов в этой области сфокусировано на способах перевода исследуемого аллергена в твердую фазу, что достигается применением методических приемов, в основе которых лежат процессы иммуносорбции и конъюгации. Иммуносорбенты и конъюгаты, широко используемые в технологии иммуноферментного анализа, являются основным инструментом приготовления специфических диагностикумов и идентификации на их основе специфических антител [353] (рис. 18).

Рис. 18. Аллергосорбентная тест-система для идентификации специфических антител к формальдегиду

Нами разработана оригинальная каскадная технология изготовления белково-полисахаридного иммуносорбента с конъюгированием гаптена для идентификации специфических антител к металлам и органическим соединениям (Способ оценки сенсибилизации к металлам-аллергенам: патент РФ на изобретение № 2185626 от 20.07.2002 г.; Способ количественного определения специфических иммуноглобулинов G к конъюгату формальдегид-сывороточный человеческий альбумин в сыворотке крови: патент РФ № 2473908 от 27.01.2013 г.). Метод модифицированного конкурентного иммуноферментного анализа изложен в МР 111-14/55-04-02.

Использование технологии аллергосорбентного теста позволяет идентифицировать специфическую чувствительность к профессиональным аллергенам (специфический IgE к хрому, никелю, марганцу, фор-

мальдегиду, специфический IgG к бенз(а)пирену, ванадию, стронцию, свинцу, бензолу, фенолу, хлороформу), повысить эффективность диагностики, лечения и профилактики заболеваний, ассоциированных с профессиональными и внешнесредовыми экспозициями (рис. 19).

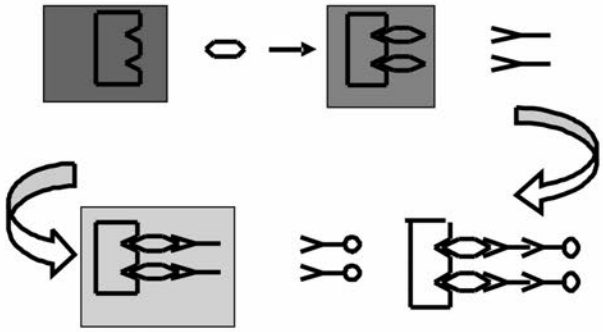


Рис. 19. Схема проведения аллергосорбентного тестирования

Методология выполнения тестирования на идентификацию специфической чувствительности к гаптенам

На нитроцеллюлозной подложке производят конъюгацию тестируемого химического вещества с белком, в качестве контроля – 0,5 % раствор хлорида натрия. В дальнейшем происходит инкубация исследуемой сыворотки с антигенными комплексами, сорбированными на нитроцеллюлозной подложке, и связывание Fab-фрагментов специфических антител человека. На втором этапе иммуноферментного анализа для образования классического «сэндвича» в опытный и контрольный образец вносят конъюгированные с пероксидазой хрена моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека с последующим конкурентным связыванием специфических антител к химическому веществу со специфическими участками вариабельных доменов Fab-фрагментов моноклональных антител. После промывки лунок фосфатным буфером и проявления окраски посредством добавления хромогенного субстрата останавливают реакцию стоп-реагентом и проводят удаление отработанных подложек, осуществляют фотометрическое измерение и регистрацию оптической плотности в опытном и контрольном образцах. Сопоставляют их с оптической плотностью стандартных образцов с известной концентрацией иммуноглобулина G к белку куриного яйца. Для получения таких стандартных образцов параллельно изготовляют калибровочные диски, на которые конъюгировались образцы с известным

содержанием человеческих антител IgG к белку куриного яйца. Используют стандартные образцы IgG, конъюгат, хромогенный субстрат и стоп-реагент из набора реагентов для определения общего IgG[1].

Нами проведены исследования 113 организованных детей (посещающих детские сады) в возрасте от 3 до 7 лет, проживающих на территрии техногенной эндемии (тяжелые металлы), и 146 детей, проживающих на территории, для которой характерна экспозиция органических загрязнителей. Группу контроля составили 57 детей, сопоставимых по полу и возрасту, не подвергающихся воздействию изучаемых химических факторов среды обитания и проживающих на условно чистой территории, где не зарегистрировано превышения гигиенических нормативов качества атмосферного воздуха и воды.

IgE, специфический к формальдегиду, хрому, марганцу, определяли методом аллергосорбентного тестирования с ферментной меткой согласно методическим рекомендациям «Способы диагностики сенсибилизации к низкомолекулярным химическим соединениям», утвержденными департаментом Госсанэпиднадзора Минздрава России № 111-14/55-04-02 (2002). Идентификация специфических иммуноглобулинов осуществлялась с использованием конъюгированных с пероксидазой антител «Vedalab» (Франция).

Установлены допустимые и отражающие специфическую сенсибилизацию уровни содержания специфических реагинов и антител класса G к гаптенам, конъюгированным с белковым носителем (табл. 9).

Проведенные исследования содержания специфических антител к стронцию у детского контингента на территории стронциевой геохимической провинции Пермского края позволили выявить превышение референтного уровня и показателя в контрольной группе более чем в 3,0 раза. Частота регистрации проб специфических антител к стронцию с отклонением от физиологической нормы в сторону повышения у детей обследуемой группы составляет 78,0 % и достоверно превосходит контрольную.

При изучении состояния здоровья детского населения, проживающего на территории, эндемичной по содержанию тяжелых металлов в воде водоемов, установлен достоверно повышенный по сравнению с возрастной нормой уровень специфической сенсибилизации к марганцу по критерию IgE

[1] Инструкция по применению набора реагентов IgG общий – ИФА-БЕСТ А 8662, ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия.

Таблица 9

Результаты скрининговой специфической аллергодиагностики детского населения промышленной зоны Пермского края

Показатель	Физиологическая норма	Группа сравнения (n=57)	Группа наблюдения (n=113)
IgE спец. к марганцу, МЕ/см^3	0–1,21	1,118 ± 0,579	1,135 ± 0,372
IgE спец. к никелю, МЕ/см^3	0–1,55	0,308 ± 0,083	1,014 ± 0,349*
IgE спец. к формальдегиду, МЕ/см^3	0–1,5	1,01 ± 0,628	1,207 ± 0,416**
IgG спец. к бенз(а)пирену, усл. ед.	0–0,3	0,122 ± 0,074	0,134 ± 0,038
IgG спец. к ванадию, усл. ед.	0–0,11	0,127 ± 0,062	0,143 ± 0,037**
IgG спец. к бензолу, усл. ед.	0–0,15	0,187 ± 0,093	0,143 ± 0,031**
IgG спец. к фенолу, усл. ед.	0–0,13	0,049 ± 0,054	0,147 ± 0,049*/**

Примечание: * – достоверные межгрупповые различия (p<0,05);
** – достоверные различия с нормой (p<0,05).

(содержание специфического IgE к марганцу – 1,14 ± 0,48 МЕ/мл при норме <1,21) (p<0,05), а также к хрому по критерию IgE (содержание специфического IgE к хрому – 2,84 ± 0,91 усл. ед. при норме <1,0) (p<0,05). Причем содержание специфических антител к хрому у детского контингента достоверно превышало аналогичный уровень в контрольной группе в 2,2 раза.

4.3.4. Участие неиммунных механизмов в сенсибилизации к гаптенам

В основе мембранопатологического действия ксенобиотиков лежит повреждение мембранных рецепторов нейромедиаторов, гормонов, интерлейкинов и других сигнальных молекул межклеточного взаимодействия, нарушение структуры мембран клеток, митохондрий и лизосом. В результате формируется деструкция липидов клеточных мембран, приводящая к высвобождению медиаторов воспаления и аллергии (простагландинов, лейкотриенов и др.), развитию IgE-независимых ответов.

В основе возникновения гиперреактивности бронхов при бронхиальной астме лежит такой же механизм инактивации фермента АФК, что и при развитии обструктивного синдрома. Не случайно у больных бронхиальной астмой в выдыхаемом воздухе повышено содержание перокси-

да водорода и оксида азота. Избыток их в легких способен частично инактивировать ферменты, оказывающие влияние на тонус гладкой мускулатуры бронхов. Весь вопрос в том, что это за фермент? Наиболее подходящим на подобную роль представляется Na, K-АТФаза гладкомышечных клеток бронхов. Частичная инактивация данного фермента приведет к повышению содержания ионов натрия в цитозоле миоцитов и появлению обусловленной этой причиной гиперчувствительности к констрикторным и, напротив, резистентности к дилататорным влияниям [12].

Биомаркеры БА: биомаркеры мочи (цистеинил-лейкотриены мочи были идентифицированы как потенциальный маркер ответной реакции на антагонисты лейкотриеновых рецепторов, особенно у пациентов, не переносящих аспирин: больные с уровнем LTE4 200 пг/мг или выше в 3,5 раза лучше отвечают на лечение монтелукастом, чем те, у кого этот показатель меньше 200; аналогичная картина наблюдалась в исследовании, проведенном на детях, когда при уровне LTE4 100 пг/мг ответ на лечение монтелукастом улучшался в 3,2 раза; несмотря на результаты этих исследований, определение цистеинил-лейкотриенов в моче не получило широкого распространения), оксид азота в выдыхаемом воздухе, конденсат паров выдыхаемого воздуха (атравматичный метод оценки воспаления в дыхательных путях; основными маркерами, определяемыми с помощью этого метода, при БА являются аденозин, маркер оксидантного стресса – перекись водорода, изопростан, NO, pH, аммиак, простаноиды и лейкотриены), мокрота (клетки мокроты, супернатант мокроты, бронхоальвеолярный лаваж, щеточная биопсия [535].

Генетический полиморфизм и влияние экологических факторов, таких как воздействие табачного дыма, могут лежать в основе снижения ожидаемого эффекта антилейкотриеновой терапии блокаторами лейкотриеновых рецепторов.

Проводилось изучение взаимосвязи экологических факторов, патогенеза и клинического течения бронхиальной астмы у детей. Доказано, что в условиях экологических нагрузок у детей активизируется Th2-звено иммунитета, увеличивается содержание в крови IL-4, ЛТС4 и общего IgE.

Нами проведено изучение состояния сенсибилизации, ассоциированное с альтернативными механизмами ее развития у детей с БА. Установлен высокий уровень как реагиновой, так и лейкотриеновой сенсибилизации, однако уровень лейкотриенов значимо отличался от сравниваемой когорты обследуемых (<0,05) (табл. 10).

Ниже представлены результаты когортного исследования 854 детей, проживающих на территориях с различным уровнем загрязнения воздуха и питьевой воды. Скрининг с использованием стандартного протокола (ISAAC) выявил наличие симптомов бронхиальной астмы (БА) в анамнезе у 11,0 ± 1,1 % опрошенных. Этот показатель в экологически компрометированных зонах был в 1,5 раза выше, чем в контрольных (p<0,05), в городе – в 2 раза выше, чем на селе (p<0,001).

Таблица 10

Уровни классической и альтернативной сенсибилизации экспонированного гаптенами детского населения с аллергопатологией

Показатель	Референтный интервал	Контрольная группа, $M \pm m$	Исследуемая группа, $M \pm m$
Лейкотриены LTC4/D4/E4, пг/мл	40,0 – 200,0	241,2 ± 30,1	346,7 ± 39,4
IgE общий , МЕ/мл	<100,0	277,0 ± 21,7	314,5 ± 45,6

Примечание: при повышенной нагрузке химическими соединениями содержание медиаторов аллергических реакций и антител в исследуемой группе выше, чем в контрольной группе.

Установлено, что воздействие аэрополлютантов проявляет максимальный риск формирования БА и способствует более тяжелому ее течению у подростков (RR = 3,4; 95 % IC: 1.6–7.3; p<0,001), а употребление некачественной питьевой воды, провоцируя первый шаг «атопического марша» – экзему, повышает вероятность развития астмы у детей до 10 лет (RR = 6,4; 95 % IC: 1,1–35,9; p<0,001). Доказано, что в условиях экологических нагрузок у детей активизируется Th2-паттерн иммунитета: развивается Т-клеточный дефицит ((0,97 ± 0,1)10^9/л, p<0,001) с повышением индекса Th/Ts (p<0,001), увеличивается содержание в крови IL-4 (30,9 ± 7,1 пг/мл, p<0,05), ЛТС4 (35,2 ± 5,7 нг/мл, p<0,01) и общего IgE (354,8 ± 64,6 МЕ/мл, против 164,6 ± 37,2 МЕ/мл в группе контроля, p<0,01).

Таким образом, при бронхиальной астме, аллергическом рините, атопическом дерматите существует воспалительный субстрат для синтеза лейкотриенов – как результат иммунного, раннего и позднего, повреждения мембран под действием токсинов.

4.3.5. Аллергические реакции на гаптены, ассоциированные с метаболитами арахидоновой кислоты

Арахидоновая кислота и ее метаболиты (простагландины, лейкотриены, тромбоксаны, простациклины) влияют на экспрессию генов лимфоцитов, а также являются непосредственными эффекторами многих реакций в клетках иммунной системы [329]. Основным источником эйкозаноидов выступает незаменимая арахидоновая (цис-5, 8, 11, 14-эйкозатетраеновая) кислота, синтезируемая во всех клетках организма. Эйкозаноиды подразделяются на две основные группы: 1) простаноиды – включают в себя простагландины, простациклины и тромбоксаны; 2) лейкотриены. Особой группой эйкозаноидов является анандамид, связывающийся со специфическими (каннабиноидными) рецепторами мозга [323]. Активация клеток токсинами, аллергенами, брадикинином и продуктами иммунных реакций, изменяющими типы и геометрическую ориентацию фосфолипидов в мембране и активирующими фосфолипазу А2, приводит к освобождению арахидоновой кислоты с последующим метаболизмом по циклооксигеназному или липоксигеназному пути. Ген ALOX5 с локализацией 10q11.2, ответственный за синтез арахидонат 5-липоксигеназы, является геном-кандидатом бронхиальной астмы [60]. Метаболизм арахидоновой кислоты по первому пути ведет к образованию простагландинов (PG) и тромбоксанов (Tx) с помощью основного фермента PGH-синтетазы. Фермент имеет две изоформы: циклооксигеназу-1 (COX-1) и циклооксигеназу-2 (COX-2), которые обладают в основном однотипной последовательностью аминокислот и опосредуют соответственно физиологические и воспалительные процессы. COX-1 присутствует в тромбоцитах, эндотелиальных клетках, слизистой желудка, почках и т.д. В нормально функционирующих клетках гидролиз мембранных липидов с высвобождением арахидоновой кислоты происходит на довольно низком уровне. COX-2 синтезируется *de novo*, главным образом в макрофагах, но также в легких, сердце, сосудах и селезенке при стимуляции клеток бактериальными эндотоксинами или цитокинами в ходе аллергических реакций. В результате происходит массивное неконтролируемое образование простаноидов (PGD2, PGE2, PGF2a, TxA2, PGI2), реализующих свое действие с помощью рецепторов на мембранах клеток различных тканей. Выделены три группы рецепторов к простагландинам в трахеобронхиальном отделе респираторного тракта: рецепторы *X* отвечают за спазмогенный эффект, *Y*-рецепторы обеспечивают ре-

лаксацию гладкой мускулатуры бронхиального дерева, а активация *w*-рецепторов вызывает ирритативное действие и кашель. В клетках после связывания рецепторами простагландинов изменяется содержание ц-АМФ и ц-ГМФ, что сопровождается определенными реакциями. Так, ТхА2 уменьшает продукцию ц-АМФ, следствием чего является выраженное сокращение гладкой мускулатуры бронхов и повышение сосудистого тонуса. PGF2a и PGD2 увеличивают продукцию ц-ГМФ, что ведет к увеличению выхода Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума и, как следствие, к бронхоконстрикции [122]. Простагландины в низких концентрациях модулируют нормальные физиологические процессы, а в высоких вызывают воспалительные реакции.

Таким образом, при бронхиальной астме, аллергическом рините, атопическом дерматите имеются условия для синтеза лейкотриенов: существует воспалительный субстрат, где осуществляется иммунный – ранний и поздний – синтез и происходит повреждение мембран под действием токсинов, химических агентов и свободнорадикального окисления (рис. 20).

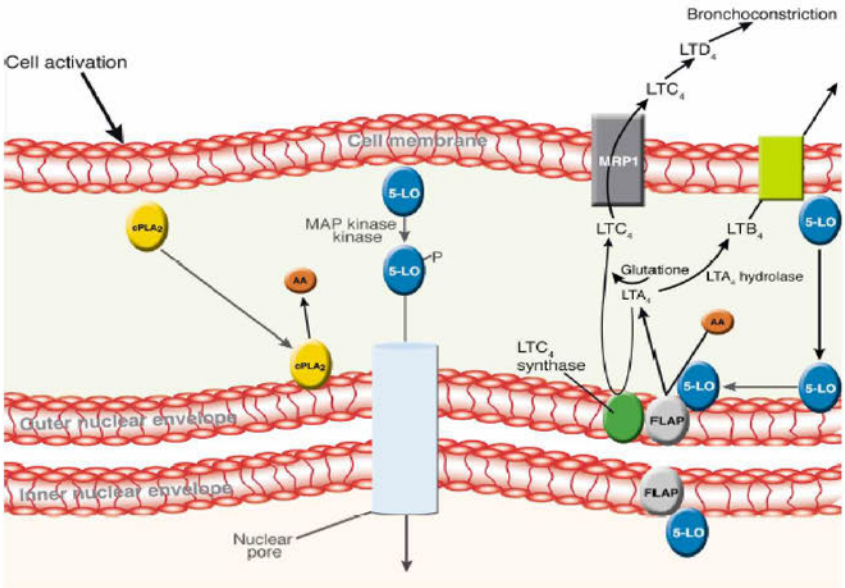


Рис. 20. Участие лейкотриенов в процессе бронхоконстрикции

Синтез лейкотриенов при атопическом дерматите представляет собой многокомпонентный процесс, существует несколько источников образования арахидоновой кислоты. В кожных покровах происходит

активный метаболизм жирных кислот. Эпидермис гиперчувствительной кожи более проницаем для воды, чем эпидермис кожи с нормальной чувствительностью, а повышенная проницаемость рогового слоя позволяет водорастворимым аллергенам, микробам, их токсинам и прочим достичь клеток эпидермиса и вызвать активацию иммунной системы, а затем – дисбаланс механизмов регуляции иммунного ответа и развития неконтролируемых иммунных реакций. Токсины вызывают разрушение клеточных мембран, высвобождение входящих в ее состав фосфолипидов, арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот, из которых при участии макрофагов и других клеток иммунной системы начинается бурный синтез простагландинов (простагландиновый каскад) и лейкотриенов, играющих важную роль в развертывании аллергических реакций, специфического воспаления, сопровождающегося разрушением клеточных и молекулярных связей с образованием свободных радикалов (преимущественно кислорода) и гидропероксидов жирных кислот. Свободнорадикальное окисление (СРО) или/и перикисное окисление липидов (ПОЛ) приводит к разрушению эпидермальных клеток, образованию в эпидермисе еще большего количества свободных радикалов, снижению активности основных ферментов антиоксидазной системы, при которой супероксиддисмутаза, производящая избыточное количество H_2O_2, блокирует деятельность каталаз и начинает выступать в качестве прооксиданта, катализирующего реакции образования свободных радикалов. В качестве аллергенов могут выступать самые различные вещества: красители, животные белки, витамины, антибиотики, компоненты эфирных масел и прочее, а также низкомолекулярные гаптены (формальдегид, ионы металлов), которые становятся аллергенами, связываясь с белками кожи. Другая группа реакций представляет собой ответ на прямое повреждение тканей цитотоксическими веществами (консервантами, ПАВ, свободными радикалами, микробными токсинами) и соответствует картине контактного дерматита. Таким образом, дерматит представляет собой аллергическую реакцию вследствие сенсибилизации организма или является реакцией неаллергической гиперчувствительности с выбросом медиаторов воспаления в ответ на повреждающее внешнее воздействие. Простагландины в низких концентрациях модулируют нормальные физиологические процессы, а в высоких вызывают воспалительные реакции. Наблюдается нарушение кератинизации, изменение метаболических процессов в клетках дермы. При аллергическом рините определяется массивная инфильт-

рация слизистой носовой полости эозинофилами, тучными клетками, активированными плазматическими клетками, в результате после сенсибилизации специфическими агентами происходит IgE-опосредованное высвобождение медиаторов воспаления, таких как гистамин, лейкотриены, брадикинин [123].

В период обострения БА и при хроническом течении развивается бронхиальная гиперреактивность в слизистой оболочке бронхов, обнаруживается инфильтрация клетками (эозинофилы, тучные клетки, макрофаги, лимфоциты), которые продуцируют целый ряд медиаторов, в том числе лейкотриены. Лейкотриены способствуют мобилизации и активации воспалительных клеток. Ключевая роль цистеиниловых лейкотриенов заключается в развитии спазма гладкой мускулатуры дыхательного тракта, выработке аллергениндуцированной гиперсекреции слизи, утолщении базальной пластинки и развитии субэпителиального фиброза легких, в совокупности приводящих к ремоделированию дыхательных путей. Доказано, что лейкотриены повышают тонус бронхиальной мускулатуры человека в сотни раз сильнее, чем ацетилхолин и гистамин [304]. Отмечены существенные сдвиги в уровнях лейкотриенов при различной степени тяжести заболевания, в частности, повышение ЛТС4 у больных легкой и ЛТЕ4 у больных тяжелой БА [350]. Во время приступа бронхиальной астмы происходит постоянная активация синтеза лейкотриенов, что подтверждается одинаковой эффективностью зилеутона (ингибитора 5-липоксигеназы, фермента, инициирующего начальный этап синтеза) и антагонистов лейкотриеновых рецепторов (Cys-LTRI), реализующих конечные эффекты лейкотриенового каскада. Наличие хронического воспаления дыхательных путей обусловливает постоянное образование лейкотриенов [545].

Таким образом, при бронхиальной астме, аллергическом рините, атопическом дерматите имеются условия для синтеза лейкотриенов: существует субстрат, где осуществляется синтез лейкотриенов как медиаторов аллергической реакции немедленного типа и как метаболитов, образующихся в результате повреждения мембран при позднем аллергическом воспалении, а также при действии токсинов, химических агентов и при свободнорадикальном окислении.

Взаимосвязь лейкотриеновой сенсибилизации с ксенобиальной нагрузкой

Проводилось изучение взаимосвязи экологических факторов, патогенеза и клинического течения бронхиальной астмы у детей. Дока-

зано, что в условиях экологических нагрузок у детей активизируется Th2-звено иммунитета, увеличивается содержание в крови IL-4, ЛТС4 и общего IgE.

Разработана модель для изучения псевдоаллергических реакций, которая теоретически была основана на способности конканавалина А высвобождать из тучных клеток и базофильных лейкоцитов мышей медиаторы воспаления без участия реакции «антиген – антитело». Поливалентный лектин конканавалин А обладает полифункциональным механизмом действия, активируя не только высвобождение гистамина, но и лейкотриенов из тучных клеток и базофилов [275].

Эйкозаноиды являются регуляторами материальных носителей сообщений, обеспечивающих развертывание реакций «неспецифического патогенеза». Цитокины, молекулы клеточной адгезии и эйкозаноиды названы «китами», на которых стоит «неспецифический» патогенез; они взаимодействуют: цитокины вызывают через посредство эйкозаноидов экспрессию молекул клеточной адгезии при самых разных патологических процессах и заболеваниях.

4.3.6. Сравнительный анализ общей реагиновой и лейкотриеновой сенсибилизации

Для изучения вклада медиторов обмена арахидоновой кислоты в аллергопатогию в условиях влияния токсикантов были проведены исследования по определению их количественных характеристик, распределения и взаимосвязи с показателями иммунитета (табл. 11).

Таблица 11

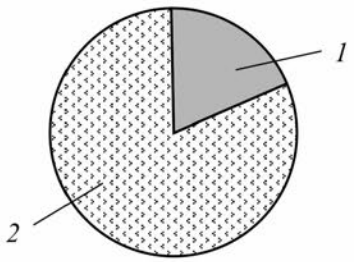
Содержание и распространенность лейкотриенов LT C4/D4/E4 и IgE общего у обследуемых

Показатель	Контрольная группа ($M \pm m$, $n = 47$)	Доля детей с уровнем контаминации, не превышающим референтный, %	Исследуемая группа ($M \pm m$, $n = 168$)	Доля детей с уровнем контаминации, превышающим референтный, %
Лейкотриены LTC4/D4/E4, пг/мл	241,2 ± 30,1	53,2	346,7 ± 39,4	70,2
IgE общий, МЕ/мл	277,0 ± 21,7	59,6	314,5 ± 45,6	58,9

Количественная оценка лейкотриенов LTC4/D4/E4 показала, что при повышенной гаптенной контаминации их содержание в исследуемой группе выше, чем в контрольной, в 1,44 раза; при этом распростра-

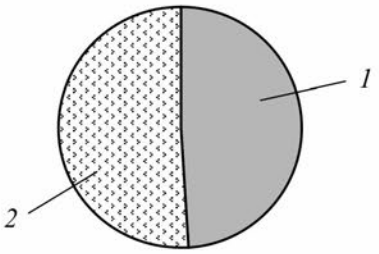
ненность их также увеличивается – с 53,2 до 70,2 % (см. табл. 7). Зависимость уровня и распространенности IgE общего от содержания низкомолекулярных химических соединений в контрольной и исследуемой группах отсутствует.

Проведена оценка вклада лейкотриенов (LTC4/D4/E4) и реагинов (IgE) в объективный статус аллергизации по соотношению их содержания и распространенности в зависимости от уровня контаминантной нагрузки (рис. 20).



1 – одновременное увеличение содержания IgE общего и LTC4/D4/E41– 34,0 % – одновременное превышение референтных уровней LT; C4/D4/E4 (372,3 ± 49,3) и IgE (467,1 ± 63,5);
2 – 66,0 % – изолированное превышение референтных уровней или LT C4/D4/E4 (329,8 ± 55,5) или IgE (129,6 ± 33,1)

а



1 – 49,0 % – одновременное превышение референтных уровней LT C4/D4/E4 (233,4 ± 35,0) и IgE (241,9 ± 36,1);
2 – 51,0 % – изолированное превышение референтных уровней или LT C4/D4/E4 (258,6 ± 27,5) или IgE (239,5 ± 38,4)

б

Рис. 20. Соотношение распространенности лейкотриеновой (LTC4/D4/E4) и реагиновой (IgE) сенсибилизации: *а* – фоновая контаминация формальдегидом, хромом или марганцем (n = 47); *б* – превышение фоновой контаминации формальдегидом, хромом или марганцем (n = 168)

Выявлена различная динамика распространенности показателей аллергического ответа в зависимости от гаптенной нагрузки: при допустимом уровне контаминации биосред наблюдается одновременное превышение референтных уровней LT C4/D4/E4 и IgE у 19,1 % обследуемых, а при повышенном уровне гаптенов – у 48,8 % (рис. 27). В остальных случаях в обеих группах ответ на гаптенную нагрузку происходит либо по IgE-зависимому, либо по лейкотриеновому пути. Таким образом, число случаев аддитивного воздействия лейкотриенов и сенсибилизирующих иммуноглобулинов при повышенной контаминации больше в 2,27 раза, чем при ее допустимом уровне.

Проведена количественная оценка одновременно воздействующих показателей, имеющих уровень выше референтного: при отсутствии гаптенной нагрузки (19,1 % случаев) значения LT C4/D4/E4 составили 333,4 ± 35,0 пг/мл, IgE – 402,9 ± 36,1 МЕ/мл, а в условиях контаминации формальдегидом, хромом или марганцем (48,8 %) – 416,3 ± 49,3 пг/мл и 523,1 ± 63,5 МЕ/мл соответственно.

При ответе на гаптенную нагрузку либо по лейкотриеновому, либо по IgE-зависимому пути определяются следующие значения: в группе с допустимым содержанием токсикантов, происходящем в 80,9 % случаев, определены концентрации LTC4/D4/E4 – 258,6 ± 27,5 пг/мл и IgE – 285,5 ± 38,4 МЕ/мл (между ними имеется достоверная обратная зависимость (p<0,05)) (рис. 21), а в группе с повышенным содержанием формальдегида, хрома или марганца (51,2 %) – либо повышение LT C4/D4/E4 – 258,8 ± 55,5 пг/мл, либо повышение IgE – 171,6 ± 33,1 МЕ/мл.

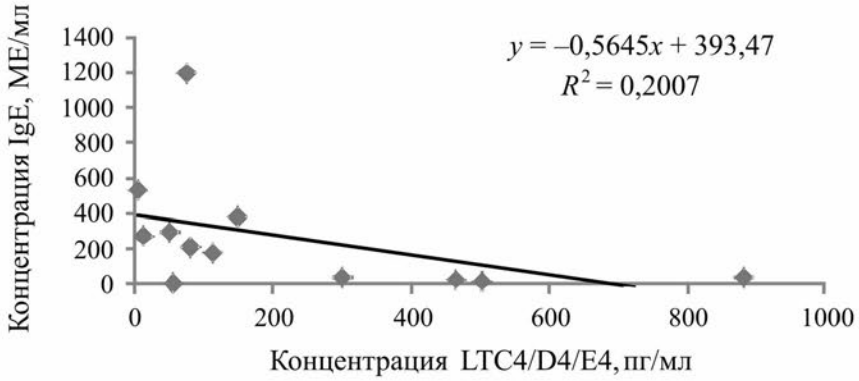


Рис. 21. Зависимость концентрации лейкотриенов LTC4/D4/E4 от уровня IgE общего при допустимом уровне контаминации

Отмечается увеличение концентрации лейкотриенов и IgE при аддитивном воздействии по сравнению с концентрацией либо одного, либо другого показателя: в группе с допустимой гаптенной нагрузкой лейкотриены LTC4/D4/E4 увеличены в 1,29 раза, IgE общий – в 1,41 раза; в группе с повышенной гаптенной нагрузкой лейкотриены увеличены в 1,61 раза, IgE – в 3,06 раза (p<0,05).

В условиях содержания как допустимого, так и высокого уровня контаминантов у обследуемых с содержанием IgE общего в пределах референтных значений наблюдается повышенный уровень липидных медиаторов, что указывает на лейкотриеновый тип гиперреактивности (табл. 12).

Таблица 12

Уровень лейкотриенов LT C4/D4/E4 при различных уровнях содержания IgE общего у обследуемых

Показатель	Контрольная группа ($M \pm m$, n = 47)		Исследуемая группа ($M \pm m$, n = 168)	
	Содержание в пределах референтного уровня ($M \pm m$, n = 19)	Уровень выше референтного ($M \pm m$, n = 28)	Содержание в пределах референтного уровня ($M \pm m$, n = 69)	Уровень выше референтного ($M \pm m$, n = 99)
IgE общий, МЕ/мл	27,5 ± 4,7	471,0 ± 131,6	35,4 ± 7,3	483,6 ± 55,1
Лейкотриены LTC4/D4/E4, пг/мл	403,5 ± 101,4	114,9 ± 38,4	326,6 ± 76,0	310,7 ± 44,3*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

При уровне IgE общего, превышающем референтные значения, концентрация лейкотриенов LTC4/D4/E4 находится в зависимости от контаминантной нагрузки: соответствует референтному уровню при допустимом содержании низкомолекулярных химических соединений и увеличена в 2,70 раза в условиях повышенной контаминации (p<0,05), что показывает влияние гаптенов на синтез медиаторов аллергии. В группе с повышенным уровнем контаминации IgE-зависимые формы гиперчувствительности сочетаются с неиммунными механизмами, что усиливает сенсибилизацию.

Таким образом, повышенный уровень гаптенной контаминации приводит к преимущественно аддитивному (суммационному) эффекту воздействия, характеризующемуся одновременным проявлением как реагинового, так и аллерготоксического или медиаторного механизмов аллергических реакций.

4.3.7. Особенности специфической реагиновой и лейкотриеновой сенсибилизации у детей к формальдегиду, марганцу, хрому

Проведено изучение влияния низкомолекулярных химических соединений (формальдегида, марганца, хрома) на тип иммуного ответа и синтез эйкозаноидов. В табл. 9 показаны результаты анализа содержания специфических антител класса Е к гаптенам у детей исследуемой группы в сравнении с контролем (табл. 13). Установлено превышение

содержания IgE специфического к формальдегиду, марганцу и хрому в сыворотке крови исследуемой группы как по отношению к референтной концентрации, так и в сравнении с группой контроля (в 4,3; 14,1; 2,6 раза соответственно).

Таблица 13

Содержание и распространенность IgE специфического в крови детей, мг/дм^3

Показатель	Референтный уровень ($M \pm m$)	Контрольная группа ($M \pm m$, $n = 47$)	Исследуемая группа ($M \pm m$, $n = 168$)	Количество детей с уровнем, превышающим референтный, %
IgE специфический к формальдегиду	2,11 ± 0,501	0,60 ± 0,29	2,60 ± 1,18	27,3
IgE специфический к марганцу	1,21 ± 0,712	0,13 ± 0,05	1,84 ± 0,48	40,9
IgE специфический к хрому	1,01 ± 0,192	0,44 ± 0,17	1,15 ± 0,49	22,7

Проведен анализ уровня и распространенности специфической реагиновой и лейкотриеновой сенсибилизации и их соотношения в отношении каждого из анализируемых гаптенов.

В табл. 14 и на рис. 22 представлены результаты изучения содержания специфических антител класса Е к формальдегиду и лейкотриенов у детей исследуемой группы по критерию уровня содержания самого гаптена в крови.

Концентрация лейкотриенов и IgE специфического при повышенном содержании формальдегида (0,018 ± 0,002 мг/дм^3) достоверно выше, чем аналогичные показатели IgE при фоновом содержании формальдегида в крови – в 2,63 раза ($p<0,05$).

Таблица 14

Содержание лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE в крови обследуемых с фоновым и повышенным уровнем формальдегида

Показатель	Допустимый уровень формальдегида, (0,003 ± 0,001), $n = 51$	Высокий уровень формальдегида, (0,018 ± 0,002), $n = 58$
Лейкотриены C4/D4/E4, пг/мл ($M \pm m$)	302,2 ± 38,2	372,6 ± 53,7
IgE общий, МЕ/мл ($M \pm m$)	211,7 ± 44,6	201,6 ± 54,5
IgE специфический, МЕ/мл ($M \pm m$)	1,68 ± 0,59	4,42 ± 0,70

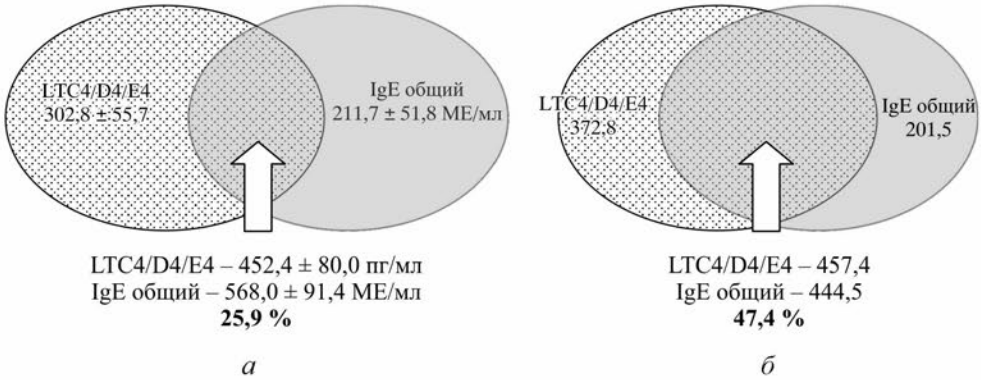


Рис. 22. Концентрация и распространенность лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE: *а* – при фоновом содержании формальдегида; *б* – при содержании формальдегида, превышающем фоновый интервал

В табл. 15 и на рис. 23 представлены результаты изучения содержания специфических антител класса Е к марганцу и лейкотриенов у детей исследуемой группы по критерию уровня содержания самого гаптена в крови.

Концентрация лейкотриенов и IgE специфического к марганцу при повышенном содержании марганца достоверно выше, чем аналогичные показатели при фоновом содержании марганца в крови ($p<0,05$). При этом уровень лейкотриенов повышен в 1,36 раза, тогда как содержание специфических антител в 14,2 раза превышает аналогичные показатели детей с фоновым содержанием марганца в крови.

В табл. 16 и на рис. 24 представлены результаты изучения содержания специфических антител класса Е к хрому и лейкотриенов у детей исследуемой группы по уровню содержания самого гаптена в крови.

Таблица 15

Содержание лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE в крови обследуемых с фоновым и повышенным уровнем марганца

Показатель	Фоновый уровень марганца ($M \pm m$, $n = 69$)	Уровень марганца, превышающий фоновый ($M \pm m$, $n = 33$)
Лейкотриены C4/D4/E4, пг/мл	268,3 ± 30,3	364,3 ± 51,7*
IgE общий, МЕ/мл	247,7 ± 33,9	306,3 ± 61,1
IgE специфический, МЕ/мл	0, 13 ± 0,05	1,84 ± 0,48*

Примечание: * – достоверное различие с фоновым уровнем.

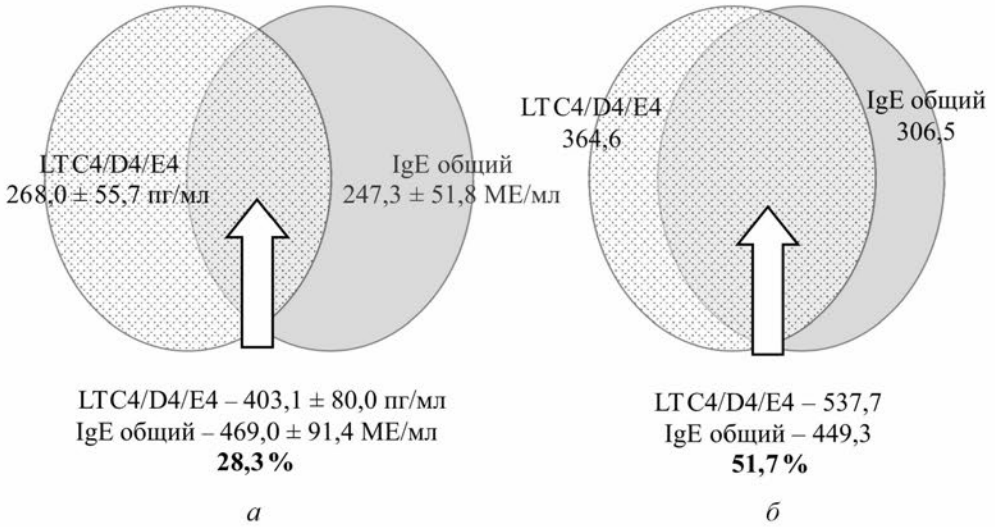


Рис. 23. Концентрация и распространенность лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE: *а* – при фоновом содержании марганца; *б* – при содержании марганца, превышающем фоновый интервал

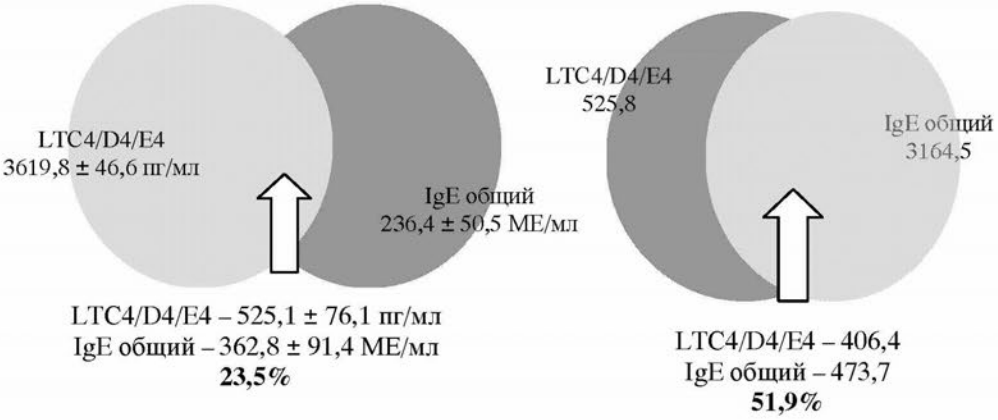
Таблица 16

Содержание лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE в крови обследуемых с фоновым и повышенным уровнем хрома

Показатель	Фоновый уровень хрома (0,011 ± 0,001), $n = 56$	Повышенный уровень хрома (0,037 ± 0,006), $n = 37$
Лейкотриены C4/D4/E4, пг/мл ($M \pm m$)	362,1 ± 36,3	525,2 ± 40,5
IgE общий, МЕ/мл ($M \pm m$)	236,9 ± 40,0	316 ± 49,0
IgE специфический, МЕ/мл ($M \pm m$)	0,331 ± 0,207	1,155 ± 0,530

Концентрация лейкотриенов и IgE специфического к хрому при повышенном содержании хрома достоверно выше, чем аналогичные показатели при фоновом содержании марганца в крови ($p<0,05$). При этом уровень лейкотриенов повышен в 1,45 раза, тогда как содержание специфических антител в 3,5 раза превышает аналогичное у детей с фоновым содержанием хрома в крови.

При анализе распространенности показателей, характеризующих ведущие специфические и неспецифические механизмы аллергического ответа в зависимости от уровня контаминации биосред, установлена закономерность: у детей с повышенной концентрацией хрома, марганца,



а *б*

Рис. 24. Концентрация и распространенность лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE: *а* – при фоновом содержании хрома; *б* – при содержании хрома, превышающем фоновый интервал

формальдегида наблюдается достоверное одновременное увеличение содержания IgE общего и LTC4/D4/E4 (в 47; 51 и 52 % случаев) по сравнению с таковыми у детей, имеющих допустимый уровень содержания химических аллергенов (в 23; 29 и 28 % случаев). Аддитивность эффекта указывает на одновременное участие в развитии аллергической реакции на техногенные аллергены различных механизмов аллергического повреждения тканей – как реагинового при реализации классического иммунного механизма гиперчувствительности немедленного типа, так и альтернативного лейкотриенового, когда гаптены оказывают непосредственное аллерготоксическое действие на клеточную мембрану.

4.3.8. Индукция лейкотриеновой сенсибилизации *in vitro*

Изучение в эксперименте влияния гаптенов и митогенов на продукцию медиаторов (лейкотриены, цитокины) – LTE4, LTC4, LTD4, IL1-β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, α-TNF в плазме, а также оценка секреции данных цитокинов проводились путем активации мононуклеарных клеток цельной крови *ex vivo* токсикантами (формальдегид, марганец, хром) и комплексом митогенов (PHA, ConA, LPS) методом ИФА.

В табл. 17–19 и на рис. 25 представлены результаты экспериментального изучения содержания основных классов лейкотриенов в режиме спонтанной и индуцированной секреции, причем стимуляция проводилась как с использованием универсальных митогенов, так и митогенов техногенного происхождения – формальдегида, марганца и хрома в их референтных концентрациях.

Таблица 17

Спонтанный и индуцированный уровень лейкотриенов LTC4/D4/E4 в эксперименте с нагрузкой формальдегидом в референтной концентрации

Показатель	Допустимое содержание формальдегида (0,003 мг/дм^3), n = 9	Повышенное содержание формальдегида (0,016 мг/дм^3), n = 8	p
LT C4/D4/E4 спонтанные	424,0 (270,4–468,7)	190,5 (156,8–203,7)	0,04
LT C4/D4/E4 USM-индуцированные	492,7 (296,9–880,1)	483,8 (279,5–524)	>0,05
LT C4/D4/E4 формальдегид-индуцированные	330,3 (181,3–540,5)	385,7 (310,2–532.2)	>0,05

Таблица 18

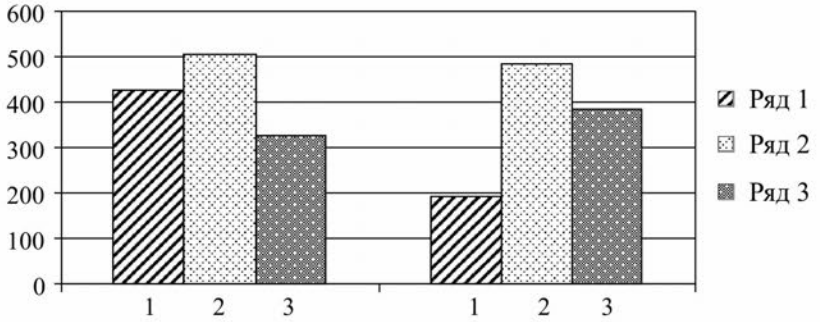
Спонтанный и индуцированный уровень лейкотриенов LTC4/D4/E4 в эксперименте с нагрузкой хромом в референтной концентрации

Показатель	Допустимое содержание хрома (0,008 мг/дм^3), n = 8	Повышенное содержание хрома (0,041 мг/дм^3), n = 10	p
LT C4/D4/E4 спонтанные	137,8 (124,1–181,4)	434,3 (396,1–463,8)	0,01
LT C4/D4/E4 USM-индуцированные	505,0 (364,9–863,2)	391,6 (226,4–558,9)	>0,05
LT C4/D4/E4 хроминдуцированные	327,1 (228,2–420,0)	655,4 (322,5–853,3)	0,09

Таблица 19

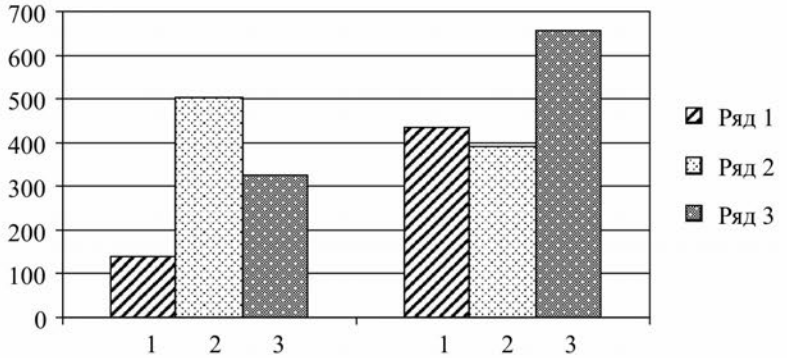
Спонтанный и индуцированный уровень лейкотриенов LTC4/D4/E4 в эксперименте с нагрузкой марганцем в референтной концентрации

Показатель	Допустимое содержание марганца (0,014 мг/дм^3), n = 12	Повышенное содержание марганца (0,028 мг/дм^3), n = 6	p
LT C4/D4/E4 спонтанные	212,5 (139,5–435,2)	406,2 (139,5–444,6)	>0,05
LT C4/D4/E4 USM-индуцированные	499,8 (187,8–650,5)	481,0 (364,9–511,8)	>0,05
LT C4/D4/E4 марганециндуцированные	358,2 (141,4–503,5)	543,6 (486,0–731,0)	0,04



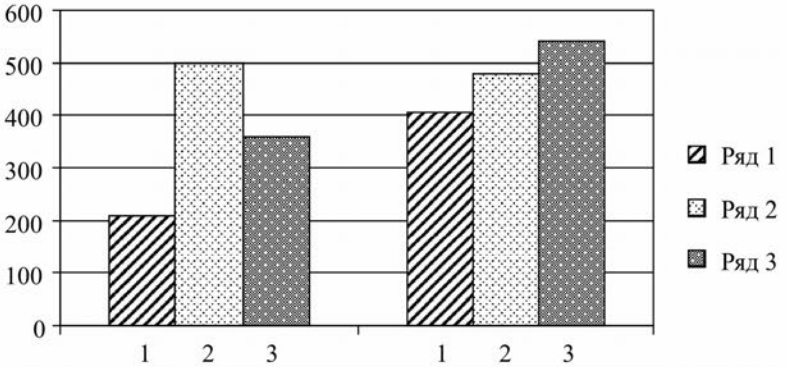
1 – LT C4/D4/E4 спонтанные;
2 – LT C4/D4/E4 USM-индуцированные;
3 – LT C4/D4/E4 формальдегидиндуцированные

а



1 – LT C4/D4/E4 спонтанные;
2 – LT C4/D4/E4USM-индуцированные;
3 – LT C4/D4/E4 хроминдуцированные

б



1 – LT C4/D4/E4 спонтанные;
2 – LT C4/D4/E4USM-индуцированные;
3 – LT C4/D4/E4 марганециндуцированные

в

Рис. 25. Спонтанная и индуцированная концентрация лейкотриенов LTC4/D4/E4 и IgE: *а* – формальдегидом; *б* – хромом; *в* – марганцем

Результаты экспериментального тестирования показали, что стимуляция клеточного пула плазмы крови классическими и техногенными митогенами приводит к повышению концентрации лейкотриенов LTC4/D4/E4. Причем универсальный митоген не стимулирует продукцию лейкотриенов в пробах с максимальным содержанием металлов (хром, марганец), в то время как гаптены (хром, марганец) стимулируют продукцию медиатора эффективнее USM, превышая при этом уровень стимуляции группы сравнения (фоновое содержание гаптена) в 1,7–2,0 раза. Формальдегид в качестве митогена проявляет свою активность как стимулятор прироста уровня медиатора по отношению к спонтанному уровню (повышение в 2 раза), тогда как стимулированный металлами прирост составил 1,35 (марганец) и 1,5 (хром) раза.

Таким образом, металлы-аллергены *in vivo* являются более мощными стимуляторами продукции лейкотриенов, в отличие от классических митогенов, причем при условии стартовой (предварительной) сенсибилизации. Однако в отличие от формальдегида, металлы стимулируют секрецию лейкотриенов и при физиологических, базовых уровнях их содержания в крови. Формальдегид же проявляет свои «митогенные» свойства как лейкотриеновый стимулятор только при наличии высокого (превышающего фоновый) уровня предварительной сенсибилизации клеток.

4.3.9. Характеристика специфического антителообразования к микро- и наноформам металлов (марганца и кремния) у детей

В данном обзоре рассматриваются исследования, предметом которых были токсичность и влияние на состояние здоровья наноразмерных частиц. Исследований, объектом которых стал бы человеческий организм, очень мало. В настоящее время в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* ведется интенсивный поиск органов-мишеней и информативных тестов, которые могли бы использоваться в будущих эпидемиологических исследованиях [359]. Эффективная профилактика негативного воздействия наночастиц должна основываться на глубоких знаниях о путях и механизмах их воздействия.

Понятие наноразмерных частиц

Под нанообъектом понимается объект, у которого один, два или все три размера находятся в диапазоне от 1 до 100 нм. Соответственно нанообъекты делятся на нанопластины, нановолокна и наночастицы.

В отличие от ультрамалых частиц, которые возникают как побочные продукты технологического процесса, наночастицы производятся искусственно, с заранее заданными свойствами. Наночастицы могут проникать в организм через органы дыхания, а также желудочно-кишечный тракт при заглатывании. Токсичность наночастиц зависит от целого ряда факторов, среди которых наиболее важными являются размер частиц, кристаллическая структура, свойства поверхности, а также химическая структура [359].

Не следует думать, что наночастицы появились лишь тогда, когда началось их технологическое производство. На самом деле человечество стало испытывать на себе влияние наночастиц с начала индустриальной революции. Знаменитые лондонские туманы прошлого века в значительной степени содержали нано- и микрочастицы, источниками которых были выбросы промышленных предприятий и выхлопы автомобилей. Установлено, что и в настоящее время существенным компонентом загрязненного воздуха крупных городов являются генерируемые автомобильными моторами наночастицы – 10^7 частиц в 1 $см^3$. Однако потенциальная опасность наночастиц для окружающей среды и человека резко возросла с широкомасштабным их производством. Достоинства наночастиц, отличающие их от обычных материалов (малый размер, структура и химический состав, большая площадь поверхности), делают их потенциально весьма опасными для живых организмов, поскольку значительно повышают их биологическую активность) [141].

В XXI в. нанотехнологии наряду с информационными и биотехнологиями являются фундаментом научно-технической революции. Формирование национальной наноиндустрии, обозначенное «Программой развития наноиндустрии в Российской Федерации до 2015 года», как важнейшее приоритетное стратегическое направление диктует необходимость системного развития работ по изучению потенциальных угроз в сфере жизнедеятельности человека. Прогнозируемый рост экономики, вызванный внедрением нанотехнологий, требует ясного понимания всех возможных рисков для здоровья, связанных с их использованием [228, 256]. Имеется незначительное число работ по исследованию токсичности нанодисперсных растворов марганца и кремния.

Исследования возможного негативного влияния нанодисперсного оксида марганца (III, IV)

Исследования водной суспензии нанодисперсного раствора оксида марганца (III, IV) на крысах показали, что острая токсичность нанораз-

мерного и микроразмерного оксидов марганца в дисперсных растворах составила 2340 мг/кг (3-й класс опасности) и 6000 мг/кг (4-й класс опасности). Результаты морфологических исследований по влиянию водной суспензии нанодисперсного оксида марганца на структуру тканей внутренних органов экспериментальных животных демонстрируют сосудистые нарушения, приводящие к кровоизлияниям и некротическим изменениям в паренхиматозных органах, выраженной лимфоидной пролиферации и активации макрофагальной системы в паренхиматозных органах и органах центральной нервной системы. Комплекс морфологических изменений включал активацию макрофагальной системы в виде дифференцировки, пролиферации и активного фагоцитоза сформированными макрофагами продуктов разрушения клеток и эритроцитов, размножение клеток лимфоидного ряда, ведущее к гипертрофии лимфоидного ряда в органах иммуногенеза и формированию лимфогистиоцитарных инфильтратов в паренхиматозных органах и органах ЦНС. Степень выраженности и распространенности нарушений зависит от дозы нанодисперсного оксида марганца. При этом установленные морфологические изменения могут носить компенсаторный характер, ряд из них имеет признаки иммунных и аутоиммунных реакций, что может быть объяснено особыми физико-химическими свойствами наночастиц. Водная суспензия микродисперсного оксида марганца вызывает морфологические изменения в системе кровообращения, макрофагальной системе и органах иммуногенеза преимущественно в дозе 5000 мг/кг. Глубина и распространенность изменений значительно менее были выражены относительно морфологических изменений при введении нанодисперсных частиц [228].

Такой характер морфологических изменений определяется, вероятно, рядом физических свойств. Значительная удельная площадь поверхности и несферическая форма способствуют снижению скорости выведения из организма фагоцитирующими клетками иммунной системы. Это объясняет высокую активность макрофагов в тканях [228].

Исследования возможного негативного влияния нанодисперсного диоксида кремния

Наноразмерный диоксид кремния обладает огромным потенциалом для применения в наиболее приоритетных отраслях развития нанотехнологий: оптоэлектронике, фармакологии, пищевой промышленности. В связи с перспективой широкого использования нанодисперсного

диоксида кремния в составе пищевых добавок необходимо изучение возможной токсичности данного соединения [6].

В результате выполнения процедуры оценки потенциальной опасности по обобщению данных о физических, физико-химических, молекулярно-биологических, биохимических, цитологических и токсикологических характеристик и параметров распространения в среде обитания нанодисперсного диоксида кремния установлено, что он обладает средней степенью опасности для здоровья человека (D = 1,49) [140].

В числе основных физико-химических характеристик, определяющих потенциальную опасность для здоровья человека наночастиц диоксида кремния, рассматривалась их растворимость в воде и биологических жидкостях. Выявлено, что наночастицы данного соединения смачиваются биологическими жидкостями, но не растворяются в них, что может обусловливать длительное нахождение в свободном состоянии в биологических средах. По литературным данным наночастицы диоксида кремния склонны к образованию агрегатов в водной среде, в связи с чем их токсичность может снижаться, но превышать таковую у микрочастиц того же размера и массы. Важным фактором, определяющим потенциальную опасность для здоровья человека наночастиц диоксида кремния, является цитотоксическая активность. Установлено, что наночастицы диоксида кремния размером 70 нм обладают более выраженным цитотоксическим действием по сравнению с микроразмерными аналогами. В результате экспериментального определения параметров острой токсичности установлено, что для нанодисперсного и микродисперсного диоксида кремния она составляет соответственно 4638 мг/кг (3-й класс опасности) и более 10 000 мг/кг (4-й класс опасности) [6].

А.Д. Дурнев и соавт. [167] провели исследование генотоксичности и репродуктивной токсичности нанокристаллов кремния. Они показали, что при однократном внутрибрюшинном введении наночастиц кремния в дозе 5 мг/кг мышам F1 (CBAxC57Bl/6) после 24-часовой экспозиции они вызывали значимое увеличение поврежденности ДНК (метод ДНК-комет) в клетках костного мозга животных, а в дозе 50 мг/кг – в клетках костного и головного мозга. Кристаллические наночастицы кремния в дозе 50 мг/кг при экспозиции более 24 ч вызывали гибель 60–80 % мышей. Кристаллические наночастицы кремния, введенные в дозе 50 мг/кг на 1, 7-е и 14-е сутки беременности беспородным бе-

лым крысам, уменьшали прирост массы тела беременных крыс и новорожденных крысят на отдельных этапах эксперимента, но не влияли на другие параметры физического развития крысят и не вызывали тератогенных эффектов.

Активно развивающиеся исследования свойств наночастиц и постоянно расширяющиеся области их применения ставят задачу поиска и апробации методов оценки их биологической безопасности с использованием различных моделей. Оценка клеточных эффектов наночастиц является особенно важной, так как благодаря своим физико-химическим свойствам они могут воздействовать непосредственно на клетки и внутриклеточные структуры. Кроме того, использование культивируемых клеток дает возможность разработать экспресс-методы оценки, соответствующие положениям биомедицинской этики. Основной проблемой при разработке таких подходов является выбор типов клеток для тестирования и показателей оценки проявления цитотоксичности или других клеточных эффектов. Независимо от пути, по которому наночастицы могут попасть в организм человека (например, при нанесении на кожу или инъекциях в ткань или кровь), одной из основных клеточных систем, с которыми будут взаимодействовать эти частицы, являются клетки периферической крови. Таким образом, оценка *in vitro* влияния наночастиц на эти клетки может дать возможность охарактеризовать один из возможных биомедицинских рисков использования наночастиц на уровне организма в целом [39].

Рядом отечественных ученых было исследовано влияние наночастиц на основе диоксида кремния на жизнеспособность и пролиферативную активность культивируемых лимфоцитов периферической крови человека. Все наночастицы при концентрации 100 мкг/мл вызывали достоверный цитотоксический эффект, степень выраженности которого зависела от строения частиц: наименее токсичны были наночастицы SiO_2. Гибель клеток происходила в основном за счет апоптоза и постапоптотического некроза. Инкубация с наночастицами в концентрации 100 мкг/мл в течение 72 ч приводила к гибели всех фитогемагглютининактивированных лимфоцитов, а концентрации 1 и 10 мкг/мл не влияли на их пролиферативную активность. Полученные результаты позволяют предположить, что эффекты наночастиц на клетки могут определяться их концентрацией и размерами, а также особенностями структуры [39].

Данные о влиянии наноразмерных частиц на показатели иммунитета

Имеется ограниченное количество данных исследований касательно токсического воздействия наночастиц марганца и кремния на иммунитет и его показатели. В то же время было изучено возможное влияние наночастиц диоксида титана (TiO_2 (рутила)) на показатели иммунной системы у крыс. Крысы линии Вистар получали внутрижелудочно через зонд водную дисперсию наночастиц в дозе 100 мг на 1 кг массы тела. Затем их иммунизировали овальбумином куриного яйца (ОВА) – 100 мкг. В ходе исследования оценивали концентрацию специфических IgG-антител, IL-6 и IL-10, ФНО-α, экспрессию антигенов CD45RA, CD3, CD4, CD8, CD161a, фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов, апоптоз лимфоцитов, гематологические показатели крови. В результате проведеных исследований было установлено, что внутрижелудочное введение животным наночастиц рутила приводит к достоверному усилению у них гуморального иммунного ответа на модельный пищевой антиген ($p<0,05$). При анализе лейкоцитарной формулы выявлено достоверное снижение уровня незрелых клеток при воздействии наночастиц на фоне иммунизации. Установлено, что прием наночастиц приводит к достоверному снижению относительного числа В-лимфоцитов у иммунизированных животных, а также к достоверному увеличению фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов периферической крови. Индекс стимуляции фагоцитоза достоверно повышается при приеме наночастиц по сравнению с контролем (неиммунизированные животные). Влияния наночастиц рутила на уровень продукции цитокинов (IL-6, IL-10, ФНО-α), гематологические показатели крови, апоптоз не выявлено как у интактных, так и у иммунизированных животных. Таким образом, показано, что введение наночастиц рутила в желудок влияет на некоторые показатели специфического и неспецифического иммунитета как иммунизированных, так и интактных крыс [43].

Имеются данные о влиянии наночастиц ферромагнетика (Fe_3O_4) с размером частиц 40–60 нм на функциональную активность клеток системы иммунитета интактных мышей, в том числе на функциональную активность клеток лимфоцитов лимфатических узлов, перитонеальных макрофагов, моноцитов и нейтрофилов периферической крови мышей линии Balb/c при непосредственном взаимодействии в системах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что влияние наночастиц ферромагнетика дозозависимо. Изменения имели разнонаправленный характер, что прояв-

лялось угнетением пролиферативного ответа лимфоцитов при введении наночастиц *in vivo* и некоторой стимуляцией в системе *in vitro*. *In vitro* отмечали усиление фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов; моноцитов и нейтрофилов крови; *in vivo* (в зависимости от условий) активность фагоцитов как стимулировалась, так и подавлялась [26].

В последние годы увеличивается число экспериментальных доказательств способности различных наноматериалов к повреждающему воздействию на клеточные и субклеточные структуры, например, для наночастиц диоксида титана, оксида цинка, диоксида кремния, технической сажи, хотя и не все исследователи получают позитивный результат с теми же наноматериалами, в особенности при тестировании их не на клеточных культурах, а *in vivo*. Имеются данные о том, что наноформы металлов (золото, серебро) *in vitro* вызывают нестабильность генома, опосредованную через оксидативный стресс. Однако по данным других исследователей, ни нано-, ни микрочастицы золота не обладают генотоксичностью ни *in vitro*, ни *in vivo* у крыс.

Информация об аллергенности наночастиц металлов еще более скудна и противоречива.

Сочетанное потенцирующее воздействие техногенных химических факторов различной размерности создает условия для возникновения устойчивых патогенетических предпосылок формирования дисфункции иммунной системы у населения. Возможны варианты реализации техногенных воздействий на иммунную систему: адаптация иммунной системы или ее дисфункция.

Комбинированное влияние неблагоприятных техногенных химических факторов различной размерности и, прежде всего, их наноформ на организм человека диктует необходимость углубленного изучения особенностей иммунного ответа, в том числе экспрессии специфических антител и формирования аллерго- и аутоиммунной патологии.

При исследовании содержания наночастиц в воде, эндемичной по содержанию марганца, установлено, что в пробах присутствуют частицы в диапазонах от 1,1 до 7,6 нм (нижний), от 8,7 до 25,7 нм (средний), от 29,7 до 100,0 нм (верхний).

Наночастицы, которые можно отнести к среднему диапазону размерности, выявлены во всех пробах, достоверных отличий от контроля по размерности частиц не обнаружено.

По результатам химического анализа биосред было установлено, что среднее содержание марганца в крови детей группы наблюдения

(0,014 ± 0,001 мкг/см^3) в 1,3 раза (54 % проб) превышает аналогичный показатель в крови детей контрольной группы (0,011 ± 0,001 мкг/см^3) (p<0,05).

Выявлены различия между пробами контрольной группы и группы наблюдения по параметру средневзвешенного диаметра частиц и процентного содержания сигнала по интенсивности в диапазоне 31–60 нм. В пробах контрольной группы процентное содержание сигнала по интенсивности в данном диапазоне равно 9,2, тогда как в пробах группы наблюдения почти в 2 раза выше – 16,7.

По результатам сравнительной оценки показателей специфической сенсибилизации установлен достоверно повышенный по сравнению с контрольной группой уровень специфической сенсибилизации к марганцу в нано- и микроформах у детей, проживающих на исследуемой территории (табл. 20).

Таблица 20

Уровень специфической сенсибилизации к марганцу

Параметр	Группа		Контроль
	сравнения	наблюдения	
Ig G к наномарганцу, усл. ед.	0,100 ± 0,015	**0,204 ± 0,029***	0,100 ± 0,014
Ig G к микромарганцу, усл. ед.	0,115 ± 0,015	**0,226 ± 0,034***	0,136 ± 0,016

Примечание: * – достоверное различие с группой контроля (p<0,05).

Уровень сенсибилизации детей группы наблюдения к марганцу в форме наночастиц достоверно в 2 раза превышает таковой у детей контрольной группы. У 62 % обследованных детей из группы наблюдения уровень IgG специфического к наномарганцу превышает средний уровень данного показателя в контрольной группе. Уровень сенсибилизации детей группы наблюдения к марганцу в форме микрочастиц в 1,4 раза достоверно превышает таковой у детей контрольной группы (у 49 %). Достоверного различия по способности вызывать образование антител между наноразмерным и микроразмерным марганцем не выявлено.

При изучении специфической сенсибилизации детей к кремнию было обнаружено достоверно сниженное содержание IgG к кремнию разной размерности частиц у детей, проживающих на территории сравнения, по отношению к контрольной группе (различия в 2,0–2,5 раза) (табл. 21).

Таблица 21

Уровень специфической сенсибилизации к кремнию

Параметр	Группа		Контроль
	сравнения	наблюдения	
Ig G к нанокремнию, усл. ед.	**0,067 ± 0,013***	**0,213 ± 0,028***	0,136 ± 0,016
Ig G к микрокремнию, усл. ед.	**0,088 ± 0,013***	0,244 ± 0,029	0,221 ± 0,019

Примечание: * – достоверное различие с группой контроля (p<0,05).

Напротив, группа наблюдения характеризуется статистически значимым повышением (в 1,5 раза) антител к наноразмерному кремнию у детей по сравнению с таковым в контрольной группе. Достоверного различия по способности вызывать образование антител между наноразмерным и микроразмерным кремнием не выявлено.

4.3.10. Метрологические подходы в диагностике маркеров эффекта

Одним из важнейших составляющих разработки новых методологических подходов в диагностике специфической гаптенной нагрузки является достаточность и корректность их аналитических характеристик, что позволяет получить адекватные представления об уровне потенциальной чувствительности к низкомолекулярным соединениям.

Изучение аналитических параметров, их достаточная чувствительность, специфичность и точность – основа достоверности и корректности проведенного тестирования, постановки диагноза и осуществления лечебно-профилактических мероприятий.

Точность измерений – характеристика качества измерений, отражающая близость к нулю погрешностей их результатов. Высокая точность измерений соответствует малым составляющим погрешностей всех видов (как случайных, так и систематических).

Погрешность измерения – характеристика результата измерения, представляющая собой отклонение найденного значения величины от ее истинного значения. Различают абсолютную погрешность измерений, выражаемую в единицах измеряемой величины, и относительную погрешность измерений, представляющую собой отношение абсолютной погрешности к истинному значению измеряемой величины (в долях единиц, в процентах и т.д.). Погрешность измерения – результат воздействия на средство измерений и измеряемую величину неблагоприятно

влияющих факторов (колебаний температуры, электромагнитных помех и т.п.), несовершенства метода и самого средства измерений (неточность его начальной градуировки, нестабильность во времени).

Различают случайные и неучтенные систематические погрешности измерений. Случайная погрешность измерений характеризуется рассеиванием результата при повторных измерениях с учетом задаваемого уровня доверительной вероятности (средним квадратичным отклонением). Источники систематических погрешностей метода устанавливают обычно, проводя контрольные измерения с использованием других известных методик.

Важно четко разграничивать значения терминов «предел обнаружения» и «чувствительность». Предел обнаружения – это наименьшее содержание исследуемого компонента, при котором по данной методике можно обнаружить его присутствие с заданной погрешностью. Термин «чувствительность» (который часто, но неправомерно, используется при обсуждении нижней границы определяемых содержаний) характеризует изменение аналитического сигнала, соответствующее изменению концентрации определяемого вещества. Несколько упрощая, можно сказать, что предел обнаружения характеризует минимальное содержание вещества, которое можно определить с помощью данного метода, а чувствительность – минимальную разницу между содержаниями вещества, которую метод способен «заметить» или «почувствовать». При измерении концентраций, близких к пределу обнаружения метода, получают очень большие погрешности определения, которые быстро увеличиваются с приближением концентрации к этому пределу. Но если искомая концентрация примерно на порядок больше данного предела, то погрешности уже мало зависят от концентрации. *Особенно важно, чтобы выбранная методика анализа работала при концентрациях определяемого компонента на уровне обсуждаемого допустимого уровня.*

Термины «селективность» и «специфичность» отражают степень мешающего влияния основного, не интересующего вас материала пробы на определение исследуемого компонента по данной методике. При этом специфичным для данного вещества называют предельно селективный метод, не подверженный мешающим влияниям со стороны других компонентов.

Очевидна необходимость разработки клинико-лабораторного специфического комплекса диагностических тестов на поступление токсикантов в малых дозах в условиях их совместного присутствия в среде обитания, рекомендуемых для подтверждения хронического воздейст-

вия конкретного химического компонента и идентификации направленности патологического процесса в организме детей (поражаемые системы и органы-мишени).

Используемые в настоящее время показатели специфической сенсибилизации, позволяющие идентифицировать ее уровень, ограничиваются в лучшем случае концентрацией специфических антител, а чаще всего просто их качественной интерпретацией по принципу «да – нет» или их интенсивностью в «крестах». Настоятельная необходимость в критериально-диагностическом обеспечении специфической сенсибилизации к низкомолекулярным аллергенам для задач верификации потенциальной гиперчувствительности, ее выраженности требует разработки полноценной диагностической системы. В то же время для решения задачи диагностики сенсибилизации и аллергии особо актуальными являются вопросы разработки доступных, чувствительных, точных и специфичных методик [12, 300].

Таким образом, несмотря на многочисленные исследования по изучению воздействия токсических химических веществ на человека, до настоящего времени отсутствуют достаточно полные их характеристики как аллергенов, требуется решение вопроса их систематизации, классификации и разработки на их основе методологии изучения вероятной опасности формирования гиперчувствительности населения. Недостаточно исследовано влияние низкомолекулярных соединений на здоровье, в первую очередь маргинальных групп населения (дети). Представляет интерес накопление данных по изучению воздействия на здоровье НМХС, находящихся в атмосферном воздухе на уровнях, близких или ниже ПДК (малых концентраций), с тем, чтобы приблизиться к решению общей задачи по установлению количественных характеристик зависимости «среда – здоровье». Остается неразработанным ряд вопросов, касающихся комплексного изучения изолированных специфических факторов, начиная с их токсикологической характеристики, установления вероятного влияния на формирование заболеваемости. Не исследована вероятность возникновения экозависимой сенсибилизации у детского населения, проживающего в зоне воздействия НМХС-аллергенов, не проанализирована взаимосвязь содержания аллергенов в биологических жидкостях с концентрацией специфических к ним реагинов. Остается актуальной разработка и проведение диагностических и профилактических мероприятий по реабилитации населения, проживающего в зоне влияния специфических факторов антропогенной нагрузки.

4.4. Апоптоз и среда обитания

Апоптоз – активная, генетическая запрограммированная форма клеточной гибели, определяемая на основе характерных морфологических изменений умирающих клеток [19, 87, 326, 415, 461, 476, 532]. Апоптоз является одним из ключевых процессов, определяющих формирование антигенспецифической составляющей иммунной системы и в значительной степени реализацию ее эффекторных функций. Апоптоз – сложный механизм, в осуществлении которого принимают участие огромное количество факторов. Годом признания апоптоза как физиологического явления считается 1972 г., когда английские исследователи Kerr, Wylie, Currie представили убедительные морфологические доказательства существования этого явления. Этот закономерный клеточный феномен, наблюдаемый во всех ядросодержащих клетках организма человека и животных, J. Kerr et al. назвали апоптозом (с греческого – осеннее опадание листьев с деревьев). Клеточное постоянство регулируется генетическими программами организма, одна из которых определяет интенсивность клеточного деления, другая – клеточную гибель.

Постоянно продолжающееся загрязнение окружающей среды химическими примесями в сочетании с нестабильной социально-экономической ситуацией приводит к ухудшению здоровья населения [7]. Многочисленные исследования последних лет доказывают взаимосвязь между гигиеническими факторами и состоянием здоровья населения [9]. Существует необходимость предотвратить негативное влияние на здоровье со стороны многообразных неблагоприятных химических факторов среды обитания путем разработки научно обоснованных гигиенических требований и рекомендаций, диагностической и профилактической направленности.

Химические соединения способны нарушать компенсаторные свойства организма. Одним из важнейших адаптационных механизмов, обеспечивающих поддержание постоянства внутренней среды в условиях химической нагрузки, является иммунная система. Проблема иммуноопосредованных нарушений здоровья является актуальной для регионов, где население проживает и работает в условиях экспозиции химическими веществами, обладающими специфическим в отношении иммунной системы или политропным повреждающим действием на организм [105, 270].

Особую актуальность проблема представляет для детей, проживающих на территориях с высоким уровнем техногенного воздействия. Техногенные химические загрязнители производственной среды также являются значимыми факторами риска для здоровья работающих вследствие формирования патогенетически значимых эффектов дисфункции иммунной системы [1, 250]. Даже относительно низкие концентрации химических производственных факторов в воздухе рабочей зоны и загрязнителей, содержащихся в атмосферном воздухе, приводят к возникновению отклонений в общей иммунологической реактивности организма человека.

Очевидно, изменения иммунитета загрязнителями окружающей среды могут привести к увеличению риска развития ряда заболеваний [133], причинами которых часто является нарушение регуляции жизненного цикла клетки.

Закономерные изменения структурно-функциональных характеристик клетки во времени составляют содержание жизненного цикла клетки (клеточного цикла). Клеточный цикл – это период существования клетки от момента ее образования путем деления материнской клетки до собственного деления или смерти.

M. Schwenk et al. [525] описывают в своем обзоре влияние ионов различных металлов (бериллия, хрома, кобальта, никеля, палладия, платины, кадмия, золота, ртути и свинца) на субпопуляции лимфоцитов. При этом авторы отмечают разнонаправленность действия металлов на клетки. Так, согласно одним исследованиям, содержание хрома в моче коррелирует с повышением содержания NK-, B- T-клеток. Однако, согласно другим исследованиям, обнаружено снижение уровня $CD4^+$ и $CD8^+$-лимфоцитов у работников, находящихся в условиях экспозиции хромом. У лиц с повышенным содержанием кобальта обнаружено снижение содержания $CD4^+$, $CD16^+$-клеток. Иммуностимулирующая способность в условиях *in vitro* выявлена у кадмия. В высоких дозах кадмий увеличивает экспрессию CD69 и активирует B- и T-клетки.

Многочисленные экспериментальные данные указывают на влияние стабильного стронция (Sr^{2+}) в переключение основных режимов функционирования клетки, тем самым происходит его участие в регуляции апоптоза [80, 112]. При воздействии стронция осуществляется внеклеточная идентификация лиганда, передача сигнала через мембрану в разные компартменты клетки, внутриклеточное распознавание, с последующим включением сигнальных путей активации и транслокации

транскрипционных факторов, что в итоге приводит к транскрипции и экспрессии требуемых генов. В настоящее время не вызывает сомнения участие стронция в изменении трансдукции апоптотического сигнала и регуляции летальной программы иммунокомпетентных клеток (рис. 26).

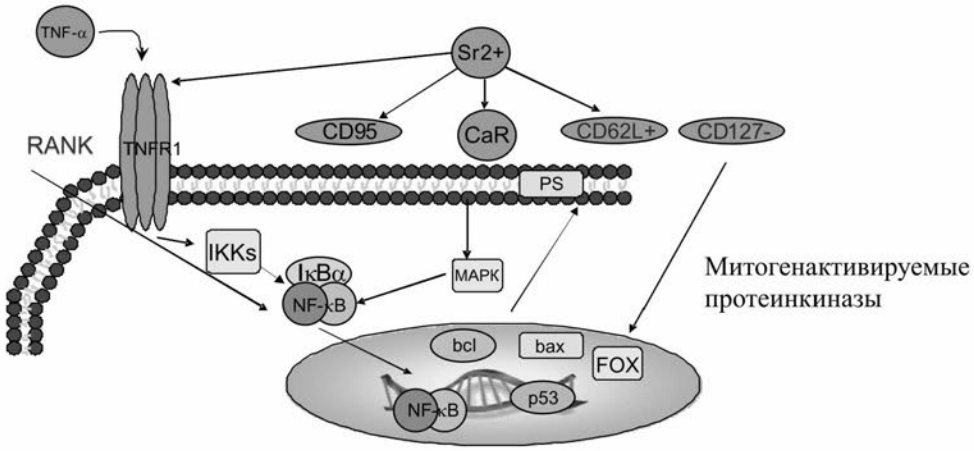


Рис. 26. Стронциевый сигналинг клеточной гибели

Установлено, что у детей группы наблюдения в биологических средах (кровь) статистически значимо ($p < 0{,}05$) повышено содержание стронция по сравнению с референтными значениям и значениями, полученными у детей группы контроля. Цитофлуориметрический анализ экспрессии биомаркеров апоптоза показал, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p < 0{,}05$) снижено количество мембранных $CD95^+$-рецепторов и $TNFRI^+$-рецепторов на Т-лимфоцитах, экспрессия внутриклеточного белка p53 относительно величин, идентифицированных у обследуемых контрольной группы (рис. 41). Анализ иммунного статуса выявил, что у детей с повышенным содержанием стронция в биосредах статистически значимо ($p < 0{,}05$) увеличено процентное содержание $AnnexinV\text{-}FITC^+7AAD^+$-клеток по отношению к аналогичному показателю у обследуемых с содержанием в крови стронция в пределах референтного интервала. Очевидно, что стронций, поступающий в организм с водой и статистически значимо ($p < 0{,}05$) превышающий референтный уровень, оказывает дозозависимое влияние на трансдукцию апоптотического сигнала, в итоге модифицируя апоптотическую реакцию в иммунокомпетентных клетках (рис. 27).

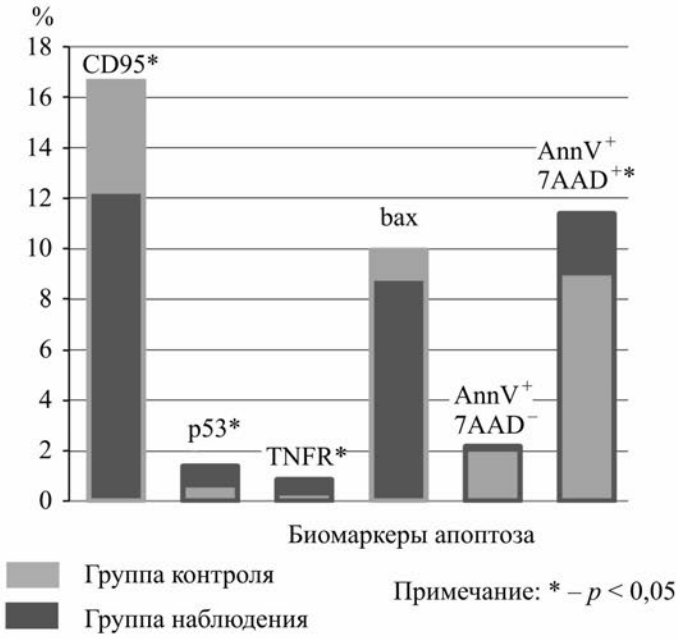


Рис. 27. Соотношение биомаркеров апоптоза в группах детей, различающихся уровнем экспозиции стронцием

При антигенной стимуляции должен работать механизм, позволяющий элиминировать клоны нефункциональных клеток и поддерживать гомеостаз в иммунной системе. Одним из таких механизмов является индуцированная активация клеточной гибели по апоптотическому пути. Однако если в клетках нарушены механизмы осуществления апоптоза, клетки погибают путем некроза [461, 476]. В то же время процесс гибели клетки путем некроза может быть не только вариантом гибели в условиях подавления апоптоза, но и способствовать активации иммунного ответа многоклеточного организма [126, 129, 326]. Индуцировать программу некроза можно, вызывая гиперэкспрессию проапоптотического белка bax и в то же время ингибируя активность каспаз [461, 476]. Экспериментально подтверждено, что Sr^{2+} инициирует конформационные изменения рецепторного аппарата клетки, в частности, рецепторы фактора роста фибробластов (FGFRs), и изменяет трансмембранную передачу сигнала [159, 184], а также не исключено непосредственное (прямое) воздействие стронция на компоненты внутриклеточной апоптотической сигнализации [112]. Обнаружена способность стронция ингибировать экспрессию некоторых цитокинов, в частности TNF-α, являющегося лигандом TNFRI.

Предполагают существование во внеклеточном домене Са-чувствительного рецептора (CaR) различных по биохимическому составу сайтов для Sr^{2+} и Ca^{2+}, что приводит к активации отличных сигнальных путей при связывании соответствующих ионов с рецептором [429, 580]. Эта разница в соответствующих сигнальных каскадах позволяет Sr^{2+} усиливать Ca^{2+}-индуцированный ответ клетки и наоборот [429]. Комплекс CaR с агонистом может активировать несколько комплексов G-белков с эффекторами и инициировать различные сигнальные пути [580]. Так Gαi стимулирует фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), вызывая PI3K/Akt-сигнализацию. Белок Gαq активирует фосфолипазу С (PLC), катализирующую распад мембранных фосфолипидов, в частности, фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (PIP_2) до инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3) и диацилглицерол (DAG). IP3 вызывает выброс двухвалентных ионов кальция из внутриклеточного депо, и при этом повышается внутриклеточная концентрация Ca^{2+}. DAG под действием PLC остается связанным с мембраной и стимулирует протеинкиназу С (PKC), запуская последовательный каскад митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK): киназа MAP-киназ (MEK), экстраклеточно-регулируемая протеинкиназа (ERK-I/II). Каскад MAP-киназы также вовлекается в ответ при активации Ras. Экспериментально установлено, что Sr^{2+} повышает транслокацию NF-κB (ядерный фактор kB) с участием именно изофермента PKCβII. Активация NF-κB приводит к повышению уровня экспрессии ингибиторов апоптоза. Однако сложность устройства и особенности ядерной транслокации NF-kB позволяют клетке различным образом реагировать на всевозможные стимулы, что ведет к неодинаковым последствиям. Стронций способен трансформировать компоненты клеточных сигнальных путей независимо от CaR.

Выявлено прямое воздействие Sr^{2+} на рецепторы фактора роста фибробластов (FGFRs), являющихся трансмембранными тирозинкиназными рецепторами (RTK). Активация стронцием FGF/FGFR системы приводит к повышению Akt, ERK1,2, p38 и PLCγ-опосредованной сигнализации. Основной функцией киназного каскада PI3K/Akt является предотвращение клеточной гибели. PI3-киназа вовлечена в передачу сигнала от FGFRs в активированных B- и T-клетках. В результате конформационной перестройки PI3K приобретает ферментативную активность и катализирует превращение PIP2 в PIP3, необходимый для последующих реакций фосфорилирования Akt. Akt осуществляет свое действие путем активации транскрипционного фактора NFκB, а в неко-

торых системах ядерный фактор κB подавляет p53-зависимый апоптоз. Akt-зависимое фосфорилирование белка MDM2 способствует убиквитинзависимому протеолизу белка p53. Помимо этого киназа Akt может напрямую подавлять апоптоз, фосфорилируя (ингибируя) белок bad, каспазу-9 и каспазу-8. Активация PI3K, находящейся на пересечении сигнальных путей от многих рецепторов, ведет к повышению активности MAP-киназ – ключевых регуляторов клеточного цикла.

Одно из важных свойств Wnt/β-катенин-сигнализирования состоит в способствовании пролиферации клеток, что приводит к развитию новообразований. В результате активации Wnt-сигнализации накопленный β-катенин транслоцируется в ядро, где он формирует активный транскрипционный комплекс с TCF / LEF (фактор Т-клеток / лимфоидный энхансерный фактор). GSK3 является негативным регулятором сигнального Wnt-пути. Sr^{2+} может увеличить экспрессию β-катенина и мембранного рецептора семейства Frizzled, а также ингибировать экспрессию Wnt-ингибиторов, предотвращая деградацию β-катенина. Передача сигнала от лигандов Wnt может также осуществляться с помощью RTK, в результате активируется PLC и осуществляется соответствующий каскад событий. Не исключается взаимодействие между стронцийиндуцированной активацией Wnt-пути и митогенактивируемым протеинкиназным каскадом. С одной стороны, сигнальный путь MAPK может регулировать канонический Wnt/β-катенин-зависимый путь в результате инактивации киназа-3-гликогенсинтазы (GSK3), с другой стороны, Wnt3a может активировать протеинкиназу p38. Показана способность стронция активировать Wnt-сигнальный путь при участии CaR.

Различные состояния вызывают характерные для каждого из них модификации как самого белка p53, так и систем, контролирующих его уровень и активность. В свою очередь это определяет поведение и судьбу измененной клетки, которая во многом зависит от тканевой принадлежности клеток. Белок p53 осуществляет на транскрипционном уровне одновременно и активацию гена bax, и репрессию гена bcl-2, транскрипционно регулирует протеинфосфатазу PTEN (фосфатаза и гомолог тензина), которая является негативным регулятором PI3K/Akt сигнального пути. Внутриклеточный белок p53 трансактивирует некоторые киллерные рецепторы, в частности Fas и KILLER/DR5. Действуя независимо от своей транскрипционной функции, p53 может вызывать апоптоз за счет прямого взаимодействия с белками BAX, Bcl-XL.

На основании детального изучения апоптотической активности иммуноцитов у детей в условиях повышенной экспозиции стронцием необходимо отметить, что эффекты стронция будут зависеть от дозы, времени воздействия, типа клетки и ее активационного статуса [184]. Апоптоз запускается различными индуцирующими факторами, при этом используются различные сигнальные пути, которые, пересекаясь друг с другом, обеспечивают согласованный ответ в виде различной стадийности жизненного цикла клетки.

Стронций у детей в условиях превышения его референтных значений в крови более чем в 2 раза воздействует на различные пути регуляции апоптоза (CD95-зависимый, p53-зависимый, TNF-зависимый апоптоз) и на сайты их интеграции, способствует снижению передачи апоптотического сигнала в иммунокомпетентных клетках, достоверному по отношению к группе детей с содержанием стронция на уровне референтных концентраций, формируя альтернативный апоптозу путь клеточной элиминации, в основе которого лежит механизм некроза.

Рядом авторов описано влияние низкомолекулярных органических соединений на показатели иммунитета [76, 129, 174]. Отмечается снижение содержания $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD16^+56^+$-лимфоцитов и повышение экспрессии $CD19^+$- и $CD25^+$-рецепторов у детей с повышенной контаминацией биологических субстратов толуолом, формальдегидом и фенолом [261, 276]. К формированию клеточного и гуморального иммунодефицита, угнетению неспецифической клеточной резистентности приводит комбинированное хроническое воздействие фенола и формальдегида в воздухе жилых помещений [76].

Многие исследователи относят изучение влияния факторов среды на события апоптоза к числу определяющих в системе «факторы окружающей среды – иммунитет». Нарушение контроля клеточной гибели – апоптоза – ведет к сдвигам гомеостаза и является одним из множества факторов, которые способствуют развитию иммунопатологического состояния. Многочисленные работы демонстрируют нарушение апоптоза при стрессе как в сторону активации, так и в сторону ингибирования [17, 19, 99, 110, 263]. При изучении влияния химических факторов в большинстве публикаций отмечается ингибирование запрограммированной клеточной гибели, что может определять в свою очередь опухолевые поражения различной природы, аутоиммунные и вирусные заболевания.

Проведенное нами изучение индуцированной бензолом активности апоптотических и некротических процессов в иммуноцитах стажирован-

ных по контакту с ароматическими углеводородами работников химического производства показало стимуляцию и в дальнейшем угнетение процессов клеточной гибели при возрастании стажа (табл. 22).

Таблица 22

Состояние индуцированной бензолом клеточной гибели у работников химического производства в условиях *in vitro*

Показатель	Проба без добавления бензола	Проба с концентрацией бензола 0,005мг/л
Стаж 7,00 ± 0,90 г.		
Annexin V-FITC^{+}7AAD^{-}	0,94 ± 0,07	1,18 ± 0,08*
Annexin V-FITC^{+}7AAD^{+}	6,81 ± 0,65	7,12 ± 0,92
Стаж 16,00 ± 1,88 г.		
Annexin V-FITC^{+}7AAD^{-}	1,27 ± 0,13	1,17 ± 0,22
Annexin V-FITC^{+}7AAD^{+}	8,02 ± 1,51	6,98 ± 1,03

Примечание: * – достоверная разница между изучаемыми группами.

В условиях влияния антропогенных химических факторов экологически обусловленные изменения здоровья чаще всего реализуются в виде вторичных иммунодефицитных состояний, которые в свою очередь способствуют распространенности сенсибилизации и развитию аллергических заболеваний [223, 224, 375]. Большое значение при этом приобретает индивидуальная чувствительность организма к химическим воздействиям, определяющая направленность иммунного ответа через Th1- и Th2-лимфоцитов с включением положительных обратных связей межклеточных взаимодействий, реализуемых системой цитокинов. Так, у детей в условиях воздействия химических факторов наблюдается снижение клеточного иммунитета с переключением Т-клеточной регуляции с Th1- на Th2-тип, что указывает на особенности механизма иммунного ответа, характерные для сенсибилизации атопического генезиса [519].

Технология проточной цитометрии (рис. 28):

♦ определение субпопуляций лимфоцитов (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16+CD56+, CD3+CD25+, CD3+CD95+);

♦ определение уровня апоптоза лимфоцитов с помощью окрашивания Annexin V-FITC и пропидиумом йодидом (Propidium Iodide);

♦ определение T-reg-клеток, супрессирующих иммунный ответ;

Рис. 28. Клеточное фенотипирование проточной цитометрией (проточный цитометр FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson», USA)

- определение трансформирующего фактора p53 и ФНО-α, регулирующих жизненный цикл клетки;
- определение внутриклеточных маркеров апоптоза: bcl-2, bax, bad.

Техногенное химическое воздействие оказывает негативное влияние на регуляторные системы и адаптационные возможности организма, что ведет к снижению резистентности иммунитета, сопротивляемости организма к инфекционным заболеваниям, повышению чувствительности к неинфекционной патологии. Механизмы реализации этих состояний часто ассоциированы с нарушением запрограммированной гибели клетки, изменениями в клеточном ответе организма, при которых наблюдается либо активация апоптоза, либо его торможение. При изучении влияния экзогенных факторов на возникновение дисбаланса иммунной системы, что часто выражается в нарушении регуляции апоптоза, особую значимость представляет оценка минорных фракций и фенотипов клеточного иммунитета, а также внутриклеточных маркеров апоптоза и цитокинового профиля у детей, проживающих на территориях с высоким уровнем техногенного воздействия. Индуцирующее влияние неблагоприятных внешнесредовых факторов на организм диктует необходимость углубленного изучения состояния иммунологического здоровья населения с целью научного обоснования профилактики неинфекционных заболеваний.

Маркером экспозиции является повышенная относительно референтных пределов концентрация в крови детей стронция, обладающего свойством гаптена, который в конъюгированном или несвязанном с белками плазмы виде может инициировать нарушения клеточной регуляции.

Использование медико-химического и специфического иммунологического тестирования позволило подтвердить наличие особенностей апоптоза при воздействии техногенных химических факторов на организм человека, для которых установлены безопасные уровни их содержания в организме.

При проведении гигиенических исследований, гигиенической экспертизы, контрольных и надзорных мероприятий по результатам социально-гигиенического мониторинга с целью обеспечения санитарно-гигиенической безопасности населения необходимо учитывать особенности иммунных нарушений в условиях контаминации биосред, ведущими из которых являются изменения клеточной и цитокиновой регуляции, а также основных фенотипических маркеров апоптоза.

Для идентификации показателей маркеров регуляции апоптоза (CD25, CD95, TNFRI, аннексинпозитивные лимфоциты, p53, bcl-2), а также регуляторов межклеточного взаимодействия рекомендуется использовать метод проточной цитометрии сочетанных (комбинированных) фенотипов в суспензии клеток из периферической крови у детского населения при различной техногенной химической нагрузке (рис. 29).

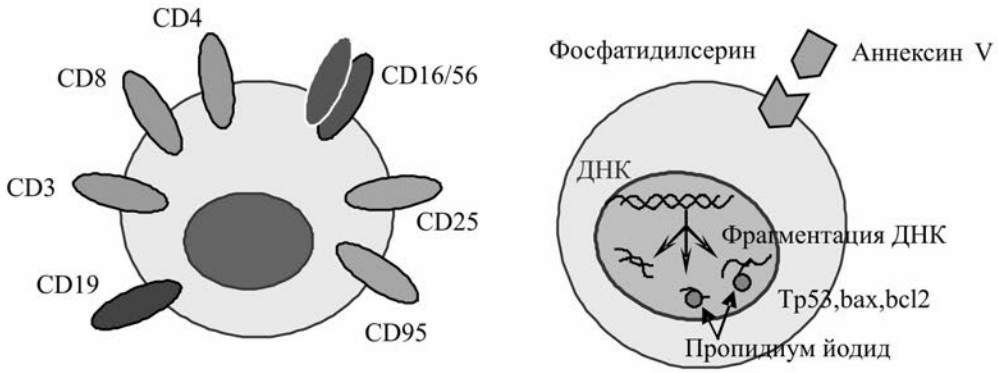


Рис. 29. Мембранные и внутриклеточные компартменты апоптоза

Критерии гигиенической оценки (уровни маркеров экспозиции и соответствующие им нарушения апоптотической регуляции) рекомендуется использовать для идентификации нарушений физиологического процесса клеточной гибели, что будет характеризовать ранние признаки формирования аутоиммунной, онкопролиферативной патологии и состояний, ассоциированных с иммуносупрессией.

4.4.1. Апоптоз и его роль в иммунном ответе

Одним из исходов процесса активации лимфоцитов служит их программированная гибель по механизму апоптоза. По своим проявлениям он существенно отличается от другой формы гибели клеток – некроза, развивающегося при попадании клеток в неадекватные условия или при действии цитолитических агентов типа комплемента. Апоптоз, в сущности, представляет собой самоубийство клетки, поскольку он осуществляется вследствие срабатывания собственных внутренних механизмов клетки. В наиболее яркой и массовой форме апоптоз лимфоцитов реализуется в процессе их развития (в случае Т-клеток – в коре тимуса, при созревании В-клеток – в костном мозге). В связи с этим тимоциты служат «излюбленной» моделью для изучения данного процесса. Покоящиеся зрелые лимфоциты апоптозу не подвержены. Однако они становятся чувствительными к индукции апоптоза после активации: по этому механизму гибнет значительная часть лимфоцитов при развертывании иммунного ответа и все эффекторные клетки – в определенные сроки после завершения выполнения функций. Среди форм лимфоцитов, индуцированных в результате антигенной стимуляции, лишь клетки памяти не подвергаются апоптозу или подвергаются ему спустя очень длительный срок после их возникновения.

Апоптоз может быть вызван различными индукторными факторами. В иммунной системе чаще других реализуются три формы апоптоза: гибель клеток вследствие дефицита факторов роста, апоптоз, вызванный глюкокортикоидами и другими агентами со сходным действием, и «активационный» апоптоз. Именно последняя разновидность свойственна зрелым лимфоцитам. «Активационный» апоптоз развивается в результате дисбаланса активационных сигналов или вследствие экспрессии и последующего связывания специализированных рецепторов для индукторов апоптоза.

Апоптоз обычно развивается в пределах 12–16 ч после действия индукторных факторов. Это сопровождается экспрессией 10–13 генов.

Следует особо подчеркнуть, что разновидности апоптоза, запускаемые действием различных факторов, могут существенно отличаться по начальным механизмам (вплоть до противоположного действия некоторых модифицирующих факторов). Однако на определенных этапах все эти пути сходятся, и завершающие, ключевые этапы развития апоптоза осуществляются по единому механизму. К таким ключевым механизмам

реализации апоптоза относят активацию некоторых протеиназ. Это сериновые протеиназы гранзимы, участвующие также в осуществлении цитолиза киллерными клетками (апоптоз является одним из основных механизмов его реализации), а также каспазы, к которым относится более 10 ферментов, включая ICE (от англ., IL-1 converting enzyme), а также JAMA (Cpp32), ответственный за переключение событий с цитоплазменного уровня на уровень ядерных ферментов, участвующих в реализации основного события – фрагментации ДНК.

Выбор направления сигнализации в сторону апоптоза в большой степени зависит от экспрессии гена p53. Ген p53 связан с ДНК и реагирует на накопление нерепарированных разрывов ее нитей. Формирование большого числа разрывов ДНК, например, при действии радиации, так же, как генетические преобразования при трансформации клеток, вызывает апоптоз этих клеток, включаемый с участием p53. Поскольку таким образом элиминируются потенциально злокачественные клетки, фактор p53 называют онкосупрессором (рис. 30).

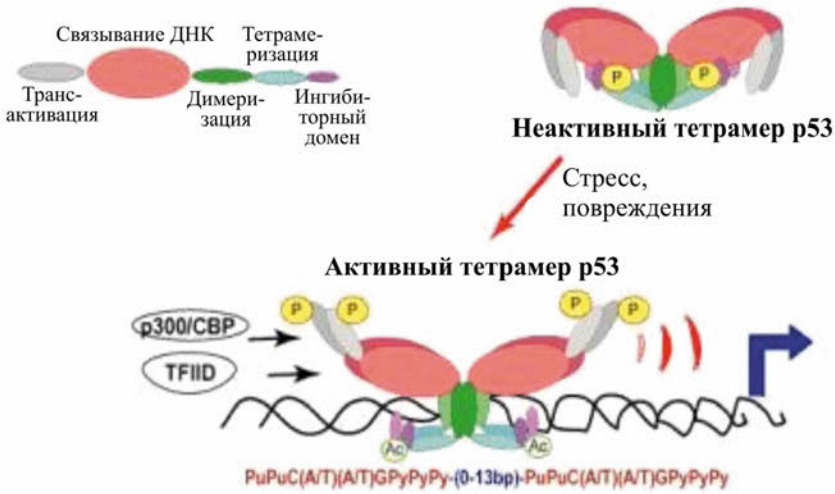


Рис. 30. Транскрипционная активность p53

Результатом мутации гена p53 является подавление апоптотической элиминации клеток с отклонениями в геноме, что приводит к значительному повышению вероятности развития злокачественных опухолей (рис. 31, 32).

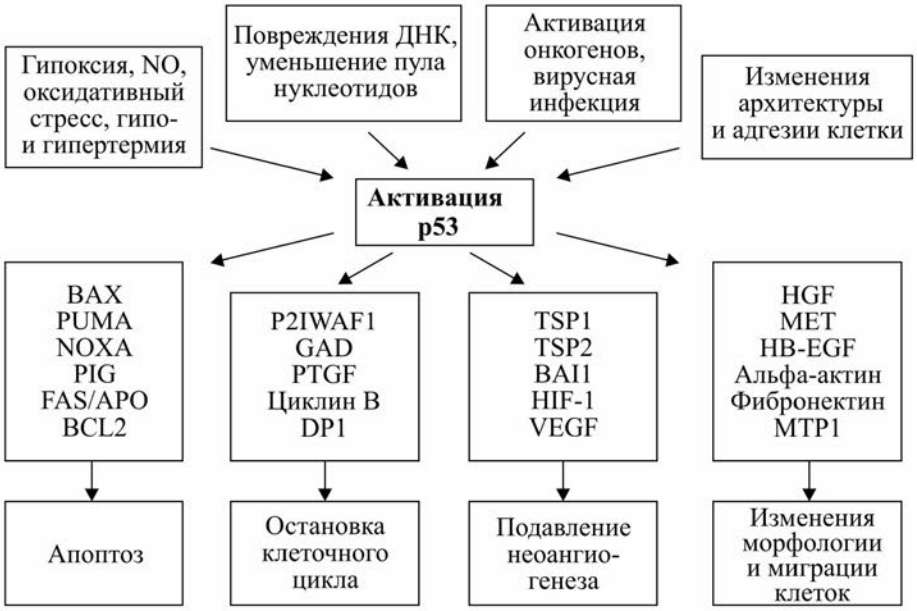


Рис. 31. Гены, участвующие в индукции клеточной смерти

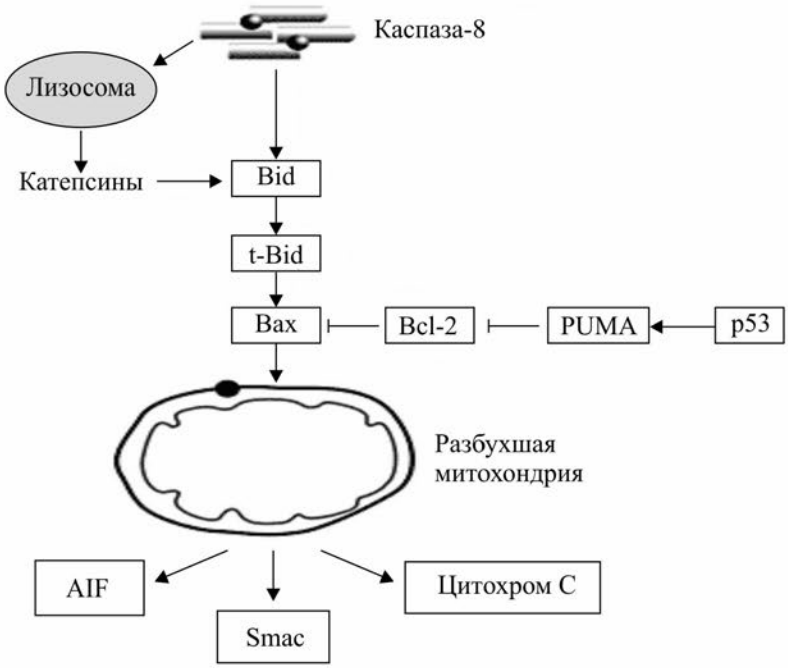


Рис. 32. p53 обеспечивает альтруистическое поведение клеток многоклеточного организма

Известно несколько генов, блокирующих развитие апоптоза, – bcl-2, bcl-xl, bag-1. Ген bcl-2 является гомологом гена ced-9 *C. elegans*. Его продукт – митохондриальный белок Bcl-2. Экспрессия этого белка обнаружена именно в тех клетках иммунной системы, которые устойчивы к апоптозу. Экспрессия Bcl-2 высока в $CD4^-CD8^-$-тимоцитах, но отсутствует в $CD4^+$ $CD8^+$-тимоцитах; она усиливается при формировании зрелых форм Т-клеток, но вновь снижается в некоторых активированных лимфоцитах. Bcl-2 в значительном количестве содержится в клетках памяти. Хотя Bcl-2 защищает клетки не от всех индукторов апоптоза, в целом его присутствие, как правило, свидетельствует об устойчивости клетки к апоптозу. Усиленная экспрессия Bcl-2 (например, у мышей, трансгенных по bcl-2) приводит к развитию тех же последствий, что и при мутации генов 1pr и gld. Механизм антиапоптотического действия Bcl-2 и Bc1-xl точно не установлен. Возможно, это действие связано с антиоксидантной активностью Bcl-2 и с предотвращением образования липидных перекисей, участвующих в запуске апоптоза.

Известно, что апоптоз играет существенную роль в развитии Т-лимфоцитов, обеспечивая негативную селекцию аутореактивных клонов во время внутритимической дифференцировки Т-клеток. По мере созревания Т-клетки становятся устойчивыми к индукции апоптоза. Однако после активации различными стимулами (антигенами, митогенами, некоторыми цитокинами и другими факторами) зрелые Т-лимфоциты вновь приобретают чувствительность к воздействию апоптогенов. Апоптоз зрелых Т-лимфоцитов при их активации получил название активационно-индуцированной гибели клеток. Контроль над его развитием является важным механизмом в регуляции иммунного ответа. Показано, что повышенная чувствительность Т-клеток к апоптозу играет существенную роль в патогенезе первичных и вторичных иммунодефицитных состояний. В связи с этим решению вопросов регуляции апоптоза с целью разработки новых потенциальных подходов к патогенетической терапии придается большое значение. Соответственно оценка особенностей апоптотической регуляции иммунного ответа тяжелыми металлами представляется одним из непременных компонентов успешного развития исследований в этом направлении (табл. 23).

Важным компонентом клеточного цикла является митотический (пролиферативный) цикл – комплекс взаимосвязанных и согласованных во времени событий, происходящих в процессе подготовки клетки к делению и на протяжении самого деления. Кроме того, в жизненный цикл

включается период выполнения клеткой многоклеточного организма специфических функций, а также периоды покоя. В периоды покоя ближайшая судьба клетки не определена: она может либо начать подготовку к митозу, либо приступить к специализации в определенном функциональном направлении (рис. 33).

Таблица 23

Маркеры апоптоза у детей, экспонированных стронцием

Показатель	Контрольная группа (n = 53)	Группа наблюдения (n = 63)
Стронций, мг/дм^3	Референтные значения 0,01–0,077	
	0,035 ± 0,0048	0,151 ± 0,022 $p1$ = 0,001, p = 0,001
CD95+, %	16,71 ± 4,29	12,27 ± 2,16 p = 0,040
p53, %	1,41 ± 0,75	0,65 ± 0,16 p = 0,030
TNFRI, %	0,87 ± 0,28	0,31 ± 0,13 p = 0,001
CD4+ CD25+127-, %	1,51 ± 0,35	2,19 ± 0,27p = 0,001
bax, %	7,12 ± 0,85	3,78 ± 0,25p = 0,001
AnnexinV-FITC+7AAD-, %	2,07 ± 0,51	2,11 ± 0,42 p = 0,890
AnnexinV-FITC+7AAD+, %	6,69 ± 0,37	9,04 ± 1,10 p = 0,049

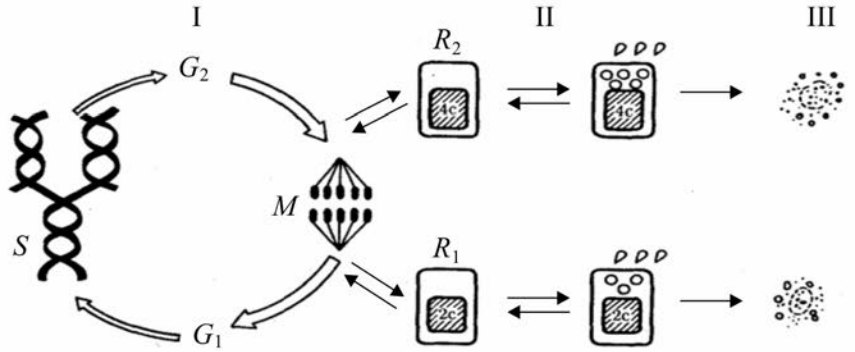


Рис. 33. Жизненный цикл клетки многоклеточного организма:
I – митотический цикл; II – переход клетки в дифференцированное состояние;
III – гибель клетки: G1 – пресинтетический период, G2 – постсинтетический (предмитотический) период, M – митоз, S – синтетический период, R1 и R2 – периоды покоя клеточного цикла; 2c – количество ДНК в диплоидном наборе хромосом, 4c – удвоенное количество ДНК

В здоровом организме общая численность клеток стабильна, она остается практически неизменной на протяжении многих лет. Это происходит за счет уравновешивания процессов возникновения новых клеток (митоза) и гибели клеток – естественной (апоптоза) или случайной (некроза) (рис. 34).

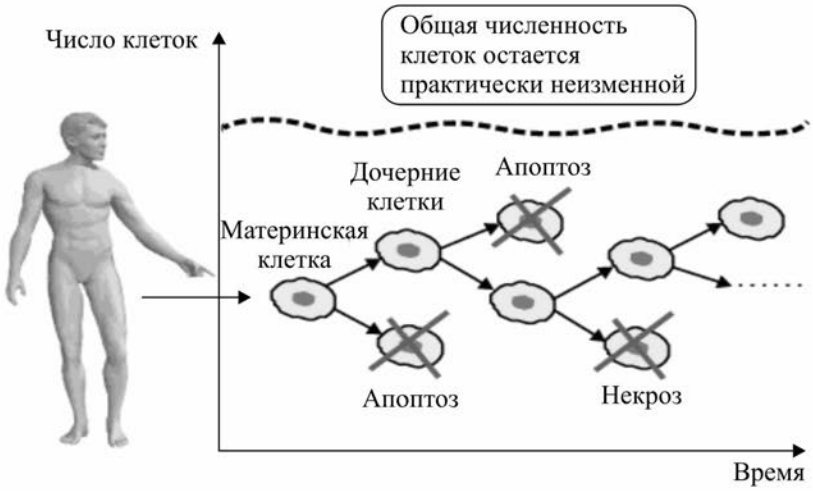


Рис. 34. Поддержание постоянства общей численности клеток в здоровом организме

При смещении равновесия, например, гибели большого количества клеток в результате травмы или другого негативного воздействия, включаются механизмы регенерации (увеличение интенсивности деления клеток для замещения погибших), о которых уже было сказано. Таким образом, общая численность клеток поддерживается практически на постоянном уровне.

Основными проявлениями иммунной и генетической дезадаптации, сопряженной с апоптозом клетки и факторной нагрузкой, являются следующие нарушения:

- измененная генетика, ассоциированная с распространенностью минорных аллелей генов иммунной регуляции, детоксикации, онкопредрасположенности;
- снижение кластеров дифференцировки CD4, CD16, CD56;
- повышение кластеров дифференцировки CD19, CD25, CD95;
- дисбаланс мембранных и внутриклеточных факторов апоптоза (ФНО-α, bcl-2, bax, bad);
- замедление жизненного цикла клеток на стадии апоптоза (угнетение экспрессии лимфоцитов в аннексиновом тесте);
- дефицит транскрипционного фактора p53, CD127 – (Т-рег);
- цитокиновый дисбаланс (дисбаланс IL-4, IL-6, IL-10↑, ИФН-гамма, ФНО-α↓.

Апоптоз. Апоптоз представляет собой активную форму клеточной гибели и является физиологическим механизмом устранения избыточ-

ных и/или функционально аномальных клеток [326, 415, 461, 476]. Запрограммированная гибель клетки – апоптоз – играет важную роль в реализации механизмов адаптации организма к воздействию факторов среды обитания. В организме запрограммированная клеточная гибель выполняет функцию, противоположную митозу, и тем самым регулирует общее число клеток в организме.

Программированный некроз. Длительное время некроз рассматривали лишь как вариант неспецифической гибели клетки [461, 476]. Фактической причиной гибели при некрозе считают резкое падение содержания АТФ в клетках до такого уровня, который не совместим с жизнью [461]. «Энергетическая катастрофа» может быть вызвана различными причинами. Морфологическими признаками некроза является набухание клеток и их мембранных органелл, неспецифическая компактизация хроматина, вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности плазматической мембраны и выход содержимого клеток во внеклеточное пространство. В итоге в многоклеточном организме в области некроза развивается воспалительная реакция. Особенности показателей клеточного апоптоза и некроза у взрослых и их детей для условий комбинированной экспозиции (шум, металлы, органические соединения) приведены на рис. 35.

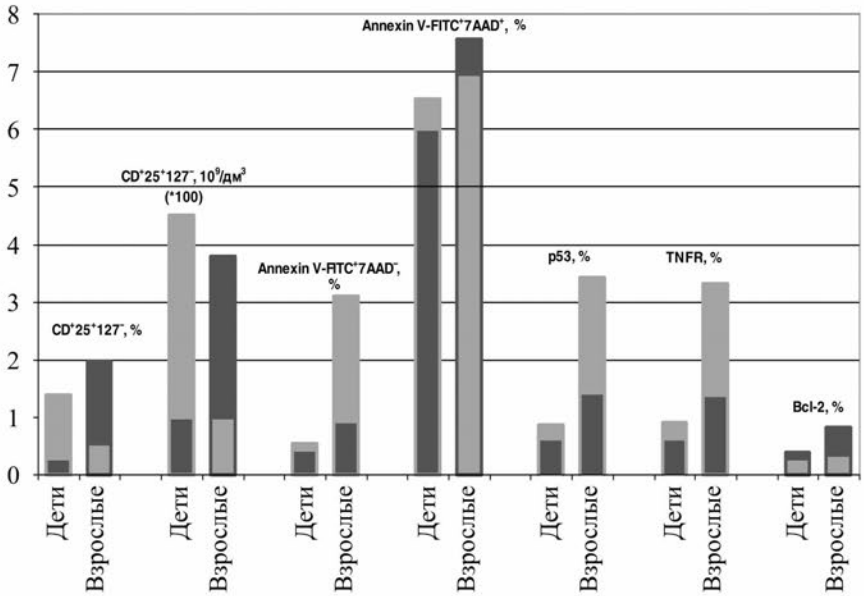


Рис. 35. Мембранные и внутриклеточные маркеры апоптоза и некроза взрослого и детского контингента в условиях комбинированной шумовой и гаптенной нагрузки

Одновременное воздействие комплекса физических (шум) и химических (органические соединения и металлы) факторов внешней и производственной среды усугубляет нарушение апоптоза и способствует передаче рецессивной генетической информации потомству. Причем преимущественная программа клеточной гибели в условиях повышенной гаптенной контаминации реализуется некротическим ее механизмом.

Понятие «программированный некроз» сформировалось на основании данных о том, что существует сигнальный путь инициации некроза в ответ на связывание рецепторами таких молекул, как TNF, на фоне подавления апоптоза [461]. Индуцировать программу некроза можно, если активировать программу апоптоза связыванием таких лигандов, как Fas, TRAIL, или вызывая гиперэкспрессию проапоптотического белка Bax и в то же время либо ингибируя активность каспаз, либо вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков. Программированный некроз в свою очередь может быть подавлен, если на клетки воздействовать антиоксидантами либо подавить активность протеинкиназы RIP [476]. Интересно, что протеинкиназа RIP является одной из мишеней действия каспаз. Это означает, что инициация и осуществление апоптоза активно подавляют развитие некроза в клетках.

Физиологическое значение такого противоборства между апоптозом и программированным некрозом проявляется на двух системах. На клетках, инфицированных вирусом *vaccinia virus*, программированный некроз может быть не только вариантом гибели в условиях подавления апоптоза, но и выполнять функцию усиления иммунных реакций в ответ на инфицирование микроорганизмами.

Отрицательная связь между апоптозом и программированным некрозом прослеживается и при повреждении ДНК, вызванном химическими агентами или ионизирующим излучением. В неопухолевых клетках в этих случаях включаются пункты проверки, действующие во всех фазах интерфазы клеточного цикла и предотвращающие вступление в митоз клеток с нарушенным геномом [461].

В случае нарушения механизмов репарации клетки погибают путем апоптоза. Однако, как оказалось, если в таких клетках с поврежденной ДНК нарушены механизмы осуществления апоптоза, что является достаточно распространенным в трансформированных клетках, клетки погибают путем программированного некроза. Физиологическое значение некроза в такой ситуации имеет двоякий смысл. С одной стороны, программированная гибель клеток путем некроза в отсутствие апоптоза

все же снижает риск передачи дочерним клеткам мутаций [461]. С другой стороны, распад клеток при некрозе может способствовать активации иммунного ответа многоклеточного организма.

На сегодняшний день идентифицировано достаточное количество маркеров, отвечающих за процедуру апоптоза. Одним из таких факторов является VEGF. VEGF (vascular endothelial growth factor, эндотелиальный фактор роста сосудов) – один из членов семейства структурно близких между собой белков, которые являются лигандами для семейства рецепторов VEGF. VEGF играет важную роль в поддержании сосудистой сети опухоли, препятствуя апоптозу незрелых клеток эндотелия. Подавляя созревание дендритных клеток, VEGF препятствует нормальному иммунному ответу, в том числе на опухолевые процессы. Экспрессия VEGF стимулируется множеством факторов, включая эпидермальный ростовой фактор, основной фибробластный ростовой фактор, тромбоцитарный ростовой фактор и интерлейкин-1. Кроме того, уровень VEGF непосредственно регулируется такими факторами окружающей среды, как pH, давление и концентрация кислорода. Общее влияние этих различных факторов заключается в опосредованной через VEGF стимуляции важных для жизнедеятельности организма факторов, включая антиапоптотические белки, молекулы клеточной адгезии и металлопротеиназы.

Нарушение процесса апоптоза приводит к серьезным изменениям в иммунной системе, что может проявляться в развитии различных аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний, вторичных иммунодефицитов [392, 461]. Важна роль апоптоза и в процессах отторжения чужеродных органов и тканей при их трансплантации [415]. Путем программированной клеточной гибели происходит удаление клеток, выживание которых нежелательно для организма, например, мутантных клеток или клеток, зараженных вирусом. Известно, что апоптоз, являясь одним из основных регуляторов состояния иммунной системы, может определять течение и исход беременности [33, 392, 542].

Непосредственные причины апоптической гибели клеток окончательно не установлены, но ряд авторов полагает, что значение имеет истощение энергетических ресурсов клетки. Изменения pH также не связаны с регуляцией апоптоза, а представляют собой сопутствующее явление [142, 497]. По современным представлениям программированная гибель клетки есть результат баланса проапоптических и антиапоптических сигналов для клетки [112, 142]. Преобладание проапоптотических или антиапоптотических влияний определяет выбор направления сигна-

лизации в сторону гибели клетки по механизму апоптоза или ее выживания [262]. Апоптоз возникает при действии различных повреждающих факторов, которые способны вызвать некроз, но действующих в небольших дозах, например, при действии высокой температуры, ионизирующего излучения, противоопухолевых препаратов. Также полученные данные свидетельствуют о кумулятивном повреждающем эффекте множества проапоптотических факторов (окислительный стресс, УФ-излучение, ионизирующая радиация, действие химических препаратов и др.) на клетки организма [81, 407]. При дисбалансе факторов, регулирующих жизненный цикл клетки, возможен некроз.

Несмотря на разнообразие инициирующих факторов, выделяются два основных пути трансдукции (передачи) сигнала апоптоза: рецепторзависимый сигнальный путь с участием рецепторов гибели клетки и митохондриальный путь. Рецепторы смерти принадлежат суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей (TNFR – tumor necrosis factor receptor). Известно более 20 различных членов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и различных рецепторов к ним в количестве 21 [98, 384, 484]. Семейство TNF, кроме TNF-α и TNF-β включает: FAS, FASL, TRAIL, CD40L, CD27L, CD30L, OX40, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DR6, содержащие в цитоплазматическом участке «домен смерти» [484]. Гомология аминокислотной последовательности среди рецепторов семейства TNF высока. Наиболее хорошо изученные рецепторы смерти – Fas и TNFRI.

Среди механизмов биологической гибели наиболее универсальным является механизм специфических рецепторов **Fas (Fas R2, Apo1, CD95)**. Мембранный белок типа I суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли содержит «домен смерти» (DD – death domen). Fas экспрессируется на поверхности многих типов клеток: активированных Т-лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фибробластов, кератиноцитов, трансформированных вирусами, и т.д., их число у человека увеличивается с возрастом. Fas R2 не индуцируется на «покоящихся» Т-клетках $CD45RA^+$ и слабо индуцируется на В-лимфоцитах [33]. С участием CD95 удаляются Т-клетки, которые активируются неспецифически и неполноценно. Помимо функции индуктора клеточной смерти, CD95 может участвовать в запуске пролиферативных сигналов в нормальных диплоидных фибробластах и Т-лимфоцитах человека (рис. 36). Рецептор CD95 (Fas) активирует ряд внутренних белков, включая NF-κB, c-Jun, p53, MAPK3/ERK1, MAPK8/JNK и др. [33, 387].

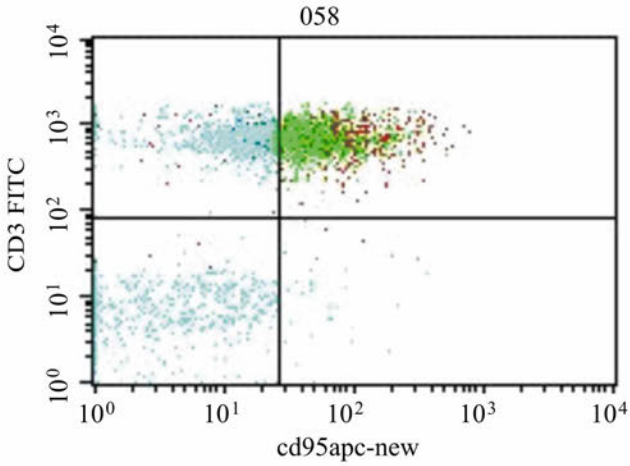


Рис. 36. Анализ образца крови методом проточной цитометрии с идентификацией CD95

CD95 активируется соответствующим антигеном – Fas-лигандом (Fas-L). Считается, что взаимодействие Fas с Fas-L формирует апоптоз-индуцирующий сигнал на поверхности активированных Т-лимфоцитов, но оказывает антиапоптическое действие на покоящиеся Т-клетки [100]. В последние годы появились данные, указывающие на то, что при действии на активированные клетки других стимулирующих факторов Fas/Fas-L-опосредованный апоптоз отменяется [423, 542].

Большинство биологических функций TNF реализуется через TNFRI, активацией которого запускается серия внутриклеточных событий, приводящих к активации главных факторов транскрипции – NF-κB и c-Jun. В то время как TNFRI индуцирует клеточную смерть лишь под воздействием определенных условий, более же часто он индуцирует активацию транскрипции генов, Fas является эффективным индуктором клеточной смерти. Фактор некроза опухоли опосредует провоспалительный ответ, участвует в запуске апоптоза. Возможно антиапоптическое действие TNF-α.

Биологическая функция регуляторных Т-клеток (Treg) – поддержание клонального баланса среди лимфоидных клеток и предотвращение избыточной активации иммунной системы. Наиболее полно изучены естественные регуляторные Treg, маркерами которых служат мембранные молекулы CD4, CD25, и внутриклеточный транскрипционный фактор FoxP3 (forkhead box p3). Однако многие исследователи предлагают антиген CD25 рассматривать как маркер активации, а не в качестве

определяющего маркера Treg [478]. Относительно селективный маркер Трег – FOXP3, играющий существенную роль в дифференцировке Трег, хотя и не все FoxP3-экспрессирующие клетки являются функционирующими Трег [446]. Предполагается, что есть разные пути индукции и дифференцировки Трег. Например, из наивных $CD4^+$-клеток, в результате конверсии $CD4^+CD25^-$-лимфоцитов, а также из эффекторных Т-клеток вследствие хронической антигенной стимуляции [386].

Митохондрии играют центральную роль в интеграции различных механизмов клеточной гибели [443, 491, 551]. Установлено, что изменения митохондрий, такие как освобождение некоторых митохондриальных белков, рассеяние трансмембранной разности потенциалов, продукция активных форм кислорода (АФК), разрушение электронтранспортной цепи и торможение синтеза АТР, участвуют и, возможно, определяют различные аспекты гибели клетки. Белки Bax и Bak являются облигатными индукторами дисфункции митохондрий и инициаторами гибели клеток по механизму апоптоза [486, 531]. Таким образом, митохондрии можно рассматривать как основной переключатель в системе выбора клетки между жизнью и смертью [492]. В мембране митохондрий локализуются протеины ядерных генов Ced9/Bcl-2, одни из которых (Bcl-2, Bcl-xa) ингибируют апоптоз [486, 492], другие (Bax, Bak) – стимулируют его [486]. Соотношение ингибиторов и стимуляторов определяет способность клетки к апоптозу.

4.4.2. Особенности регуляции и формирования апоптоза в условиях средовой нагрузки

Так, у детей в условиях повышенной контаминации биосред ванадием, марганцем ($p<0,05$) оценка мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза выявила достоверно более интенсивную экспрессию белков p53, bcl-2 и TNFR1 относительно значений, полученных в группе контроля ($p<0,05$) (табл. 24). Отмечено, что у детей основной группы Annexin V-$FITC^+7AAD^-$-клетки (1,25 ± 0,14 %) обнаружены в диапазоне контрольных величин (1,72 ± 0,16 %), в то время как V-$FITC^+7AAD^+$-клетки (8,59 ± 0,04 %) достоверно выше контрольных значений (6,70 ± 0,37 %) ($p<0,05$).

Полученные результаты показывают, что у детей, экспонируемых ванадием и марганцем, формируются негативные реакции иммунной системы, в основе которых лежит стимуляция апоптотического сигналинга, реализуемая преимущественно некрозом иммуноцитов (табл. 24).

Таблица 24

Результаты анализа показателей апоптоза у детей, контаминированных ванадием и марганцем (аэрогенное поступление)

Показатель	Контрольная группа (n = 30), $M \pm m$	Основная группа (n = 48), $M \pm m$
p53, %	0,31 ± 0,03	1,62 ± 0,14*
TNFR1, %	0,29 ± 0,02	1,09 ± 0,11*
Bcl-2, %	0,53 ± 0,06	0,74 ± 0,05*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

В то же время при высоких уровнях превышения фоновых концентраций в крови детей органических контаминантов (фенол и формальдегид) статистически значимо снижено количество клеток, вступивших в апоптоз и некроз, относительно значений, полученных в группе контроля (p<0,05) (табл. 25). Также у детей основной группы в 1,4 раза реже определяется внутриклеточный белок bcl-2 – по отношению к контрольным значениям (p<0,05). Однако у детей, проживающих на территории интенсивного освоения, достоверно повышена экспрессия мембранного маркера апоптоза TNFR1 и в 2,6 раза чаще определяется внутриклеточный белок p53 (p<0,05).

Таблица 25

Результаты анализа показателей апоптоза у детей, контаминированных формальдегидом и фенолом (аэрогенное поступление)

Показатель	Контрольная группа, $M \pm m$ (n = 30)	Основная группа, $M \pm m$ (n = 78)
$CD3^+CD4^+25^+127^-$, %	1,43 ± 0,16	1,16 ± 0,12
Annexin V-$FITC^+7AAD^-$, %	1,20 ± 0,09	0,42 ± 0,04*
Annexin V-$FITC^+7AAD^+$, %	10,48 ± 0,58	6,01 ± 0,41*
p53, %	0,31 ± 0,03	0,80 ± 0,08*
TNFR1, %	0,29 ± 0,02	0,63 ± 0,06*
Bcl-2, %	0,53 ± 0,06	0,39 ± 0,03*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Использование методического приема оценки отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах позволило установить достоверное (p<0,05) понижение CD4+, CD25+, CD95+ при увеличе-

нии концентрации фенола, м-крезола (R^2 = 0,24 – 0,90 при p<0,05) и о-крезола (R^2 = 0,93 при p<0,05) в крови, а также повышение CD16+56+, CD19+ лимфоцитов при увеличении концентрации фенола, м-крезола (R^2 = 0,38–0,86 при p<0,05).

Одновременно у детей, у которых в качестве приоритетного маркера экспозиции выступает фенол, поступаемый с питьевой водой, маркеры активационно-индуцированной гибели клетки имеют модифицированный, по сравнению с аэрогенным воздействием, профиль.

Наблюдается статистически значимое снижение количества Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$-клеток, экспрессии TNFR и процента внутриклеточных белков относительно значений, полученных в контрольной группе (p<0,05). Достоверно повышен уровень Annexin V-FITC$^+$7AAD+ -клеток в сравнении с контрольными значениями (p<0,05) (табл. 26).

Таблица 26

Результаты сравнительного анализа отдельных показателей апоптоза у детей, экспонированных фенолом (водный фактор)

Показатель	Контрольная группа (n = 30), $M \pm m$	Основная группа (n = 30), $M \pm m$
Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$, %	1,72 ± 0,16	0,56 ± 0,04*
Annexin V-FITC$^+$7AAD$^+$, %	6,70 ± 0,37	8,80 ± 0,30*
p53, %	0,31 ± 0,03	0,59 ± 0,07*
TNFR, %	0,29 ± 0,02	0,41 ± 0,06*
Bcl-2, %	0,53 ± 0,06	0,20 ± 0,02*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Особенности показателей апоптоза у детей, экспонированных бензолом (индекс превышения концентрации контаминанта в крови над фоновым – 8,5 раза):

– статистически значимо снижены количество Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$ -клеток, экспрессия TNFR и частота определения внутриклеточного белка Bcl-2 относительно значений, полученных в контрольной группе (p<0,05);

– достоверно чаще определяется белок p53 и повышено количество Annexin V-FITC$^+$7AAD+-клеток в сравнении с контрольными значениями (p<0,05) (табл. 27).

Выявленный в данном исследовании дисбаланс субпопуляций лимфоцитов у детей, проживающих в условиях экспозиции органическими

соединениями, свидетельствует об отсутствии адекватного иммунного ответа на антигенный раздражитель (гаптен), об относительном истощении возможностей иммунной системы и неспособности последней к выработке соответствующего ответа на чужеродный агент.

Таблица 27

Результаты сравнительного анализа отдельных показателей иммунного статуса детей, экспонированных бензолом

Показатель	Контрольная группа (n = 48), $M \pm m$	Основная группа (n = 26), $M \pm m$
Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$, %	1,72 ± 0,16	0,42 ± 0,03*
Annexin V-FITC$^+$7AAD$^+$, %	6,70 ± 0,37	10,53 ± 0,43*
p53, %	0,31 ± 0,03	1,09 ± 0,15*
TNFR, %	0,29 ± 0,02	0,86 ± 0,07*
Bcl-2, %	0,53 ± 0,06	0,28 ± 0,02*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Результаты многофакторного моделирования позволили установить достоверную стимуляцию CD95$^+$ r^2 = 0,36 и одновременную супрессию CD4$^+$ r = –0,36 бензолом при p<0,05.

Вредные производственные факторы в силу их высокой интенсивности в сравнении с внешнесредовыми концентрациями вызывают более выраженные нарушения в системе регуляции апоптоза. Так, вредными факторами металлургического производства являются аэрозоли преимущественно фиброгенного действия (пыль, содержащая кремния диоксид кристаллический), аэрозоли металлов (ванадия, марганца и др.), пары и газы (монооксид углерода, оксиды азота, серная кислота и др.), нагревающий микроклимат в сочетании с инфракрасным излучением, шум, отмечается общая и локальная вибрация, тяжесть трудового процесса. Имеет место комбинированный характер воздействия химического фактора, основными компонентами которого являются аэрозоли преимущественно фиброгенного действия и вещества раздражающего действия.

Отмечено, что у работающих в условиях вредного производства достоверно повышено абсолютное число CD25+-клеток и CD4+-клеток относительно значений, полученных в группе контроля (p<0,05).

Оценка иммунного статуса выявила, что у обследуемых основной группы статистически значимо повышено количество CD4$^+$ CD25$^+$127$^-$-лимфоцитов (по относительной и абсолютной величине), по сравнению

с контрольными значениями (p<0,05) (табл. 28). Продемонстрировано, что у работающих в условиях производства достоверно снижена экспрессия p53 и TNFR (p<0,05), а также количество апоптотических клеток относительно значений, зафиксированных в контрольной группе (p<0,05).

Таблица 28

Характеристика показателей регуляции апоптоза в условиях комбинированной производственной нагрузки

Показатель	Контрольная группа (n = 33), $M \pm m$	Основная группа (n = 44), $M \pm m$
$CD4^+$ $CD25^+127^-$, %	0,55 ± 0,06	1,97 ± 0,19*
$CD4^+$ $CD25^+127^-$, 10^9/дм^3	0,01 ± 0,001	0,038 ± 0,004*
p53, %	3,42 ± 0,29	1,44 ± 0,11*
TNFR, %	3,31 ± 0,27	1,39 ± 0,11*
Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$, %	3,09 ± 0,20	0,93 ± 0,06*
Annexin V-FITC$^+$7AAD$^+$, %	6,96 ± 0,51	7,57 ± 0,47

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Определение причинно-следственной связи между клеточной регуляцией и специфической химической контаминацией на основе математического моделирования (вероятность модификации эффекта по отношению к норме при изменении концентрации контаминанта в биосреде) выявило недействующие уровни для ванадия и кремния (табл. 29).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существовании антигенной стимуляции у работающих в условиях вредного производства, что способствует перестройке рецепторов лимфоцитов и изменению внутриклеточного белка p53, вместе с другими белками отвечающего за клеточный ответ на присутствие антигена (гаптена) в организме.

Известный ген p53 ответственен за синтез протеина p53, он локализуется в ядре клетки и регулирует экспрессию генов, блокирующих клеточный цикл. Белок p53, вызывая остановку деления клетки, предупреждает появление мутантных клеток. Гены семейства Bcl-2 контролируются геном p53, но эффект последнего неоднозначен, он может стимулировать и пролиферацию, и апоптоз, поэтому исход зависит от особенностей программы клеточной линии, наличия цитокинов, а также ряда других факторов. В ряде случаев апоптоз реализуется в результате комбинированного действия двух путей – с участием и рецепторов плазматической мембраны, и митохондриального цитохрома С.

Таблица 29

Параметры моделей зависимости
«маркер экспозиции – маркер эффекта»

Маркер экспозиции	Маркер эффекта	Направление изменения показателя	b_0	b_1	R^2	F	p	НУ
Ванадий	CD3+CD25+, %	Понижение	–0,19 ± 0,0001	16,33 ± 5,21	0,56	51,20	0,000	0,0028
	CD3+CD25+, 10^9/дм^3	Понижение	–1,78 ± 0,0007	37,18 ± 87,62	0,30	15,77	0,000	–
Кремний	CD3+CD25+, %	Понижение	–1,45 ± 0,1059	0,573 ± 0,02	0,44	18,30	0,000	1,7158
	CD3+CD95+, %	Понижение	–2,72 ± 0,2178	1,233 ± 0,05	0,61	31,72	0,000	–

Важная роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы принадлежит цитокинам. Взаимодействуя со специфическими клеточными рецепторами, цитокины могут оказывать влияние на жизнеспособность клетки. Эффект цитокинов на клетки неоднозначен: для одних клеток они выступают в роли индуктора апоптоза, для других – в роли ингибитора. Это зависит от типа клетки, от стадии ее дифференцировки, от функционального состояния клетки. При этом один и тот же цитокин (IL-2, IL-4, TNF-α и др.) может оказывать разное, даже разнонаправленное действие в зависимости от его концентрации, типа специфического рецептора на клетке и ее активационного состояния [29, 190]. Цитокины не депонируются в организме человека, а синтезируются только после соответствующего сигнала, который распознается и воспринимается через специально встроенный на поверхности клеток рецептор [215].

Следовательно, апоптоз является широко распространенным общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток, формообразование, выбраковку дефектных клеток. Дальнейшее изучение механизмов апоптоза является перспективным, так как от соотношения уровня пролиферации и гибели клеток зависит прогрессирование различных заболеваний. Изучение механизмов регуляции процесса при различной патологии позволит в перспективе способствовать более глубокому пониманию механизмов патогенеза заболеваний, улучшению дифференциальной диагностики и созданию принципиально новых направлений терапии.

Апоптоз может запускаться в разных фазах клеточного цикла, в том числе и собственно в митозе в форме митотической катастрофы. Однако если в пролиферирующих клетках подавлены механизмы апоптоза, например, инактивированы каспазы, то гибель пролиферирующих клеток осуществляется по механизму программированного некроза.

Известно, что в контроле над процессом запрограммированного некроза ключевую роль играет белок, известный как ALKBH7 [483]. Белок ALKBH7 принадлежит к семейству белков, обнаруженных около десяти лет назад в кишечной палочке *E. coli* как часть механизма репарации ДНК. В организме человека есть девять различных белков ALKBH. Путь запрограммированного некроза, по-видимому, инициируется ферментом PARP, который гиперактивируется вслед за повреждением ДНК и выключает синтез клеткой двух молекул-переносчиков энергии – АТФ и НАД. Установлено, что ALKBH7 предотвращает возвращение уровней АТФ и НАД к норме путем нарушения функций клеточных генераторов энергии – митохондрий. Без достаточного количества этих жизненно важных молекул клетка не может выжить и подвергается некрозу. В клетках, в которых нет ALKBH7, уровни АТФ и НАД восстанавливаются, и клетки выживают, имея повреждения ДНК.

Нарушение регуляции жизненного цикла клетки при неблагоприятных условиях, в том числе в условиях влияния техногенных химических факторов, на уровне организма может возникнуть, когда выраженной патологии нет, но есть совокупность функциональных нарушений, которые держат организм в состоянии, далеком от нормы и готовым патологически реагировать на возмущения различной природы. Очевидно, при длительном воздействии на организм человека некоторых факторов, вызывающих нарушения регуляции жизненного цикла клетки и в конечном итоге нарушение регуляции иммунитета, можно ожидать развития аллергических, аутоиммунных болезней и т.д.

4.4.3. Особенности стронцийопосредованной регуляции апоптоза

Стронций (лат. *Strontium*), Sr – химический элемент II группы периодической системы Менделеева, атомный номер 38, атомная масса 87,62, серебристо-белый металл. Природный стронций состоит из смеси четырех стабильных изотопов: 84Sr, 86Sr, 87Sr и 88Sr; наиболее распространен 88Sr (82,56 %).

Стронций в природе. Среднее содержание стронция в земной коре (кларк) $3{,}4 \cdot 10^{-2}$ % по массе, в геохимических процессах он является спутником кальция. Известно около 30 минералов стронция; важнейшие – целестин $SrSO_4$ и стронцианит $SrCO_3$. В магматических породах стронций находится преимущественно в рассеянном виде и входит в виде изоморфной примеси в кристаллическую решетку кальциевых, калиевых и бариевых минералов. В биосфере стронций накапливается в карбонатных породах и, особенно, в осадках соленых озер и лагун (месторождения целестина).

Стронций в организме. Стронций – составная часть микроорганизмов, растений и животных. У морских радиолярий (акантарий) скелет состоит из сульфата стронция – целестина. Морские водоросли содержат 26–140 мг стронция на 100 г сухого вещества, наземные растения – 2,6, морские животные – 2–50, наземные животные – 1,4, бактерии – 0,27–30. Накопление стронция различными организмами зависит не только от их вида, особенностей, но и от соотношения в среде стронция с другими элементами, главным образом с Са и Р, а также от адаптации организмов к определенной геохимической среде. Животные получают стронций с водой и пищей. Всасывается стронций тонким, а выделяется в основном толстым кишечником. Ряд веществ (полисахариды водорослей, катионообменные смолы) препятствует усвоению стронция. Главное депо стронция в организме – костная ткань, в золе которой содержится около 0,02 % стронция (в других тканях – около 0,0005 %). Избыток солей стронций в рационе крыс вызывает «стронциевый» рахит. У животных, обитающих на почвах со значительным количеством целестина, наблюдается повышенное содержание стронция в организме, что приводит к ломкости костей, рахиту и другим заболеваниям. Избыточное содержание этого элемента в почвах, водах и продуктах питания вызывает «уровскую болезнь» у человека (по названию реки Уров в Восточном Забайкалье) – поражение и деформацию суставов, задержку роста и другие нарушения.

Стронций и иммунная система. Воздействие факторов внешней среды может задержать развитие иммунной системы вплоть до инволюции органов иммунитета (например, трансцендентальная трансформация вилочковой железы). Феномен задержки иммунитета может проявиться не сразу после воздействия, но в отдаленные периоды жизни. В то же время под влиянием эндогенных факторов, особенно на самых ранних этапах развития иммунной системы, имеет место феномен им-

претинга, т.е. «запечатлевания» реакций, когда антигенные раздражители ускоряют созревание отдельных клеточных клонов [38].

Ионы стронция близки ионам кальция и могут замещать последние в организме, что и является основным типом действия соединений этого элемента. Стронций биологически конкурирует с кальцием. Показано, что ионы стронция, имея иной диаметр, нежели ионы кальция, способны блокировать ионные каналы для последнего, что может определить ингибирующее влияние стронция на иммунную реакцию, характерное для естественных киллеров [159, 537], а также воздействие на другие клетки организма [159, 184, 492].

При стимуляции внеклеточным стронцием на остеокластах Ca-распознающего рецептора происходят транслокации ядерной NF-kB, что приводит к апоптозу клетки, данный ответ имеет дозозависимый эффект [492]. Как было показано ранее, кальций и стронций оказывают влияние на остеокласты опосредовано через Ca-чувствительный рецептор и тем самым индуцируют апоптоз. Однако для передачи сигнала к фактору транскрипции Ca и Sr используются различные сигнальные пути (рис. 37).

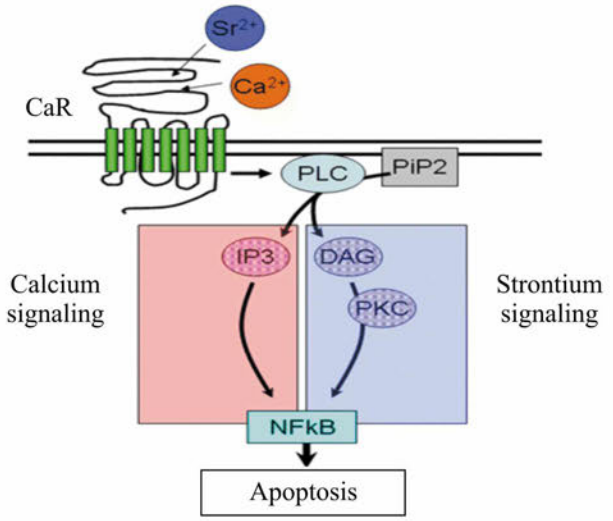


Рис. 37. Принципиальная схема воздействия на Ca-распознающий (чувствительный) рецептор: CaR – sensing receptor; IP 3 – inositol 1,4,5-trisphosphate; PLC – phospholipase C; PKC – protein kinase C; NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells [492]

Очевидно, что в условиях воздействия стронция как внешнесредового фактора формируются негативные реакции иммунной системы, способные снижать адаптационные возможности организма. Количест-

венные и качественные изменения в иммунной системе, проявляющиеся перераспределением внутрипопуляционных группировок по отдельным параметрам, зависят от характера действующего фактора. Существует необходимость обоснования комплекса иммунологических маркеров, которые в той или иной комбинации могли бы в полном объеме идентифицировать ответ иммунной системы на специфическую экспозицию.

Чрезвычайный интерес с точки зрения регуляции жизненного цикла клетки и презентации наивным клеткам антигена представляет изучение экспрессии иммуноцитами и спленоцитами селектинов. Особый интерес вызывает экспрессия L-селектина ($CD62L^+$) в условиях экспозиции кальцием и его антагонистами, например, стронцием. Селектины – это группа молекул межклеточной адгезии, которые связываются с углеводами. Селектины относятся к семейству трансмембранных молекул межклеточной адгезии. Внеклеточный N-концевой домен селектина содержит лектиноподобный домен, EGF-подобный модуль, а также различное число модулей, сходных с наблюдаемыми в определенных комплементсвязывающих белках. Наличие лектиноподобного домена позволяет селектинам «распознавать» нейраминидазачувствительные углеводы на поверхности других клеток и связываться с этими клетками углеводными лигандами, осуществляя Ca_2-зависимую межклеточную адгезию. Группа селектинов включает E-селектин, P-селектин и L-селектин, экспрессируемые на эндотелии, тромбоцитах и некоторых типах лейкоцитов. Молекулы селектинов пронизывают мембрану и имеют ряд внеклеточных доменов, гомологичных доменам регуляторных белков комплемента. Внеклеточная часть их доменов содержит также домен, близкий по структуре рецептору для фактора роста эпидермиса, и N-концевой домен, обладающий лектиноподобными свойствами, т.е. связывающий углеводные остатки (отсюда и название «селектины»). Соответственно этому в состав лигандов, с которыми связываются селектины, входят углеводы. Углеводные лиганды для селектинов встречаются в структуре разнообразных белков. Так, многочисленные углеводные остатки, которые служат лигандами для L-селектина, содержат гликопротеин Sgp-200, экспрессируемый на эндотелии ВЭВ. Вследствие связывания L-селектина с этими углеводными остатками лимфоциты из кровотока направляются в периферические лимфоузлы.

Большинство клеток периферической крови демонстрируют более высокую по сравнению с клетками селезенки экспрессию $CD62L^+$-антигена (табл. 30). Исследование экспрессии CD62L на лимфоцитах

периферической крови у мышей опытной группы не выявило статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой. Цитофлуориметрический анализ экспрессии CD62L-маркера на спленоцитах показал, что у мышей опытной группы статистически значимо ($p < 0{,}05$) повышается количество $CD62L^+$-клеток по сравнению с результатами, идентифицированными у интактных животных. Установлено, что при поступлении в организм животных стронция статистически значимо ($p < 0{,}05$) в 2 раза снижается коэффициент, характеризующий соотношение доставки, презентации антигена и готовности лимфоцита к реализации иммунного ответа ($CD62L^+$кровь/$CD62L^+$селезенка). Процентное содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих поверхностный фенотип $CD62L^+$, зависит от активационных процессов в периферических лимфоидных органах (селезенка). В нашем исследовании можно предположить, что пороговая концентрация стронция вызывает снижение процессов активации иммунокомпетентных клеток на уровне вторичных лимфоидных органов.

Таблица 30

Показатели индуцированной стронцием экспрессии $CD62L^+$-рецептора в эксперименте

Показатель	Контрольная группа (n = 8)	Опытная группа (n = 16)
Кровь, $CD62L^+$, %	21 [19; 31]	24 [20,5; 26] $^{p = 0{,}910}$
Селезенка, $CD62L^+$, %	2 [1,5; 3]	4 [3; 5] $^{p = 0{,}047}$
$CD62L^+$кровь/$CD62L^+$селезенка	12,8 [8; 20]	5,75 [4,3; 8] $^{p = 0{,}047}$

Примечание: p – различие между группами по критерию Манна–Уитни.

Согласно литературным данным, длительное поступление с питьевой водой малых доз стронция нарушает способность иммунной системы мышей отвечать на антигенную стимуляцию, что согласуется с результатами данного исследования.

Поступление в организм животных действующих доз Sr^{2+} взывает изменения ранней клеточной дифференцировки Т-лимфоцитов, значительное увеличение количества клеток, оказывающих супрессорный эффект. Изменение клеточного состава иммунокомпетентных клеток и нарушение их функциональной активности наблюдалось в костном мозге, селезенке, тимусе, лимфатических узлах и периферической крови опытных животных. Селезенка является местом антигензависимой дифференцировки, активации Т-лимфоцитов и развивает реакции на ан-

тигены, попадающие в кровь. Важная функция в регуляции кинетики пула иммунокомпетентных клеток принадлежит L-селектину (CD62L, Ly-22, LAM-1, LECAM, MEL-14), также CD62L может функционировать как рецептор сигнализации, изменяя транслокацию ряда генов. Снижение экспрессии L-селектина и, как следствие, повышение уровня растворимых форм молекул клеточной адгезии описано в патогенезе многих заболеваний и является маркером клеточной активации.

Шеддинг (индуцированная потеря рецепторов клеточной мембраной) чаще всего является следствием активационных процессов, затрагивающих различные популяции клеток. Шеддинг CD62L возможен в результате внеклеточного накопления АТФ и повышения ядерной транслокации NF-kB (ядерный фактор kB). АТФ, стимулируя пуринергические рецепторы P2Y, модулирует активность фосфолипазы С и повышает активность NF-κB. Изменение экспрессии CD62L также может осуществляться при активации PI3K/Akt-зависимого (фосфотидилинозитол-3-киназа / протеинкиназа В) сигнального пути. Стронций способен трансформировать компоненты клеточных сигнальных путей ERK1/2 (экстраклеточно-регулируемая протеинкиназа), Akt и Wnt, модифицировать активность фактора транскрипции NF-kB и тем самым изменять экспрессию поверхностных антигенов клетки. Механизм действия стронция в значительной степени связан с изменением концентрации АТФ во внеклеточной среде. Кальций и стронций могут воздействовать на один кальцийчувствительный рецептор, но при этом вызывать активацию различных сигнальных путей. Так, в системе *in vivo* стронций вызывает транслокацию NF-κB из цитоплазмы в ядро через активацию DAG-PKCβII (диацилглицерол-протеинкиназа С βII) сигнального пути, а кальций – через PI_3-зависимый (инозитол-1,4,5-трифосфат) путь. Эта разница в соответствующих сигнальных каскадах позволяет Sr^{2+} усиливать Ca^{2+}-индуцированный ответ клетки и наоборот. На клеточной линии RAW 264.7 установлено, что с увеличением дозы Sr^{2+} происходит снижение ядерной транслокации NF-kB и AP-1 (активирующий протеин-1), а эффект, оказываемый стронцием на активационные процессы клетки, является зависимым от типа клетки и дозы стронция. Один из возможных молекулярных механизмов снижения активации лимфоцитов под влиянием стронция может быть объяснен изменением активности транскрипционного фактора NF-kB. Сложность устройства и особенности ядерной транслокации NF-kB позволяют клетке различным образом реагировать на всевозможные стимулы, что

ведет к неодинаковым последствиям. Молекулярный механизм торможения шеддинга CD62L в присутствии дозы стронция 1 мг/кг не исключает действия Sr^{2+} на уровне плазматической мембраны, вызывая конформационные изменения рецептора, что требует дальнейшего изучения. В ходе настоящего исследования установлено модифицирующее влияние Sr^{2+} на активационные процессы в клетке, что согласуется с результатами, представленными другими авторами.

Очевидно, что стабильный стронций при дозовой нагрузке 1 мг/кг ингибирует шеддинг CD62L на спленоцитах, не изменяя экспрессию L-селектина на лимфоцитах периферической крови. Стабильный стронций оказывает воздействие на активационную способность клеток, что обусловлено способностью металла модифицировать экспрессию ряда белков (например селектина), тем самым трансформировать следующий за этим каскад молекулярных событий, характерных для иммуносупрессии. Отражением этих событий может служить коэффициент $CD62L^{+}$кровь/$CD62L^{+}$селезенка, снижение которого более чем в 2 раза может служить ранним критерием иммунотоксического эффекта стронция.

Изменения иммунитета загрязнителями окружающей среды могут привести к увеличению риска развития отдельных заболеваний, причинами которых часто являются нарушения клеточной регуляции. Нарушение регуляции запрограммированной гибели клеток может быть причиной развития тяжелых патологических процессов в организме. При повышении клеточной выживаемости, то есть ингибиции апоптоза развиваются рак, аутоиммунные заболевания, а также вирусные инфекции, нейропролиферативные заболевания, такие как шизофрения и аутизм, и др. Понижение клеточной выживаемости, а следовательно, активация апоптоза, играет роль в патогенезе СПИДа, нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, ишемических состояний, например, инсульт и инфаркт, диабет [498]. Очевидно, трансформация апоптоза приводит к возникновению ряда заболеваний, связанных с усилением или ингибированием апоптоза. Ввиду этого изучение и расшифровка механизмов дизрегуляции летальной программы клетки в условиях воздействия химических факторов малой интенсивности обусловливает целесообразность проведения исследований иммунной системы в условиях техногенной нагрузки [383].

Вместе с тем в сложившихся эколого-гигиенических и социально-экономических условиях, несмотря на многочисленные работы, посвященные изучению влияния неблагоприятных факторов окружающей

среды на здоровье населения и, в частности, на дисфункцию иммунной системы, многие вопросы остаются нерешенными. Не в полной мере определено значение техногенных химических факторов в развитии иммунопатологии, что затрудняет проведение комплекса профилактических и реабилитационных мероприятий по данному классу заболеваний. Кроме того, зависимости состояния здоровья населения от качества среды обитания имеют свои региональные особенности.

Сравнительный анализ внутриклеточных маркеров апоптоза выявил, что у детей, проживающих на территориях, где приоритетным внешнесредовым фактором являются органические соединения, статистически значимо в 2,5 раза повышен процент определения транскрипционного фактора p53 и достоверно реже, относительно контрольных значений (p<0,05), определяется bcl-2 (табл. 31). Однако у обследуемых детей с территории, где основным негативным внешнесредовым фактором являются тяжелые металлы, наблюдается достоверное повышение аналогичных показателей в сравнении с контрольными величинами (p<0,05).

Оценка иммунного статуса продемонстрировала, что у работающих в условиях экспозиции тяжелыми металлами статистически значимо снижено количество p53 относительно цифр, полученных в контрольной группе (p<0,05) (см. табл. 31).

Таблица 31

Результаты сравнительного анализа внутриклеточных маркеров апоптоза у обследованных детей, %

Показатель	Контрольная группа (n = 48), $M \pm m$	Основная группа		
		Пермский район (n = 88), $M \pm m$	Орджоникидзевский район (n = 78), $M \pm m$	г. Чусовой (n = 48), $M \pm m$
p53	0,31 ± 0,03	0,80 ± 0,01*	0,80 ± 0,08*	1,62 ± 0,14*
Bcl-2	0,53 ± 0,06	0,37 ± 0,03*	0,39 ± 0,03*	0,74 ± 0,05*
p53	3,42 ± 0,29	–	–	1,44 ± 0,11*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Таким образом, органические соединения и тяжелые металлы способствуют дисфункции иммунной системы, причем характер их воздействия является разнонаправленным и усугубляется в зависимости от времени воздействия и дозы экспозиции, а также проявляется снижением компенсаторной возможности организма в условиях постоянной антигенной (гаптенной) нагрузки.

4.4.4. Экспериментальные модели нарушений апоптотической регуляции иммунного ответа в системе *in vitro*

Отмечено, что в системе *in vitro* в биосредах обследуемых, чей стаж в условиях производства меньше 10 лет, при добавлении референтной концентрации ванадия статистически значимо повышается количество Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$-клеток относительно величин, полученных в контрольной пробе (p<0,05) (табл. 32).

Таблица 32

Характеристика показателей иммунного статуса работающих с учетом контаминантной нагрузки ванадием ($M \pm m$), %

Стаж, лет	Показатель	Проба без добавления ванадия	Проба с референтной концентрацией ванадия
7,00 ± 0,90 (n = 9)	Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$	0,94 ± 0,07	1,18 ± 0,08*
	Annexin V-FITC$^+$7AAD$^+$	6,81 ± 0,65	7,12 ± 0,92
16,00 ± 1,88 (n = 9)	Annexin V-FITC$^+$7AAD$^-$	1,27 ± 0,13	1,17 ± 0,22
	Annexin V-FITC$^+$7AAD$^+$	8,02 ± 1,51	6,98 ± 1,03

Одной из приоритетных задач современной науки является поиск путей модуляции механизма работы клеток в направлении стимуляции или блокирования апоптоза. Преобладание проапоптотических или антиапоптотических влияний определяет выбор направления сигнализации в сторону гибели клетки по механизму апоптоза или ее выживания. Активация апоптотической гибели клетки ванадием может привести к возникновению иммунодефицитных состояний.

Маркерные иммунологические тесты, отражающие нарушения апоптотической регуляции иммунного ответа органическими соединениями in vitro

Анализ результатов эксперимента позволил установить, что при внесении в кровь референтной концентрации хлороформа достоверно повышается абсолютное количество CD25$^+$-лимфоцитов (p<0,05) относительно результатов, зафиксированных в контрольной пробе. Выявлено, что в опытной пробе статистически значимо снижается число апоптотических (Annexin V-FITC$^+$PI$^-$) и некротических (Annexin V-FITC$^+$PI$^+$) клеток, по сравнению со значениями, полученными в пробе без добавления хлороформа (p<0,05) (табл. 33).

Ингибирование активационно-индуцированной гибели лимфоцитов в условиях воздействия органических соединений может служить сигналом для иммунопролиферативных состояний. Активация апопто-

тической гибели клетки тяжелыми металлами может привести к возникновению иммунодефицитных состояний. Таким образом, техногенная химическая нагрузка запускает разнонаправленные иммунные реакции, характеризующие экспозицию хлорсодержащих соединений и тяжелых металлов

Таблица 33

Характеристика показателей иммунного статуса обследуемых с учетом контаминантной нагрузки хлороформом ($M \pm m$) (n = 66)

Показатель иммунограммы	Проба без добавления хлороформа	Проба с референтной концентрацией хлороформа	Достоверность различий (p)
$CD25^+$, %	6,36 ± 0,44	6,28 ± 0,38	0,2071
$CD25^+$, 10^9/л	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,0361
$CD95^+$, %	27,14 ± 1,87	27,00 ± 1,98	0,3889
$CD95^+$, 10^9/л	0,88 ± 0,06	0,88 ± 0,06	0,3610
Annexin V-$FITC^+PI^-$, %	1,07 ± 0,05	0,86 ± 0,06	0,0420
Annexin V-$FITC^+PI^+$, %	13,12 ± 0,63	10,21 ± 0,67	0,0234

Учитывая степень реально существующего в настоящее время загрязнения окружающей среды химическими факторами природного и техногенного происхождения, их способность к материальной и функциональной кумуляции, исследования по установлению особенностей апоптоза как адаптационной реакции иммунитета на их воздействие приобретают приоритетное значение. Накопленная база фундаментальных исследований в этой области уже сегодня позволяет решать вопросы их использования в практике здравоохранения. Разработанные оригинальные диагностические алгоритмы для выявления групп риска в регионах, эндемичных по природной и антропогенной нагрузке, основу которых составляют маркеры апоптоза клеток иммунной системы, уже сегодня успешо используются нами и готовы для тиражирования.

Следовательно, выявление реальной и потенциальной опасности загрязнения среды обитания и условий труда для здоровья населения приобретает особую актуальность и обусловливает необходимость реализации концепции гигиенической безопасности населения России [299].

5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ

Здоровье человека постоянно подвергается негативному воздействию химических мутагенов. Одним из древних биологических механизмов выживания человеческой популяции является биологическое разнообразие индивидуумов, обусловленное генетическим полиморфизмом.

В связи с этим актуальной проблемой будет разработка методов выявления адаптивности отдельного человека и популяции к действию химических мутагенов, связанной с полиморфизмом генов.

Вследствие генетической гетерогенности популяции человека в ней присутствуют индивиды, генетические особенности которых обусловливают повышенную чувствительность к действию мутагенов.

Восприимчивость организма к воздействию техногенных химических факторов в значительной мере зависит от особенностей генетических ассоциаций, определяющих: активность ферментов системы детоксикации ксенобиотиков; активность факторов, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях; состояние белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям; активность состояния компонентов иммунного ответа.

При этом особый интерес вызывают вопросы функциональной организации генома и особенностей генетического полиморфизма (рис. 38).

Необходимость перехода в оценке генома человека от отдельных индивидов к более детальному анализу популяционных структур настоятельно требует исследований по выявлению мутаций, связанных с проявлением изменчивости внутри небольших локальных популяций. Такая изменчивость известна как полиморфизм.

Полиморфные гены – это гены, которые представленны в популяции многообразием аллелей *(различные формы одного и того же гена),* что обусловливает разнообразие внутривидовых признаков. По данным научной литературы распространенность минорного аллеля в популяции занимает в среднем 10 % по большинству значимых полиморфизмов.

Основой фенотипического полиморфизма является полиморфизм генетический. Таким образом, генетический полиморфизм – долговременное существование в популяции двух и более генотипов, частоты которых достоверно превышают вероятность возникновения соответствующих повторных мутаций.

Рис. 38. Полиморфизмы и их ассоциации со средой обитания

Генетический полиморфизм (ГП) может быть качественным, когда происходят замены нуклеотидов, либо количественным, когда в ДНК варьируется число нуклеотидных повторов различной протяженности. Тот и другой виды ГП встречаются как в смысловых (белок-кодирующих), так и во внегенных последовательностях молекулы ДНК. Идентификация однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), то есть замены одного нуклеотида другим, решает вопрос оценки качественного полиморфизма.

Выявление структуры генов, кодирующих все белковые молекулы человека, а также внедрение в рутинную лабораторную практику новых диагностических технологий тестирования различных генных полиморфизмов (варианты одного и того же гена в популяции) позволяет предсказывать риски развития определенных заболеваний у конкретного индивидума. В частности, генетическое тестирование позволяет выяснить, есть ли наследственная предрасположенность к нарушениям детоксикации лекарственных и других ксеногенных соединений, облысению, развитию рака молочной железы, артериальной гипертензии, различным сердечно-сосудистым заболеваниям, а также к развитию многочисленных осложнений течения беременности.

Развитие исследований и методической базы в этом направлении необходимо для профилактического обеспечения путей защиты и стабилизации генома человека в условиях возрастающего загрязнения окружающей среды.

5.1. Полиморфизм генов и его верификация

Принципы верификации генетического полиморфизма (маркеры чувствительности) включают в себя оценку групп генов, отражающих особенности обменных, топических (органных), иммунных и детоксикационных процессов.

♦ *Идентификация мутаций генов ферментов 1-й и 2-й фазы детоксикации* (метаболизм и конъюгация) органических и металлоорганических соединений (лекарственные вещества, техногенные химические факторы) – подсемейство генов цитохрома, метилентетрагидрофосфатредуктаза, глутатион-трансфераза, копропорфириноксидаза, сульфтрансаминаза, супероксиддисмутаза-2, цинк-металлопептидаза.

♦ *Полиморфизм генов белков, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях:* ген эластазы (легкие), ген эндотелиального фактора роста (эндотелий сосудов), ESR1-эстроген (женская репродуктивная сфера), DRD2-дофаминовый рецептор (нервная система), NO-синтаза (эндотелий сосудов), и обменных процессах – TERT (теломераза), SIRT1 (сиртуин), семейство генов PRAR (энергетический обмен), APO-E-аполипопротеин (жировой обмен), ACE-ген ангиотензинконвертирующего фермента (общие обменные процессы), GCCR-глюкокортикоидный рецептор (углеводный обмен).

♦ *Генотипирование предрасположенности к онкопролиферативным состояниям:* BRCA (онкология женской репродуктивной сферы), MMP-металлопротеиназа (онкология легких), TERT-теломераза (общая онкология), p53 (транскрипционный фактор, наличие которого препятствует развитию онкологического процесса).

♦ *Определение иммуногенетических маркеров:* TLR4 (толл-рецептор 4) (иммунный «сигнальный рецептор» опасности), FAS (цитокиновый рецептор запускающий апоптоз), FOXP3 (белок клеток супрессоров, выполняющий функцию торможения в иммунной системе), TNF-α (цитокин), p53 (транскрипционный белок – внутриклеточный фактор апоптоза), HLA DR (фактор гистосовместимости).

Методический алгоритм идентификации SNP базируется на ключевых положениях методических рекомендаций «Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов» (МР 4.2.0075-13 от 20.08.2013 г.).

Для диагностики генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки на основании изучения специализированной литературы нами подобраны *гены и их участки в качестве маркеров чув-*

ствительности вероятных рисков возникновения индуцированных средой нарушений здоровья: цитохрома P-450 – *CYP1A1* (rs4646421 и rs1048943), копропорфириногеноксидазы – *CPOX* (rs1131857), метилентетрагидрофолатредуктазы (rs1801133) – *MTHFR*, эндотелиальной NO-синтазы – *eNOS* (rs1799983), белка аполипопротеина E – *ApoE* (rs429358), матриксных протеиназ – *MMP9* и *MMP12* (rs17576 и rs652438), сульфотрансферазы – *SULT1A1* (rs9282861), онкогенов – *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53* (rs3950989, 1801439, 1042522), гена рецептора эстрогена – *ESR1* (rs2228480) и промоторной области гена – *TNFA* (rs1800629) фактора некроза опухолей, GSTA4 (глутатион-трансфераза), SOD2, ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), TERT, DRD2, SIRT1, TLR4 (толл-рецептор 4), PPAR, FAS FOXP3, VEGF, APO-E, NO-синтаза, ACE.

Для определения генотипа человека использовали метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров (рис. 39).

Рис. 39. Приборная база идентификации SNP методом полимеразной цепной реакции

Статистическая обработка данных генетического обследования осуществлялась по накопленным массивам данных отдельно по каждому гену для двух групп: опытной и контрольной. Использовались статистические методы для описания равновесия частот генотипов и аллелей генов по равновесию Харди–Вайнберга. Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (*OR*) для различных моделей наследования: аддитивной, общей, мультипликативной, доминантной и рецессивной и считались достоверными при $p < 0{,}05$.

5.2. Гены системы детоксикации ксенобиотиков

Биотрансформация (детоксикация) всех чужеродных веществ, в том числе любых лекарственных препаратов, попадающих в организм, обеспечивается сложной метаболической системой, представленной многочисленными ферментами. Гены, контролирующие синтез соответствующих ферментов, ранее называли генами внешней среды (environmental genes). В настоящее время их объединяют под общим названием «гены метаболизма».

Многочисленные эпидемиологические исследования указывают на то, что практически все широко распространенные заболевания, включая почти 90 % всех онкологических заболеваний, в той или иной степени связаны с действием неблагоприятных внешних факторов. Различные химические токсины (циклические ароматические углеводороды, нитрозосоединения, ароматические амины), воздействуя на организм, могут провоцировать начало этих заболеваний. В зависимости от особенностей генома различные индивиды могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам. Гены, кодирующие ферменты системы детоксикации, характеризуются генетическим полиморфизмом и обнаруживают существенные популяционные, этнические и расовые вариации, связанные с исторически сложившимися традициями, различиями продуктов питания, географической средой обитания, эпидемиями инфекционных заболеваний и пр.

Большинство ксенобиотиков, попадая в организм, не оказывают прямого биологического эффекта, а вначале подвергаются различным превращениям, так называемой биотрансформации, которая завершается их выведением из организма. Как правило, она представляет собой многоступенчатый, «каскадный» процесс, в котором одновременно или поочередно участвуют многие ферменты системы детоксикации. В наиболее типичном варианте биотрансформация ксенобиотиков представлена трехэтапным процессом, включающим в себя активацию (1-я фаза), детоксикацию (2-я фаза) и выведение (3-я фаза). Иногда выделяют еще 0-ю фазу, которая отвечает за препятствие всасывания ксенобиотиков в кишечнике (гликопротеин Р).

5.2.1. Гены 1-й фазы детоксикации

Первая фаза (фаза активации) называется также фазой функционализации или модификации, отвечает за комплекс биохимических реакций, в процессе которых ксенобиотики за счет освобождения активных групп (таких как OH, NH_2, SH) превращаются из липофильных в более гидрофильные соединения.

В результате действия ферментов 1-й фазы происходит активация ксенобиотиков с образованием промежуточных электрофильных метаболитов (свободные радикалы, перекиси, активные кислород и азот). Фаза активации обеспечивается, главным образом, суперсемейством цитохрома P-450 (CYP), а также многочисленным семейством нецитохромных окислителей (гидролазы, эстеразы, амидазы, дегидрогеназы и др.). Их основные функции заключаются в присоединении к молекуле ксенобиотика гидрофильных групп, благодаря чему происходит детоксикация десятков тысяч веществ. Однако в большинстве случаев ферменты 1-й фазы осуществляют в клетке метаболическую активацию ксенобиотиков, что сопряжено со значительной опасностью для клетки

Цитохромы P-450

Суперсемейство цитохромов P-450 (CYP-450) отвечает за микросомальное окисление и представляет собой группу ферментов, имеющих множество изоформ (более 1000), которые не только осуществляют метаболизм лекарств, но и участвуют в синтезе стероидных гормонов, холестерина и других веществ. Изоферменты цитохромов на основании гомологии нуклеотидной и аминокислотной последовательностей подразделяют на семейства, которые в свою очередь делят на подсемейства. Каждый изофермент цитохрома P-450 кодируется своим геном, которые локализуются на разных хромосомах. Часть таких генов имеет близко расположенные к ним псевдогены (неэкспрессирующие копии), которые существенно осложняют проведение генетического тестирования. Вследствие полиморфизма генов метаболизма активность соответствующих ферментов у разных лиц может существенно варьироваться. В зависимости от этих межиндивидуальных особенностей выделяют три группы лиц, различающихся по активности того или иного фермента метаболизма. Это так называемые «экстенсивные» метаболизаторы – лица с нормальной скоростью метаболизма (основная часть популяции), «медленные» метаболизаторы – лица со сниженной скоростью метаболизма – и «быстрые» («сверхактивные») метаболизаторы – индивиды

с повышенной скоростью биотрансформации ксенобиотиков. Доля «медленных» и «быстрых» метаболизаторов по отдельным ферментам метаболизма обнаруживает существенные межпопуляционные различия. Вместе с тем далеко не всегда отмечается полная корреляция генотипа и фенотипа в скорости метаболизма ксенобиотиков или ТХФ, что свидетельствует о необходимости дополнительного биохимического контроля при генотипировании ферментов метаболизма.

Семейство Р-450 CYP1 метаболизирует сравнительно небольшую часть ТХФ, самые важные из которых представлены полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). Особенно важная роль в этом принадлежит генам CYP1A1 и CYP1A2, локализованным на хромосоме 15.

CYP1A1 кодирует фермент арилуглеводородкарбоксилазу, который участвует в метаболизме эстрогенов, некоторых лекарственных средств (ЛС) и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) – основных компонентов табачного дыма и продуктов сжигания органического топлива. Этот фермент контролирует начальный метаболизм ПАУ и ряда других органических соединений, приводящий к образованию канцерогенов (например, бенз(а)пирена). Участвует в биоактивации нитрозаминов.

Продукт гена CYP1A2 метаболизирует не только ПАУ, но и такие соединения, как кофеин, теофиллин, различные ароматические углеводороды и др.

CYP1B1 участвует в первой фазе детоксикации ксенобиотиков, а также в метаболизме холестерола, стероидов и липидов. Продукты, образующиеся в результате реакции, катализируемой этим ферментом, вызывают различные онкозаболевания и гормональные нарушения.

Семейство Р-450 CYP2 представлено группой функционально наиболее значимых ферментов, метаболизирующих огромное количество различных ТХФ. Их активность обнаруживает выраженную зависимость от генетического полиморфизма.

Подсемейство CYP2A является наиболее важным изоферментом данного подсемейства. Он принимает участие в биоактивации нитрозаминов, вызывающих рак легких.

Подсемейство CYP2B метаболизирует преимущественно гетероциклические соединения, а также участвует в метаболизме эндогенных стероидов.

Подсемейство CYP2C играет ключевую роль в метаболизме большинства ТХФ.

5.2.2. Гены 2-й фазы детоксикации

Вторая фаза (нейтрализации), называется также фазой дезактивации и детоксикации, отвечает за перенос на активированные продукты 1-й фазы ацетильных, метильных, сульфгидрильных групп либо глутатиона, в результате чего образуются гидрофильные конъюгаты.

Ферменты 2-й фазы детоксикации обеспечивают эффективный перевод промежуточных электрофильных метаболитов в водорастворимые, нетоксические соединения, которые выводятся из организма. В процессе 2-й фазы происходит глюкоронирование (УДФ-глюкоронилтрансферазы), ацетилирование (N-ацетилтрансферазы), S-метилирование (тиопуринметилтрансфераза), сульфатирование (сульфотрансферазы), водная конъюгация (эпоксидгидролазы), конъюгация с глютатионом (глютатионтрансферазы).

Таблица 34

Генетический полиморфизм генов цитохрома и глутатионтрансферазы в популяции детей-европеоидов (n = 50)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	Группа наблюдения	Группа сравнения
cyp1A1(2) (A4889G)	AA	82	96
	AG	16	4
	GG	2	0
	A	89	98
	G	11	2
GSTA4	TT	68	88
	TC	19	4
	CC	13	8
	T	77	90
	C	23	10

Ген глутатион S-трансферазы (GSTA1) (табл. 34).

GST (ГСТ) – это семейство ферментов, катализирующих конъюгацию различных ксенобиотиков, с отщеплением глутатиона (GSH).

Глутатион-S-трансферазы (GST) относятся к семейству изоферментов, контролирующих конъюгацию различных электрофильных соединений, включая канцерогены и цитотоксические лекарства, с восстановленным глутатионом. Эти ферменты способны к прямому связыванию с такими гидрофобными соединениями, как гем, билирубин, стероидные гормоны, что позволяет им участвовать во внутриклеточном накоплении и обеспечивать транспорт биологических веществ с ограниченной водо-

растворимостью. Благодаря каталитической активности и способности к связыванию они участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций. В дополнение к этому GST могут подвергаться амплификации в опухолевых тканях и таким образом обеспечивать резистентность к химиотерапии.

Глютатионопосредованная детоксикация играет ключевую роль в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и пероксидов ДНК, восстанавливает органические гидроперекиси в спирты и изомеризует некоторые стероиды и простагландины. Известно, что интенсификация ПОЛ, связанная с полиморфизмом генов системы детоксикации, оказывает токсическое действие на биомембраны клеток.

Каталитическая активность GST обеспечивает клетку механизмом защиты от вредного воздействия этих веществ. У человека существуют множественные генетические локусы, один из которых (GSTMI) является полиморфным. μ-изоформа содержит нулевой аллель у 30–60 % людей с 0/0 генотипом. Этнические сравнения показали, что частота встречаемости 0/0 генотипа меньше у негроидов (35 %), чем у европеоидов (49 %).

Многофункциональное семейство глютатион-S-трансферазы играет существенную роль как в метаболизме канцерогенов, липидов, продуктов свободнорадикальных реакций и т.д., так и в обмене катехолэстрогенов. ГСТ выполняет роль детоксифицирующего агента, обеспечивая конъюгацию генотоксических метаболитов с глютатионом, что вызывает их инактивацию, как и конъюгация с N-ацетилцистеином и цистеином. Известно несколько типов ГСТ и соответственно типов полиморфизма генов этого фермента [576, 595].

Ферменты суперсемейства глутатион-S-трансфераз (GST) играют ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков, в формировании резистентности к лекарственным препаратам и предотвращении поломок ДНК [295, 516].

Способность метаболизировать ксенобиотики различается у индивидов из-за наличия мутантных вариантов, снижающих или блокирующих экспрессию генов, что во многих исследованиях связывают с повышенным риском развития заболеваний [296].

GST осуществляет конъюгацию сульфгидрильной (SH) группы глутатиона с ксенобиотиками или их метаболитами, образовавшимися в первой фазе биотрансформации. Данная реакция играет ведущую роль в защите клеток от свободных радикалов [494].

Ген MMP9

Матриксные металлопротеиназы (MMP) играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития матрикса, при онкогенной трансформации клеток, при ангиогенезе и патологии, ассоциированной с клеточной пролиферацией [572].

MMP – семейство протеолетических ферментов, состоящее из 26 цинксодержащих эндопептидаз у человека [420].

MMP участвуют в клеточной миграции при тканевой регенерации, заживлении ран и воспалении, обеспечивая миграцию лейкоцитов через сосудистую стенку и процессы ремоделирования. MMP в легких лизируют такие молекулы внеклеточного матрикса, как факторы роста, хемокины, протеиназы и молекулы клеточной адгезии [496].

Свое название матриксные металлопротеиназы получили за способность специфически гидролизовать основные белки экстраклеточного матрикса. ММП относятся к семейству цинковых металлопротеиназ, так как содержат в активном центре Zn^{2+}. Известно около 20 представителей этого семейства. Большинство ММП секретируется клетками в виде неактивных ферментов, в обычных условиях в тканях обнаруживаются незначительные количества ММП, при этом их активация приводит к протеолитическому разложению окружающих клетку белков.

Активацию большинства ММП осуществляют протеазы типа плазмина и активатора плазминогена урокиназного типа.

Некоторые ММП могут активизировать друг друга. В норме существует биологический механизм ограничения протеолиза тканей, вызванного активными ММП, в виде секреции клетками стромы тканевых ингибиторов металлопротеаз. Это белки небольшого размера, способные формировать нековалентные комплексы со многими членами семейства матриксных металлопротеаз.

Ген NR3C1

Ген NR3C1 – это ген, кодирующий глюкокортикоидный рецептор GR, который связывается с кортизолом и другими глюкокортикоидами и регулирует гены, ответственные за развитие, метаболизм и иммунитет.

Рецептор глюкокортикоидов встречается в клетках практически всех тканей и на этом основании относится к группе белков «домашнего хозяйства».

MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза). Гомоцистеин обладает токсическим эффектом на организм, который реализуется в повреждающем эффекте гомоцистеина на эндотелий сосудов и стимуляции

тромбообразования. Наследственная предрасположенность к увеличению уровня гомоцистеина в крови может быть связана с особенностями полиморфизма генов, продукты которых контролируют превращение гомоцистеина в метионин. Кофакторами ферментов этих метаболических путей выступают витамины, самыми важными из которых являются фолиевая кислота, пиридоксин, цианокобалами и рибофлавин. Основными генами, продукты которых контролируют превращение фолиевой кислоты в метаболически активные формы и регулируют обмен гомоцистеина, являются MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза), MTRR (метионинсинтетазредуктаза), MTR (метионинредуктаза). Снижение активности этих ферментов или их коферментов (витаминов) – одна из важных причин накопления гомоцистеина в организме.

Повышение уровня гомоцистеина нередко сопровождается развитием вторичных аутоиммунных реакций и в настоящее время рассматривается как одна из возможных причин развития антифосфолипидного синдрома (АФС).

Сниженная активность или отсутствие некоторых ферментов 1-й и 2-й фазы способствует длительному сохранению токсических промежуточных продуктов биотрансформации.

Ген **CPOX** кодирует синтез фермента копропорфириногеноксидазы, который катализирует окислительное декарбоксилирование металлопорфиринов. Металлопорфирины являются макроциклическими комплексами металлов (Mn, Co, Fe, Hg) и гетероциклических органических соединений (пиррол) и отличаются от бесчисленного множества других групп макроциклических комплексов тем, что являются ароматическими макроциклами с уникальной сопряженной σ-системой. В этом сопряженном состоянии металлы проявляют свою биологическую активность. При нарушении синтеза металлопорфиринов, обусловленных дефектом гена, происходит накопление неактивных форм металлоорганических соединений в печени, селезенке, коже и вызывает развитие симптомов интоксикации – гипербилирубинемию, гемолитическую анемию, повышение чувствительности к солнечному свету, неврологические нарушения, злокачественные опухоли.

SULT1A1 – фермент термостабильная фенолсульфотрансфераза катализирует реакцию конъюгирования с субстратом – важный путь метаболизма многих лекарств, ксенобиотиков и нейромедиаторов. Он сульфатирует большой спектр промутагенов и проканцерогенов, в том числе фенол, р-нитрофенол и другие производные. Помимо этого фер-

мент инактивирует эстрогены и их метаболиты, защищая клетки от опосредованного эстрогенами митоза и мутагенеза. Полиморфизм гена SULT1A1 связывают с повышенным риском ряда раковых заболеваний (рака молочной железы, эндометрия, пищевода, легких).

5.3. Гены иммунорегуляции

Исключительная роль в элиминации ТХФ принадлежит иммунной системе. Отсюда вытекает важность имеющих место в иммунной системе полиморфизмов.

HLA-комплекс (Human Leukocyte Antygen)

Гены HLA-комплекса расположены на коротком плече 6-й хромосомы (6p21). Этот регион занимает область размером до 20 сантиморганид. HLA-комплекс состоит из генов, которые кодируют различные белки, вовлеченные в иммунный ответ. В зависимости от структуры и функций белковых продуктов, HLA-гены подразделяются на 3 большие класса. Наиболее близко расположенный к теломере класс I представлен генами HLA-A, B, C, E, F, G. Эти гены кодируют поверхностные клеточные гликопротеины, представленные на наружной цитоплазматической мембране большинства клеток человека. Лежащие ближе к центромере гены класса II (HLA-DR, DQ и DP) кодируют *a*- и *b*-цепи, которые формируют гетеродимеры, экспрессирующиеся на поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты. Гены класса III кодируют компоненты комплемента (C2, C4, Bf), α- и β-факторы некроза опухолей, белки теплового шока, 21-OH-гидроксилазу. Для всего HLA характерен выраженный генетический полиморфизм.

Генетическая предрасположенность к разному типу иммунного ответа, обусловленная генами HLA класса II, должна реализовываться или в результате непосредственного участия самих продуктов генов HLA, или через сцепленные (то есть находящиеся близко на хромосоме и передающиеся единым блоком) с ними гены, или опосредованно, через более сложные цепочки взаимодействий.

На сегодняшний день есть только единичные исследования, связанные с прояснением этих вопросов. Есть предположения, что сила иммунного ответа может зависеть от плотности пептидов, представленных молекулами МНС на поверхности АГ презентирующей клетки, а плотность может зависеть от силы связывания пептидов с представ-

ляющей молекулой. По предположению J. Robinson et al., в пределах комплекса генов МНС могут находиться кандидатные гены, которые могут влиять на иммунный или воспалительный ответ АГ-независимым образом, что следует из исследования продукции цитокинов в клеточных культурах от здоровых носителей разных HLA-гаплотипов. Оказалось, что гаплотип B8-DR3 был ассоциирован с высокой *in vivo* и *in vitro* продукцией TNF-α, который затем может увеличивать уровень sELAM-1, кортизола и IL10.

Таким образом, основная физиологическая функция молекул HLA II класса, в отличие от I, в представлении антигенов экзогенного происхождения клетками иммунной системы для запуска иммунного ответа на них. Формирование в процессе эволюции системы генов II класса, выделение их из общих с I классом предковых генов и специализация функции возникли, вероятно, в результате действия факторов окружающей среды.

Нарушение физиологических функций системы HLA лежит в основе большинства патологий человека: от патологии репродукции до таких социально значимых заболеваний, как онкозаболевания, аутоиммунные, инфекционные и др.

Гены цитокинов

Цитокины участвуют в передаче межклеточных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей. Цитокины определяют ответную тканевую реакцию на проникновение ксенобиотиков, иммунное повреждение и воспаление.

Большое внимание в патогенезе заболеваний уделяется цитокинам, которые являются посредниками межклеточных взаимодействий, регулируют кроветворение, иммунный ответ, клеточный цикл, участвуют во многих физиологических и патологических процессах. Цитокины включают гемопоэтические факторы роста, интерфероны, лимфокины, хемокины. Гены, кодирующие провоспалительные цитокины, характеризуются значительным полиморфизмом, вследствие чего синтезируются белки с разной функциональной активностью.

Гены, ответственные за синтез цитокинов и их рецепторов, являются индуцибельными, т.е. активируются различными инукторами как эндогенной, так и экзогенной природы.

Гены интерлейкинов IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 расположены кластером на хромосоме 5 в области 5q31-33.

Согласно некоторым данным, в американской популяции полиморфизм гена IL-4 ассоциирован с повышенной промоторной активностью гена IL-4 и высоким уровнем общего IgE в сыворотке крови у больных с атопическими заболеваниями. Однако, согласно французским авторам, не выявлено ассоциации этого полиморфизма с содержанием общего IgE. При исследовании австралийской популяции показана ассоциация данного полиморфизма с увеличением специфического IgE, но не с увеличением общего IgE.

Являясь регуляторными факторами, цитокины играют важную роль в развитии иммунного ответа как клеточного, так и гуморального типов. Один из них, **ген интерлейкина-4** (IL-4), кодирует цитокин группы гемопоэтинов, который играет важную роль в иммунологических механизмах аллергии и воспаления. Белковый продукт синтезируется Т-клетками, играет важную роль в продукции иммуноглобулина Е, а также является фактором роста В-клеток.

Ген рецептора интерлейкина-4 (IL-4R) рассматривается как один из основных регуляторов синтеза иммуноглобулина Е. В настоящее время известно несколько вариантов полиморфизма гена рецептора IL-4Rα. Функционально значимым вариантом является замена аденина на гуанин в положении 1902, вследствие чего происходит замена глютамина на аргинин в 576-м положении аминокислотной последовательности *а*-цепи рецептора. Еще в 1997 г. была установлена статистически значимая ассоциация 576R аллеля с атопией и предложено возможное объяснение такой ассоциации. Было показано, что 576R форма рецептора обладает пониженным сродством к внутриклеточной тирозинфосфатазе SHP-1, включающей сигнал терминации транскрипции гена IL-4. Таким образом, индивиды с 576R аллелем характеризуются утратой супрессии синтеза IL-4. Был сделан вывод, что аллель 576R предрасполагает к развитию аллергии путем изменения сигнальной функции рецептора IL-4Rα. Аллельные варианты IL-4R коррелируют с усилением или ослаблением сигнала интерлейкина-4.

Ген фактора некроза опухоли (TNF-α)

Продукт гена TNF-α – фактор некроза опухоли альфа (TNF-α, кахектин) – относится к цитокиновой системе и представляет собой клеточный медиатор макрофагов и лимфоцитов, играет важную роль в регуляции процессов дифференцировки, роста и метаболизма клеток, является медиатором воспалительных процессов, инициирует образо-

вание свободных радикалов и может способствовать развитию оксидативного стресса.

Роль TNF-α в развитии оксидативного стресса заключается в активации индуцибельной NO-синтетазы (NOS) – энзима, ответственного за синтез оксида азота, играющего важную роль в образовании и трансформации свободных радикалов.

Известно по крайней мере 8 полиморфных вариантов гена TNFA. Фенотипический эффект некоторых из них, особенно локализованных в промоторной области гена, хорошо изучен на молекулярном и биохимическом уровнях.

В случае полиморфизма G-238A гена TNFA аллель A ассоциирован с пониженной продукцией TNF-α. Естественно предполагать, что снижение экспрессии гена TNFA в случае аллеля -238A приводит к уменьшению концентрации TNF-α белка и, соответственно, к снижению уровня NOS. Напротив, полиморфизм промотроной области гена TNFA G-308A ассоциирован с повышением продукции TNF-α и, таким образом, способствует повышению содержания NOS, что сопровождается увеличением концентрации свободных радикалов, которые имеют цитотоксические свойства и играют важную роль в иммуновоспалительных процессах и в развитии оксидативного стресса. Накопление свободных радикалов, в свою очередь, вызывает дегрануляцию тучных клеток. При этом высвобождается широкий спектр биологически активных веществ, обусловливающих гиперчувствительность и гиперреактивность.

Ген, кодрующий фактор некроза опухолей-α (ФНО-α), имеет широкий спектр биологического действия. Основной считается его роль в развитии острого воспалительного процесса. ФНО-α принимает участие в воспалении как прямым, так и косвенным способом – за счет индукции синтеза других провоспалительных медиаторов. ФНО-α стимулирует экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток и нейтрофилов, увеличивая таким образом тропность данных клеток друг к другу. Кроме того, ФНО-α стимулирует миграцию нейтрофилов через сосудистую стенку в очаг повреждения. В очаге воспаления ФНО-α играет значительную роль в разрушении патологических агентов: стимулируя фагоцитоз и за счет индукции «оксидативного стресса». «Кислородный взрыв» происходит путем стимуляции образования в нейтрофилах активных форм кислорода, окиси азота и гипохлорной кислоты (табл. 35).

Таблица 35

Генетический полиморфизм генов фактора некроза опухоли и транскрипционного фактора p53 в популяции детей-европеоидов (n = 50)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	Группа наблюдения	Группа сравнения
TNF (G308A)	GG	63	82
	AG	37	9
	AA	0	9
	G	81	86
	A	19	14
TP53	CC	34	44
	TC	41	52
	TT	15	4
	C	55	70
	T	45	30

Помимо участия в остром воспалении ФНО-α играет роль в хронизации воспалительного процесса как за счет повышения адгезии макрофагов, которые, как известно, являются основными клетками-эффекторами хронического воспаления, так и опосредованно, индуцируя синтез NO.

Ген TNF картирован на хромосоме 6p21.3 и имеет размер 2762 п.о. Синезируемый белок состоит из 233 аминокислотных остатков с молекулярной массой 25644 Da [484].

Известны более 30 полиморфных вариантов гена, но только около половины из них влияют на экспрессию ФНО-α *in vitro* [447].

Нами проведен сравнительный анализ ассоциированных с геном TNF иммунологических показателей у работников в условиях и вне условий экспозиции комбинации производственных вредностей (табл. 36).

Оказалось, что генотипические вариации иммунологических отклонений менее статистически выражены, в отличие от иммунологических профилей одного генотипа, различающихся интенсивностью факторной нагрузки.

Это свидетельствует о значимости гаптенной экспозиции в формировании адаптационных реакций как фактора реализации генетического риска, так и в отсутствии вариантных генотипов. Последний сценарий, несмотря на свою «физиологичность», представляется нам не

Таблица 36

Иммунологические профили генотипов TNFA (G-308A) в условиях различной экспозиции производственными вредностями

Ген TNFA (rs1800629)	ИФА TNF-α, пг/см^3	ИФА IFN-γ, пг/см^3	TNFRI, %	p53, %	Annexin V, %	7-AAD, %
У работников в условиях экспозиции производственных вредностей						
AA (2)	1,07 ± 1,06	0,01 ± 0,00	1,36 ± 0,04	1,73 ± 0,29	2,55 ± 0,03	10,32 ± 0,59
AG (16)	1,45 ± 0,33	2,48 ± 0,68*	2,36 ± 0,36*	2,27 ± 0,33*	2,80 ± 0,22	9,43 ± 0,55
GG (42)	1,44 ± 0,25	4,90 ± 0,87	1,59 ± 0,11	1,60 ± 0,12	2,47 ± 0,12	8,61 ± 0,24
У работников, не экспонированных производственными вредностями						
GG (24)	0,48 ± 0,10**	1,76 ± 0,28**	3,31 ± 0,27**	3,42 ± 0,29**	3,09 ± 0,20**	6,96 ± 0,51**

Примечание: * – достоверность между аллелями GG и AG при $p<0,05$; ** – достоверность аллеля GG между работниками производства и людьми, не задействованными на производстве при $p<0,05$.

менее опасным, поскольку генетическая перестройка в виде мутантного аллеля характеризует тенденцию к изменчивости как элемент адаптационных, приспособительных сдвигов генетического гомеостаза.

5.4. Гены регуляции белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям

Ген p53 – онкосупрессор, его продукт белок p53 контролирует ответ клетки на различные виды стресса, включая повреждения ДНК химическими и физическими агентами, нарушения микротрубочек цитоскелета, активацию онкогенов, гипоксию, гипертермию и др. Активация гена p53 ведет к остановке пролиферации клетки и к включению в ней программы апоптоза – запрограммированной клеточной гибели. Инактивация гена p53, наблюдаемая в большинстве опухолей, подтверждает его противоопухолевую функцию. Полиморфные варианты гена p53, по-видимому, снижают способность клеток к апоптозу, вследствие чего не происходит запрограммированного удаления дефектных клеток, что и является причиной патологического опухолевого и опухолеподобного процесса. При этом неблагоприятные аллельные варианты генов системы детоксикации могут существенно усиливать клеточный стресс, который в значительной степени реализуется через экспрессию гена p53 (рис. 40).

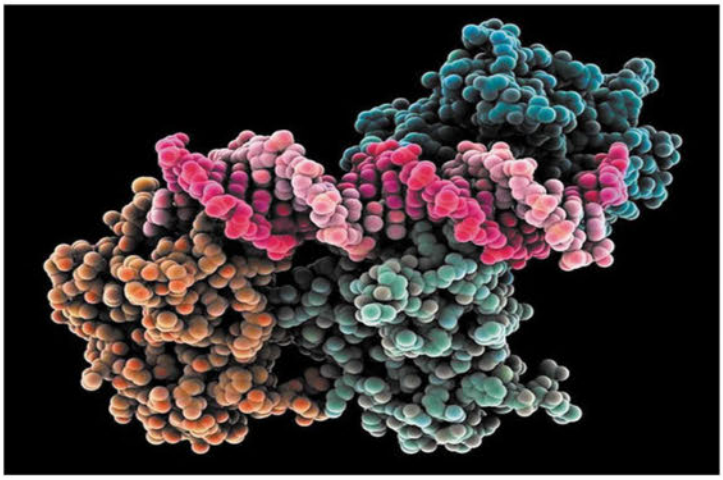


Рис. 40. Ген p53. Модель взаимодействия p53 с ДНК, p53 является транскрипционным фактором, запускающим синтез белков апоптоза и клеточного цикла

Гены BRCA1 и BRCA2

Обычно аномалии генов, отвечающих за развитие рака молочной железы, чаще всего встречаются у женщин моложе 40 лет. Роль данных генов заключается в том, что они регулируют нормальный рост клеток молочной железы и предупреждают возможный раковый рост. Но при наличии аномалий или мутаций в этих генах они способствуют повышению риска рака молочной железы. Аномалия генов BRCA1 и BRCA2 может составлять 10 % всех случаев рака молочной железы. Причиной всех видов рака молочной железы является аномалия генов в клетках. Как минимум у 25 % женщин с полиморфизмом аномалия генов BRCA1 или BRCA2 не связана с наследственностью. Приобретенная генная аномалия считается причиной рака молочной железы в 85–90 %. Мутация генов происходит по причине воздействия на клетку различных факторов – радиации, диеты, уровня половых гормонов, токсических факторов окружающей среды – либо по неизвестным причинам.

5.5. Соматические гены, участвующие в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях

В гене васкулярно-эндотелиального фактора роста (**VEGF**) известны 4 полиморфных сайта: 2578 C/A, 1154 G/A, 634 G/C, 936 C/T. Полиморфизм 1154 G/A гена VEGF представлен 2 аллелями: G – нор-

мальный и А – мутантный. У гомозигот А/А уровень VEGF в крови достоверно ниже, чем у индивидов с генотипом G/G, что свидетельствует о влиянии данного полиморфизма на экспрессию гена VEGF. Сам фактор и его рецепторы (VEGFR) – играют решающую роль в ангиогенезе, а следствием блока ангиогенеза являются гипоксия, эндотелиальная дисфункция, следствием которых будет являться усугубление клинической картины многих заболеваний (сердечно-сосудистых, органов дыхания, заболеваний печени и др.).

Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. Он – уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный посредник многих метаболических процессов. В частности, он задействован в таких важных физиологических процессах, как вазодилатация, нейтротрансмиссия, агрегация тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляции тонуса гладких мышц и др. Таким образом, оксид азота следует рассматривать как локальный тканевой гормон, регулирующий сосудистый тонус, кровоток и базальное артериальное давление. Оксид азота образуется в результате реакции окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты L-цитруллина. Реакция контролируется ферментом NO-синтазой (NOS), которая представляет собой гомодимер, каждая из субъединиц которого состоит из двух частей (доменов) – редуктазным и оксигеназным. Фермент становится активным только после объединения двух этих субъединиц.

В настоящее время идентифицированы три изоформы NO-синтазы: NOS1 – нейрональная (nNOS); NOS2 – индуцибельная NO-синтаза макрофагов (iNOS); NOS3 – эндотелиальная (eNOS).

Наибольший интерес для изучения представляет эндотелиальная NO-синтаза (**NOS3**), которая стабильно экспрессируется в клетках эндотелия сосудов, в тромбоцитах и др.

Ген, кодирующий eNOS, обладает аллельным полиморфизмом, который ассоциирован с выработкой различного уровня NO. В гене **NOS3** выявлено несколько полиморфных сайтов. Интерес представляют полиморфизм 4a/4b в 5-м интроне, структурная замена в 7-м экзоне 894G>T и полиморфизм промоторной области гена – 786T>C. Многочисленные исследования посвящены полиморфизму 894G>T. Выявлена ассоциация аллеля T894 с инфарктом миокарда и гипертонией. Изменения в аминокислотной последовательности фермента eNOS могут при-

водить к снижению его каталитической активности и, как итог, к низкой продукции NO в тех ситуациях, когда локально необходимо его участие в реализации защитных или регуляторных свойств. Напротив, другие аллельные варианты гена могут приводить к развитию патологических процессов в других ситуациях, когда высокая каталитическая активность обусловливает высокую концентрацию NO и проявление его неблагоприятных эффектов, в частности мутагенного и цитотоксического.

Гены семейства PPAR – гены рецепторов активации пролиферации пероксисом – кодируют белки PPARα, PPARγ и PPARδ, которые специфически связываются с промоторами генов жирового и углеводного обменов и регулируют их транскрипцию. Гены, кодирующие эти белки, обозначаемые как PPARA, PPARG и PPARD соответственно, локализованы на разных хромосомах, но в целом имеют сходную молекулярную структуру.

Ген PPARA локализован на хромосоме 22 (22q13.31), экспрессируется в тех тканях, где происходит усиленный обмен жиров: мышцы, печень, сердце и бурый жир. В мышцах ген PPARA экспрессируется в 7 раз сильнее, чем в жировой ткани.

Основная функция белка PPARα – регуляция обмена липидов, глюкозы и энергетического гомеостаза, а также веса тела посредством регуляции экспрессии генов, вовлеченных в пероксисомное и митохондриальное окисление.

Замена нуклеотида G на C в положении 2528 (7-й интрон) ведет к снижению экспрессии гена PPARA, вследствие чего нарушается регуляция липидного и углеводного обменов. Установлено, что носители C-аллеля имеют высокий риск развития атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа и ишемической болезни сердца

Ген PPARG локализован в локусе 3p25. В результате альтернативного сплайсинга с этого гена образуется 4 транскрипта, отличающиеся по 5'-концам с разным количеством нетранслируемых экзонов: PPARγ1, PPARγ2, PPARγ3, PPARγ4. Функции этого транскрипционного фактора заключаются в регуляции генов, связанных с аккумуляцией жира (синтез триглицеридов), дифференцировкой адипоцитов и миобластов, чувствительностью к инсулину, активностью остеобластов и остеокластов (регуляция роста).

Наличие Ala-аллеля коррелирует со снижением активности PPARγ2, следствием чего является подавление липолиза в адипоцитах и снижение уровня циркулирующих свободных жирных кислот. Исследо-

вания показали, что носители Ala-аллеля имеют больший индекс массы тела, чем Pro/Pro гомозиготы, труднее теряют вес при переходе на гипокалорийную диету, но быстро набирают лишний вес после прекращения соблюдения диеты.

Среди других фенотипических эффектов Ala-аллеля гена PPARG следует отметить повышение риска артериальной гипертензии и инфаркта миокарда.

Ген PPARD локализован в локусе 6p21.1-p21.2, активно экспрессируется в жировой ткани и медленных мышечных волокнах скелетных мышц. Продукт гена – белок PPARδ – регулирует экспрессию генов, вовлеченных в окисление ЖК и обмен холестерина.

Генами-мишенями транскрипционного фактора PPARd в мышечной ткани являются гены окислительного метаболизма, гены митохондриального дыхания и термогенеза, гены, определяющие функции медленных мышечных волокон (миоглобина, тропонина I медленного типа), гены транспорта и окисления жирных кислот в миокарде, в бурой и белой жировых тканях. Лигандами PPARδ выступают насыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты, конъюгированная линолевая кислота, синтетические и эндогенные эйкозаноиды. Голодание и физические нагрузки повышают уровень циркулирующих эндогенных лигандов PPARδ.

На основании данных о высокой транскрипционной активности C-аллеля можно предполагать, что C-аллель гена PPARD способствует большему катаболизму жиров и в определенной степени снижает риск развития ожирения.

Ген PGC1A локализован в локусе 4p15.1, экпрессируется преимущественно в скелетных мышцах, миокарде, в буром жире, в почках. Его белковый продукт PGC-1a является транскрипционным коактиватором многих ядерных рецепторов: PPARα, PPARγ, PPARδ, митохондриального транскрипционного фактора, рецептора тиреоидного гормона, ретиноидных рецепторов, глюкокортикоидного рецептора, ядерных респираторных факторов 1 и 2, рецепторов эстрогена, ядерного фактора печени 4, эстрогензависимых рецепторов.

Через соответствующие транскрипционные факторы PGC-1α влияет на активность процессов адаптивного термогенеза, образование митохондрий и усиление окислительных процессов, относительное содержание медленных волокон, секрецию инсулина, глюконеогенез, липогенез и хондрогенез.

Показано, что ген PGC1A активируется сразу после рождения и участвует в переключении углеводного типа метаболизма на жировой. Голодание также способствует экспрессии PGC1A в миокарде.

Ген ACE определяет синтез ангиотензин-1-превращающий фермент – АПФ – ключевого фактора ренинангиотензиновой системы, важного звена поддержания равновесия между факторами вазоконстркции и вазодилатации, а следовательно, и регуляции сосудистого тонуса. Картирован в локусе 17q23. Большое значение в регуляции сосудистого тонуса принадлежит полиморфизму инсерция/делеция (I/D) Alu-повтора 287 п.н. в 15-м интроне гена ACE. Данный полиморфизм ассоциирован с изменением экспрессии гена ACE. При этом аллель D коррелирует с достоверным увеличением количества ACE в сыворотке крови, а аллель I является функционально менее активной. Выявлена ассоциация D-аллеля гена ACE с сердечно-сосудистыми заболеваниями и с задержкой внутриутробного развития плода.

5.6. Методы выявления генетического полиморфизма

Для поиска и идентификации ДНК-полиморфизма в настоящее время разработаны и широко применяются различные методы, число которых приближается к ста.

В зависимости от целей исследования все молекулярно-генетические методы можно подразделить на две группы: методы, направленные на поиск неизвестных мутаций (первичная идентификация) и анализ известных мутаций.

Методы, применяемые для первичной идентификации мутаций, то есть позволяющие скринировать на наличие ДНК-поломок достаточно протяженные фрагменты генов, включают: метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК; денатурирующий градиентный гель-электрофорез; метод гетеродуплексного анализа; метод химического расщепления некомплементарных сайтов; метод тестирования «неполноценного» белка; метод масс-спектрометрии и метод биочипов.

Выявление мутаций этими методами должно обязательно подтверждаться результатами прямого секвенирования изучаемого ДНК-фрагмента гена. Таким образом, большинство перечисленных методов (за исключением масс-спектрометрии и биочипов) позволяет выявить только подозрительные на наличие точковых и других мутаций участки ДНК,

и только метод секвенирования дает полную информацию о типе и характере нуклеотидных изменений. Зачастую первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена проводят именно таким образом.

Для исследования полиморфных вариантов чаще всего используют методику ПЦР, в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени с помощью флюоресцентных меток, которыми предварительно помечают используемые для реакции амплификации праймеры. Для одновременной детекции нескольких продуктов реакции используют разные флюоресцентные метки и зонды (мультиплексная ПЦР). Кроме того, этот метод лежит в основе других методов изучения генома.

Забор материала для ПЦР проводится методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки (буккальный эпителий) или с помощью пробы крови (ЭДТА). Затем проводят выделение ДНК сорбентным методом, в основе которого лежит разрушение клеток с дальнейшей сорбцией нуклеиновых кислот на сорбент.

В качестве праймеров используют участки ДНК кандидатных генов. Выбор генов осуществляется путем их подбора на основании поставленных исследователями задач. Принципами подбора участков генов являются оптимальная распространенность (встречаемость) выбранного участка гена в изучаемом этносе и его значимость в передаче наследственной информации о данном белке (промоторная часть гена).

Проведение полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция осуществляется в несколько последовательных этапов, для реализации которых широко используются специальные программируемые аппараты – термоциклеры, позволяющие задавать и поддерживать определенный температурный режим реакции. Все компоненты реакции – матричную ДНК, олигопраймеры, смесь дезоксинуклеотидов и термофильную ДНК-полимеразу – добавляют в специальный солевой буфер непосредственно перед помещением пробирки с реакционной смесью в термоциклер.

На первом этапе исследуемая двухнитевая матричная ДНК переводится в однонитевую форму путем ее нагревания в течение нескольких минут до температуры 94–98 °С. Дальнейшая схема заключается в чередовании циклов:

– гибридизация или отжиг ДНК с праймерами;

– синтез последовательностей, комплементарных матричной ДНК;

– денатурация образовавшихся двухнитевых структур.

На этапе гибридизации температура реакционной смеси снижается до 50–65 °С. Находящиеся в растворе олигопраймеры гибридизуются с денатурированной (одноцепочечной) геномной ДНК, содержащей комплементарные (соответствующие им) участки.

Повышение температуры до 65–72 °С, оптимальной для работы термофильной Taq ДНК-полимеразы, запускает синтез ДНК в направлении от 5' к 3'-концу геномной ДНК-матрицы. При дальнейшем повышении температуры до 80–90 °С синтез ДНК прекращается, происходит денатурация с освобождением с геномной матрицы уже синтезированных фрагментов ДНК, которые в свою очередь становятся матрицами для синтеза ДНК при последующих циклах амплификации.

Таким образом, в каждом цикле происходит увеличение числа синтезированных копий участка амплификации, причем содержание продуктов амплификации нарастает в геометрической прогрессии.

Регистрация сигнала флюоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК, проводилась в режиме «реального времени» после стадии отжига праймеров для выбранных генов по каналу VIC – для детекции одного из аллельных вариантов генов, и по каналу FAM – для альтернативного варианта.

При помощи ПЦР можно идентифицировать многие мутации, а также изучать полиморфные сайты. Подбор олигопраймеров проводят на основании анализа нуклеотидных последовательностей в участках ДНК, фланкирующих ту или иную мутацию.

Подбор праймеров целесообразно проводить согласно следующим критериям:

– отсутствие внутренней вторичной структуры;

– сбалансированный состав и равномерное распределение G/C и A/T пар по всей последовательности;

– отсутствие комплементарности между 3'-концами (из-за существования опасности образования димеров праймеров);

– наличие единой температуры плавления (расброс температур плавления праймеров не более 1 °С от среднего значения);

– отсутствие комплементарности последовательностей праймеров с последовательностями других генов в геноме человека.

Другим вариантом детекции результатов ПЦР является гель-электрофорез продуктов амплификации, при котором продукты реакции наносят на агарозный гель и проводят горизонтальный электрофорез. В дальнейшем гели окрашивают красителем этидием бромидом и визуализируют продукты ПЦР в проходящем ультрафиолетовом свете

с длиной волны 380 нм. Кроме того, продукты амплификации можно идентифицировать путем блот-гибридизации со специфическими ДНК-зондами или другими методами окрашивания.

5.7. ПЦР в реальном времени

Широко распространенным методом детекции известных мутаций является метод ПЦР в реальном времени.

Чаще всего используют так называемое резонансное тушение флюоресценции в TaqMan-системе, позволяющее контролировать кинетику ПЦР-амплификации непосредственно в ходе реакции. Для детекции мутаций используют зонды, несущие на 5'- и 3'-концах соответственно различные флюорофоры (светители), и их «тушители», которые, находясь рядом, подавляют флюоресценцию. При этом зонды должны быть комплементарны последовательности амплифицируемой ДНК и отличаться лишь одним нуклеотидом, характерным для одного и другого аллеля. Зонд, содержащий на 3'-конце краситель FAM, полностью комплементарен аллелю 1 и при гибридизации дает устойчивый дуплекс. При гибридизации этого зонда с аллелем 2 будет происходить неполное спаривание нуклеотидов, и возникает так называемый «мисматч». Соответственно зонд, имеющий метку VIC, полностью комплементарен аллелю 2, но при гибридизации с аллелем 1 не дает устойчивого дуплекса.

Непосредственно перед реакцией в ПЦР-смесь добавляют зонды, которые гибридизуются с комплементарными им последовательностями ДНК. В случае гетерозиготы по исследуемым аллелям гибридизуются оба зонда (рис. 41).

Достраивая комплементарную последовательность ДНК, Taq-полимераза за счет своей экзонуклеазной активности разрушает только устойчивые дуплексы. При этом происходит отщепление соответствующего флюорофора, который переходит в раствор и, не находясь под влиянием «тушителя», дает свой флюоресцентный сигнал. В зависимости от сигнала свечения можно судить, каким аллелем (аллелями) представлен данный образец ДНК.

Интенсивность сигнала флюоресценции зависит от числа циклов ПЦР. Размер амплифицируемого фрагмента ДНК обычно не превышает 150 нуклеотидов, что серьезно ограничивает применение этого метода. Вместе с тем прохождение реакции можно контролировать в реальном времени, что является главным преимуществом метода. Для того чтобы

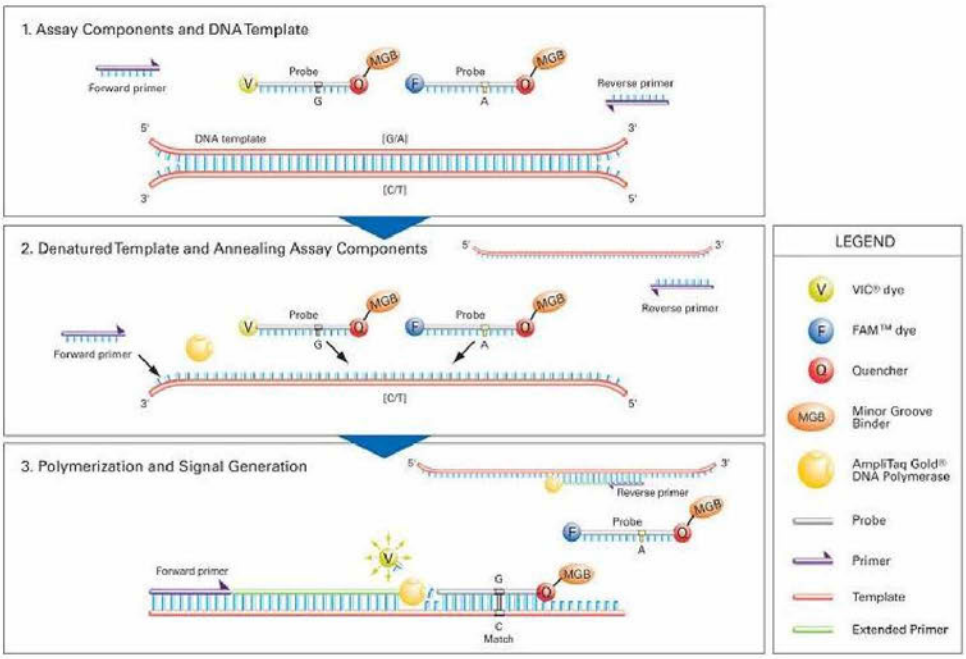


Рис. 41. Схема полимеразной цепной рекакции

диагностировать наличие мутации, иногда достаточно провести менее 25 циклов амплификации.

Существую и новые, более современные методы детекции мутаций. Они являются наиболее удобными и эконмичными для массового автоматического и полуавтоматического скрининга аллельного полиморфизма. К ним относятся: денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения, метод поверхностного плазмонного резонанса, методы ДНК-чипов, метод масс-спектрометрии, ресеквенирование генома.

5.8. Генетическое тестирование однонуклеотидных полиморфизмов с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Алгоритм проведения ДНК-детекции в режиме реального времени включает в себя последовательность нескольких процедур, каждая из которых всегда подразумевает наличие альтернативного варианта, начиная с забора материала для выделения ДНК и заканчивая статистической обработкой результатов:

- у детей забирают образцы ДНК со слизистой оболочки щеки;

♦ выделяют геномную ДНК с помощью фенолхлороформной экстракции;

♦ амплификацию и детекцию осуществляют с помощью термоциклера (в нашем случае CFX96), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе (рис. 42);

♦ обработку полученных результатов проводят, используя аллельную дискриминацию;

♦ использованным методом различают гомозиготную замену от гетерозиготы и нормальной гомозиготы;

♦ статобработка данных по генотипированию проводится с применением унифицированной программы «Ген Эксперт», служащей для расчета статистических параметров для исследований «случай–контроль», использующих SNP.

Рис. 42. Оборудованный бокс для ДНК-детекции

Непосредственно сама методика тестирования генетического полиморфизма методом ПЦР включает три этапа, два из которых позволяют оценить мутации в режиме реального времени, а третий необходим в случае необходимости детекции и учета продуктов амплификации гель-электрофорезом.

1-й этап. Отбор и подготовка проб

1. Взятие материала для исследования.

Забор образцов необходимо производить только в одноразовые пластиковые микроцентрифужные пробирки или в стеклянные пробир-

ки, предварительно обработанные в течение 1 часа хромовой смесью, тщательно промытые и прокаленные.

2. Выделение очищенной ДНК методом фенолхлороформной экстракции.

2.1. Подготовка реактивов для лизиса клеток и очистки ДНК-матриц

Лизирующий буфер:

– делают навески: трис-(оксиметил)-аминометан – 0,024 г (0,2 м), натрия додецилсульфат – 5,0 г (5 %), натрия гидроокись – 0,0016 г (0,04 м). Доводят дистиллированной водой до 200 мл.

Фенолхлороформная смесь:

– в герметично закрывающемся мерном цилиндре смешивают: 25 мл фенола (pH 7,0), 24 мл хлороформа, 1 мл изоамилового спирта.

Раствор тРНК:

– делают навеску тРНК = 5 мг, растворяют в 1 мл бидиотиллированной воды, хранят при –20 °С.

2.2. Лизис клеток и выделение очищенной ДНК.

200 мкл исследуемого образца смешивают с 200 мкл лизирующего буфера и инкубируют в течение 15–20 мин при 37–42 °С. ДНК экстрагируют, добавляя в пробирку 400 мкл фенолхлороформной смеси, тщательно перемешивают. Центрифугируют при 12000 об./мин в течение 2–5 мин. Отбирают 200–300 мкл водной фазы. К полученному супернатанту добавляют 1/10 объема раствора т-РНК (5 мкг/мкл), натрия ацетат – 3 М – 1/10 объема и два объема охлажденного этанола. Выдерживают 15 мин при –70 °С (или 2 часа при –20 °С) и затем центрифугируют при 12000 об./мин 10 мин. Осадок растворяют в 25 мкл стерильной бидистиллированной воды и используют для проведения ПЦР.

2.3. Выделение ДНК методом нуклеосорбции.

2.3.1. Приготовление рабочих растворов.

Лизирующий буфер (ЛБ):

– гуанидинтиоционат (конечная концентрация 6 М) – 18 г; дитиотрейтол (0,2 М) – 95 мг; ЭДТА (0,5 М) – 1 мг – все компоненты растворяют в 30 мл дистиллированной воды.

Раствор для первой отмывки (ОР-1):

– гуанидинтиоционат (4 М) – 12 г, дитиотрейтол (0,2 М) – 95 мг – растворяют в 30 мл дистиллированной воды.

Раствор для второй отмывки (ОР-2):

– трис-(оксиметил)-аминометан (1 М, pH 7,3) 1 мл; натрия хлорид (5 М) 1 мл; этанол (50 %) 50 мл; дистиллированной воды 50 мл.

Суспензия сорбента (СС):

– готовят 50%-ную (вес/объем) суспензию силикагеля (SiO) в 2-деионизированной воде.

2.3.2. Методика выделения ДНК.

1. В пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл вносят по 900 мкл ЛБ и 40 мкл СС, встряхивают на вортексе в случае немедленного использования или сохраняют до 1 недели.

2. Вносят 50 мкл исследуемого материала, подготовленного как указано выше, немедленно встряхивают на вортексе в течение 5 секунд, оставляют на 10 минут при комнатной температуре, повторно встряхивают в течение 5 секунд и центрифугируют в течение 15 секунд в микроцентрифуге типа «эппендорф» (угловой ротор 12 000 g). Супернатант удаляют в сосуд с 10 М раствором NaOH, не допуская разбавления щелочи ниже 0,3 М. Таким образом достигается нейтрализация ядовитой синильной кислоты – HCN, которую может образовывать ГТЦ при контакте с кислотами.

3. Осадок сорбента отмывают 2 раза в ОБ, затем дважды – 70%-ным этанолом и 1 раз ацетоном.

4. После удаления ацетона пробирки с открытыми крышками прогревают в микротермостате при 56 °С в течение 10 минут.

5. К осадку сорбента добавляют 50–75 мкл электрофоретического буфера (ЭБ). При экстракции РНК желательно добавлять также ингибитор РНК-полимераз. Пробирки закрывают крышками, встряхивают на вортексе в течение нескольких секунд, инкубируют 10 минут при 56 °С, повторно встряхивают и центрифугируют 2 минуты при 12 000 g. Супернатант содержит ДНК и РНК и используется для постановки ПЦР.

2-й этап. Проведение ПЦР

Приготовление реакционной смеси для ПЦР.

В микроцентрифужные пробирки емкостью 0,5 мл последовательно, с помощью автоматической микропипетки, добавляют: 10-кратный буферный раствор (трис-НС), pH 8,4–670 мМ; хлорид магнтия – 25 мМ; 2-меркаптоэтанол – 100 мМ; сульфат аммония (166 мМ) – 5 мкл; раствор бычьего сывороточного альбумина (1,7 мг/мл) – 2 мкл; раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов (из смеси дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ по 0,2 мМ каждого) – 5 мкл; раствор каждого праймера – по 2 мкл (12–50 пМ); образец (лизат клеток) – 25 мкл. Общий объем реакционной смеси доводят до 48 мкл бидистиллированной водой. Рекомендуется готовить общую смесь реактивов в количестве, соответствующем числу проб, добавляя вышеназванные ингредиенты в указанных пропорциях.

В одну из пробирок (положительный контроль) вместо образца вносят контрольный препарат ДНК – 1 мкл (0,1 нМ), 10х буфер, растворы дезоксинуклеотидтрифосфатов, БСА и праймеров – в тех же количествах, что и с образцом. Общий объем реакционной смеси доводят до 48 мкл бидистиллированной водой. При использовании ПЦР для детекции ДНК-матриц в качестве положительного контроля возможно использование лизата клеток. Для отрицательного контроля вместо образца вносят 25 мкл бидистиллированной воды, остальные ингредиенты – в тех же количествах. На поверхность реакционной смеси наслаивают по 30 мкл стерильного вазелинового масла.

Возможна иная компоновка реакционной смеси в соответствии с утвержденными инструкциями по применению используемых тест-наборов.

Пробирки помещают в термоциклер и денатурируют содержимое нагреванием при температуре 94 °С в течение 10 минут. Не допуская охлаждения, в каждую пробирку добавляют по 2 мкл (1,0–2,5 ед.) Taq-полимеразы (или другой термостабильной ДНК-полимеразы).

Проводят реакцию амплификации. Каждый цикл амплификации включает в себя три температурных режима: денатурацию ДНК (92–94 °С – 1 мин), отжиг праймеров (45–68 °С – 0,5–2,0 мин), синтез комплементарной цепи (70–72 °С – 1–3 мин).

Регистрация сигнала флюоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК, проводилась в режиме «реального времени» после стадии отжига праймеров для выбранных генов по каналу VIC – для детекции одного из аллельных вариантов генов, и по каналу FAM – для альтернативного варианта.

Другим вариантом детекции результатов ПЦР является гель-электрофорез продуктов амплификации, при котором продукты реакции наносят на агарозный гель и проводят горизонтальный электрофорез. В дальнейшем гели окрашивают красителем этидием бромидом и визуализируют продукты ПЦР в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 380 нм. Кроме того, продукты амплификации можно идентифицировать путем блот-гибридизации со специфическими ДНК-зондами или другими методами окрашивания.

При необходимости выполнения этих этапов или отсутствия оборудования для детекции продуктов ПЦР в реальном времени необходимо после последнего цикла пробы прогреть в течение 10 мин при температуре 72 °С (при необходимости оставить пробы после реакции

на ночь, их помещают в холодильник при 4 °С или вводят дополнительный цикл на амплификаторе: 4 °С – 12 ч или более) и провести 3-й этап исследований.

3-й этап. Учет результатов ПЦР методом гель-электрофореза

1. Подготовка к электрофорезу в агарозном геле.

Приготовление буферного раствора для электрофореза. В мерном цилиндре смешивают: трис – 4,84 г, ледяную уксусную кислоту – 1,2 мл, ЭДТА из раствора 0,5 М – 100 мл, общий объем доводят дистиллированной водой до 1 л. Бромистый этидий добавляют до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Приготовление буфера для нанесения образцов (БО): в 100 мл дистиллированной воды вносят бромфеноловый синий – 0,25 г, фикол – 15 г.

Приготовление 2 %-ного агарозного геля: к 1,0 г агарозы добавляют 50 мл буферного раствора для электрофореза; смесь в термостойкой колбе нагревают в кипящей водяной бане, пока агароза не расплавится, после охлаждения агарозы до температуры 50 °С – выливают на подготовленный столик аппарата для электрофореза (типа ПГ-9), при этом образуется слой агарозы высотой 4 мм. С помощью специального штампа – «гребенки» на катодном конце геля формируют лунки для нанесения проб. Между дном лунок и основанием геля должен оставаться слой агарозы 0,5–1,0 мм.

Буферные емкости аппарата ПГ-9 заполняют ЭБ, при этом он должен покрывать гель слоем 4–5 мм. При необходимости разделения фрагментов ДНК, отличающихся на 20–50 пн, используют 2,5–3,0%-ный агарозный гель.

2. Проведение электрофореза:

– по окончании ПЦР к 15–20 мкл реакционной смеси добавляют 1–2 мкл 10х буфера БО. Смеси вносят в лунки геля под буферный раствор для электрофореза с помощью микродозатора.

Электрофорез проводят при градиенте напряжения 10 В/см в течение 45–90 мин, пока краситель – бромфеноловый синий – не пройдет от катодного конца геля 6–8 см (для разделения фрагментов ДНК, отличающихся на 20–50 пн, – 10–20 см).

Окрашенную бромистым этидием ДНК в геле просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют трансиллюминатор с максимальной длиной волны 254 нм. Гель фотографируют в проходящем ультрафиолете на фотопленку «Микрат-300», которую проявляют обычным способом.

При использовании ПЦР для детекции полиморфизмов результаты оценивают по наличию в геле фрагментов ДНК, полоски которых располагаются на том же уровне, что и в положительном контроле (имеют аналогичные размеры).

Приводим пример апробации методики на детях европеоидной расы, проживающих в условиях внешнесредовой экспозиции бенз(а)пиреном (исследуемая группа) (табл. 37).

Таблица 37

ОНП	Генотип	Контрольная популяция, $n = 33$		Исследуемая популяция, $n = 188$	
		абс.	%	абс.	%
CYP1A1 -9893A/G	A/A*	0	0	8	4
	A/G**	4	12	36	19
	G/G***	29	88	144	77
	G****	–	92	–	86
	A*****	–	8	–	14
ФНО-альфа G308A	A/A*	0	0	5	3
	A/G**	2	6	41	22
	G/G***	31	94	142	75
	G****	–	97	–	86
	A*****	–	3	–	14

Примечание:
* – патологическая гомозигота,
** – гетерозигота,
*** – нормальная гомозигота,
**** – нормальный аллель,
***** – патологический аллель (минорный, мутантный).

При выполнении исследования подсчитывают процент гомозигот и гетерозигот. Частоты аллелелей использовались в дальнейшем для расчета их распространенности в популяциях. Из литературы известны распространенности минорных аллелей изучаемых генов в среднеевропейской популяции.

Распространенность патологической гомозиготы по гену CYP1A1 (-9893A/G) в исследуемой и контрольной группе составила 4 и 0 % соответственно, а распространенность мутантного аллеля А в них – 14 и 8 %. CYP 1A1 характеризуется преимущественно монооксигеназной активностью, которая индуцируется полициклическими ароматическими углеводородами, и он, участвуя в промежуточном обмене многих эндогенных метаболитов, кроме того, осуществляет актива-

цию бенз(а)пирена. Высокая активность этого фермента ассоциирована с заменой нуклеотида и сопровождается повышенным риском онкозаболеваний при воздействии ПАУ.

Распространенность патологических гомозигот по гену TNF в исследуемой и контрольной группе составила 3 и 0 % соответственно, а распространенность мутантного аллеля А в них – 14 и 3 %. У гомозиготных носителей аллеля А (замена G308A в гене TNF) не происходило адекватного иммунного ответа на антиген. Индивиды с носительством минорного аллеля в промоторной области гена ФНО-α были ассоциированы с нарушениями дифференцировки клеток, аутоиммунными, инфекционными заболеваниями.

5.9. Кандидатные гены и их вариантные аллели в условиях различной факторной нагрузки

Формирование генетических особенностей не ограничивается национальной принадлежностью, ареалом обитания и пищевым специалитетом. Тем более, что в настоящее время стираются пространственные и расовые рамки, а пищевой фактор приобретает унифицированный характер. Все большее значение на современном этапе приобретает комбинация экологических факторов – биологических, химических, физических, усугубляющихся социальными (алкоголь, табакокурение, наркомания, лекарственные препараты) и информационными факторами (коммуникационный гемблинг).

Так, при изучении полиморфизма таких генов, как цитохром-450 (CYP1A1), CPOX, VEGF, eNO-синтаза, TNF-α, SULT1 у взрослого населения на территории, где ведущими факторами аэрогенной внешнесреловой нагрузки являются марганец, формальдегид, фенол, ванадий, установлено (табл. 38, 39):

1. Аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ и апоптоз (TNF-α), характеризуется преимущественной распространенностью у взрослых, проживающих в зоне влияния тяжелых металлов и зоне контроля.

2. Полиморфность гена сульфтрансферазы, отвечающей за детоксикацию органических соединений, характерна для взрослых, проживающих в зоне влияния фенола и формальдегида, причем как в минорном гомозиготном, так и гетерозиготном состоянии.

3. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции (eNO-синтаза) характерен для взрослых, проживающих в зоне влияния фенола – формальдегида, причем преимущественно в гетерозиготном состоянии, а также в зоне экспозиции металлами (ванадий, марганец) – преимущественно в мутантном гомозиготном состоянии. Полиморфизм гена риска развития атеросклероза и других нарушений пролиферации эндотелия (VEGF) был сопоставим в анализируемых группах.

4. Полиморфизм генов детоксикации CYP1A1, CPOX характеризует специфические различия экспонируемой территории. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1-й фазу детоксикации органических токсикантов у взрослых в условиях воздействия органических загрязнителей, превышает контрольную (за счет гетерозиготного генотипа), также характерна повышенная распространенность патологического аллеля CPOX (копропорфириногеноксидазы), отвечающего за конъюгацию металлопротеинов.

При изучении полиморфизма генов (цитохром-450 (CYP1A1), CPOX, VEGF, eNO-синтаза, TNF-α, SULT1) у детского населения установлено (табл. 38, 39):

1. Аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ и апоптоз (TNF-α), характеризуется преимущественной распространенностью вариантного аллеля у детей, проживающих в зоне вляиния органических загрязнителей.

2. Полиморфность гена сульфтрансферазы, отвечающей за детоксикацию органических соединений, характерна для детей, проживающих в зоне комбинированной экологической нагрузки, причем как в минорном гомозиготном, так и гетерозиготном состоянии.

3. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции (eNO-синтаза) характерен для детей, проживающих в зоне экспозиции органическими загрязнителями, причем преимущественно в гетерозиготном состоянии, полиморфизм гена риска развития атеросклероза и других нарушений пролиферации эндотелия (VEGF) был сопоставим в анализируемых группах.

Особенностью полиморфизма генов у детей, проживающих в зоне ответственности данной промзоны, является вариабельность генов детоксикации CYP1A1, CPOX. Встречаемость патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1-ю фазу детоксикации органических токсикантов, а также патологического аллеля CPOX (копропорфириногеноксидазы), отвечающего за конъюгацию металлопротеинов, у детей достоверно превышает аналогичную в группе контроля.

Таблица 38

Результаты генотипирования населения (взрослые – дети), проживающего на территории комбинированной гаптенной экспозиции

Ген	Генотип	Взрослые		Генотип	Дети	
		абс.	%		абс.	%
CYP1A1	Всего человек	156	100	Всего человек	390	100
	GG	145	93	GG	358	92
	GA	10	6	GA	32	8
	AA	1	1	AA	0	0
	Всего аллелей	312	100	Всего аллелей	780	100
	G	300	96	G	748	96
	A	12	4	A	32	4
CPOX	Всего человек	156	100	Всего человек	390	100
	AA	96	62	AA	272	70
	AC	57	37	AC	105	27
	CC	3	1	CC	13	3
	Всего аллелей	312	100	Всего аллелей	780	100
	A	249	80	A	649	83
	C	63	20	C	131	27
TNF	Всего человек	157	100	Всего человек	396	100
	GG	122	78	GG	302	76
	GA	34	21,6	GA	91	23
	AA	1	0,4	AA	3	1
	Всего аллелей	314	100	Всего аллелей	792	100
	G	278	89	G	695	88
	A	36	11	A	97	12
VEGF	Всего человек	154	100	Всего человек	373	100
	GG	84	55	GG	188	50
	GC	57	37	GC	150	40
	CC	13	8	CC	35	10
	Всего аллелей	308	100	Всего аллелей	746	100
	G	225	73	G	526	71
	C	83	17	C	220	29
eNOS	Всего человек	155	100	Всего человек	391	100
	GG	84	54	GG	185	47
	GT	62	40	GT	173	44
	TT	9	16	TT	33	9
	Всего аллелей	310	100	Всего аллелей	782	100
	G	230	74	G	543	69
	T	80	26	T	239	31
SULT1	Всего человек	135	100	Всего человек	316	100
	GG	37	27	GG	94	30
	GA	83	61	GA	185	59
	AA	15	12	AA	37	11
	Всего аллелей	270	100	Всего аллелей	632	100
	G	157	58	G	373	59
	A	113	42	A	259	41

Таблица 39

Генный полиморфизм в системе «родители–дети» в группе контроля

Ген	Генотип	Взрослые контроль		Генотип	Дети контроль	
		абс.	%		абс.	%
CYP1A1	Всего человек	55	100	Всего человек	97	100
	GG	52	94	GG	91	93
	GA	2	4	GA	6	7
	AA	1	2	AA	0	0
	Всего аллелей	110	100	Всего аллелей	194	100
	G	106	96	G	188	97
	A	4	4	A	6	3
CPOX	Всего человек	55	100	Всего человек	98	100
	AA	36	65	AA	65	66
	AC	19	35	AC	32	33
	CC	0	0	CC	1	1
	Всего аллелей	110	100	Всего аллелей	196	100
	A	91	83	A	162	83
	C	19	17	C	34	17
TNF	Всего человек	55	100	Всего человек	98	100
	GG	40	73	GG	77	79
	GA	14	25	GA	21	21
	AA	1	1	AA	0	0
	Всего аллелей	110	100	Всего аллелей	196	100
	G	94	85	G	175	89
	A	16	15	A	21	11
VEGF	Всего человек	52	100	Всего человек	96	100
	GG	27	52	GG	48	50
	GC	19	37	GC	38	40
	CC	6	11	CC	10	10
	Всего аллелей	104	100	Всего аллелей	192	100
	G	73	70	G	134	70
	C	31	30	C	58	30
eNOS	Всего человек	55	100	Всего человек	98	100
	GG	29	52	GG	59	60
	GT	23	41	GT	33	34
	TT	7	7	TT	6	6
	Всего аллелей	110	100	Всего аллелей	196	100
	G	81	74	G	151	77
	T	29	26	T	45	23
SULT1	Всего человек	48	100	Всего человек	91	100
	GG	17	35	GG	33	36
	GA	28	58	GA	47	52
	AA	3	7	AA	11	12
	Всего аллелей	96	100	Всего аллелей	182	100
	G	62	65	G	113	62
	A	34	35	A	69	38

Результаты исследования генетических маркеров чувствительности у работающего населения, где показателем факторной нагрузки, достоверно изменяющим значения показателей иммунитета, является **ванадий**, выявили другие генетические профили (табл. 40). Аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ и апоптоз (TNF-α), характеризуется повышенной распространенностью минорного аллеля (в 2,3 раза), по сравнению с уровнем контроля, за счет гетерозиготного и мутантного гомозиготного генотипов.

Таблица 40

Результаты генотипирования работников, экспонированных ванадием

Ген	Генотип	Экспозиция ванадием		Контроль	
		абс.	%	абс.	%
VEGF	Всего человек	44	100	55	100
	GG	20	45	30	54
	GC	20	45	23	42
	CC	4	10	2	4
	Всего аллелей	88	100	110	100
	G	60	68	83	75
	C	28	32	27	25
TNF	Всего человек	18	100	55	100
	GG	14	78	49	89
	GA	3	17	5	9
	AA	1	5	1	2
	Всего аллелей	36	100	110	100
	G	31	86	103	94
	A	5	14	7	6
CYP1A1	Всего человек	44	100	55	100
	AA	41	93	50	91
	AG	2	4,5	5	9
	GG	1	2,5	0	0
	Всего аллелей	88	100	110	100
	A	84	95	105	95
	G	4	5	5	5

Полиморфизм гена (VEGF) отличался от контрольного преимущественной распространенностью гена в мутантном гомозиготном состоянии (в 2,5 раза).

Полиморфизм гена детоксикации CYP1A1 характеризует специфические различия между анализируемыми группами. Распространен-

ность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1-ю фазу детоксикации органических токсикантов, превышает контрольную (за счет гомозиготного генотипа).

Таким образом, результаты оценки полиморфизма генов у **экспонированных ванадием работников**, CYP1A1, VEGF, TNF-α выявили преимущественные нарушения в генах фактора некроза опухоли и эндотелиального фактора роста по отношению к контролю за счет распространенности мутантного гомозиготного состояния генов.

Анализ однонуклеотидных замен **у работников, контактирующих с силиконовой пылью**, позволил установить, что аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ и апоптоз (TNF-α), характеризуется повышенной распространенностью минорного аллеля (в 2 раза) по сравнению с уровнем контроля, прежде всего за счет гетерозиготного генотипа.

Полиморфность гена MMP9, отвечающей за интенсивность продуктивных процессов, не отличалась от контроля.

Полиморфизм гена (VEGF) отличался от контрольного преимущественной распространенностью гена в мутантном гомозиготном состоянии, полиморфизм гена риска развития атеросклероза (APO) не отличался от цитируемого. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции (eNO-синтаза) был сопоставим в анализируемых группах (табл. 41).

Таблица 41

Результаты генотипирования работников, экспонированных силиконовой пылью

Ген	Генотип	Экспозиция силиконовой пылью		Контроль	
		абс.	%	абс.	%
1	2	3	4	5	6
VEGF	Всего человек	170	100	55	100
	GG	88	52	30	54
	GC	63	37	23	42
	CC	19	11	2	4
	Всего аллелей	340	100	110	100
	G	239	70	83	75
	C	101	30	27	25
TNF	Всего человек	184	100	55	100
	GG	144	78	49	89
	GA	38	21	5	9
	AA	2	1	1	2

Окончание табл. 41

1	2	3	4	5	6
	Всего аллелей	368	100	110	100
	G	326	89	103	94
	A	42	11	7	6
CYP1A1	Всего человек	182	100	55	100
	AA	161	88	50	91
	AG	18	10	5	9
	GG	3	2	0	0
	Всего аллелей	364	100	110	100
	A	340	93	105	95
	G	24	7	5	5
eNOS	Всего человек	185	100	55	100
	GG	106	57	31	56
	GT	65	35	21	38
	TT	14	8	3	6
	Всего аллелей	370	100	110	100
	G	277	75	83	75
	T	93	25	27	25
MMP9	Всего человек	174	100	54	100
	AA	71	41	15	29
	AG	77	44	32	58
	GG	26	15	7	13
	Всего аллелей	348	100	108	100
	A	219	63	62	57
	G	129	37	46	43

Таким образом, полиморфизм генов детоксикации (CYP1A1, CPOX) также остается определяющим в характеристике вариантности аллелей и генотипов в данной профессиональной группе. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1-ю фазу детоксикации органических токсикантов, превышает контрольную (за счет гомо- и гетерозиготного генотипа). Однотипность характера точечных нуклеотидных замен среди различных профессиональных групп не исключает вероятность подключения эпигенетического механизма воздействия на геном в системе «геном – транскриптом», в том числе с модификацией «метилирования – деметилирования» ДНК.

5.9.1. Характер однонуклетидных полиморфизмов у работников металлургического производства, экспонированных тяжелыми металлами (ванадий, марганец)

Изучение генетического полиморфизма у работников металлургического производства позволило выявить достоверное увеличение частоты встречаемости патологической аллели по гену p53 у работающих в условиях экспозиции тяжелыми металлами (ванадий, марганец) по сравнению с контрольной группой, в остальном работающие в цехах характеризуются более высокой частотой встречаемости нормальных гомозигот и/или гетерозигот по нескольким из изученных соматических генов (eNOS, VEGF, MMP9, TNF, CPOX) (табл. 42).

Таблица 42

Распределение частот генов у работающих на металлургическом комбинате (г. Чусовой)

Ген (ОНП)	Генотип/ аллель	Ферросплавный цех (группа 1), % (абс.)	Дуплекс цех (группа 2), % (абс.)	Заводоуправление (контроль), % (абс.)	*p1*	*p2*
1	2	3	4	5	6	7
p53	CC	58 (18)	41 (14)	53 (42)	0,07	0,04
	GC	29 (9)	41 (14)	36 (29)	0,02	0,04
	GG	13 (4)	18 (8)	11 (9)	0,06	0,10
	C	73	62	71	0,07	0,10
	G	27	38	29	0,10	0,01
cyp1A1	AA	100 (31)	91 (31)	92,5 (74)	0,10	0,90
	AG	0 (0)	9 (3)	7,5 (6)	0,01	0,80
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,90	0,90
	A	100	96	96	0,70	0,07
	G	0	4	4	0,02	0,20
CPOX	AA	71 (22)	79,5 (27)	83 (66)	0,06	0,05
	AC	29 (9)	20,5 (7)	16 (13)	0,04	0,03
	CC	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0,60	0,07
	A	85	90	91	0,70	0,08
	C	15	10	9	0,10	0,06
TNFA	GG	71 (22)	79,5 (27)	65 (52)	0,03	0,01
	AG	29 (9)	20,5 (7)	35 (28)	0,04	0,05
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,90	0,70
	G	85	90	82,5	0,06	0,80
	A	15	10	17,5	0,06	0,60
MMP9	AA	35,5 (11)	26 (9)	45 (36)	0,04	0,02
	AG	55 (17)	62 (21)	41 (33)	0,02	0,05
	GG	9,5 (3)	12 (4)	14 (11)	0,06	0,40
	A	63	57	66	0,07	0,60
	G	37	43	34	0,08	0,10

Окончание табл. 42

1	2	3	4	5	6	7
MMP12	AA	93,5 (29)	85 (29)	90 (72)	0,10	0,10
	AG	6,5 (2)	15 (5)	10 (8)	0,10	0,06
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,90	0,90
	A	97	93	95	0,70	0,70
	G	3	7	5	0,20	0,09
VEGF	GG	29 (9)	44 (15)	37 (30)	0,07	0,07
	GC	68 (21)	53 (18)	59 (47)	0,02	0,05
	CC	3 (1)	3 (1)	4 (3)	0,60	0,60
	G	63	71	67	0,70	0,10
	C	37	29	33	0,10	0,07
eNOS	GG	57 (17)	59 (20)	49 (39)	0,02	0,05
	GT	43 (13)	41 (14)	50 (40)	0,04	0,05
	TT	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0,60	0,90
	G	78	79	74	0,20	0,70
	T	22	21	26	0,09	0,02

Примечание: *p1* – достоверность различий между группой 1 и контролем ($p<0,05$); *p1* – достоверность различий между группой 2 и контролем ($p<0,05$).

При этом общее соотношение аллелей изученных генов в исследуемых группах достоверно не отличалось (см. табл. 42). Это может говорить о том, что рабочие специальности выбирают люди с генотипом, который условно определяется как «дикий», или «нормальный» тип, а носители его, как правило, характеризуются более крепким здоровьем и устойчивостью к неблагоприятным факторам среды.

5.9.2. SNP-особенности у работающих на химическом комбинате в условиях экспозиции ароматическими углеводородами

Результаты генетического тестирования работающих на химическом комбинате свидетельствуют о негативных ассоциациях с воздействием ароматических углеводов: снижение частоты нормального (дикого) аллельного варианта гена TNF, что может способствовать хронизации инфекционных заболеваний, снижению резистентности к антигенной нагрузке и формированию соматической патологии в форме аутоиммунных заболеваний и других пролиферативных состояний (табл. 43).

Таблица 43

Частота аллелей и генотипов у работающих на предприятиях органического синтеза

Ген (ОНП)	Генотип/ аллель	Лукойл, север, % (абс.)	Лукойл, юг, % (абс.)	Лукойл, Пермь (контроль), % (абс.)	*p1*	*p2*
cyp1A1	AA	90,5 (143)	92,5 (124)	86,5 (89)	0,03	0,02
	AG	9,5 (15)	7,5 (10)	13,5 (14)	0,03	0,01
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,80	0,80
	A	95	96	93	0,90	0,70
	G	5	4	7	0,60	0,80
MTHFR	CC	57,5 (91)	59 (80)	53 (55)	0,08	0,05
	CT	37 (58)	36 (48)	42 (43)	0,09	0,02
	TT	5,5 (9)	5 (7)	5 (5)	0,06	0,40
	C	76	77	74	0,07	0,60
	T	24	23	26	0,08	0,10
APOE	TT	76,5 (121)	72,5 (98)	69 (71)	0,02	0,06
	TC	21,5 (34)	26 (35)	28 (29)	0,90	0,90
	CC	2 (3)	1,5 (2)	3 (3)	0,70	0,70
	T	87	85,5	83	0,20	0,09
	C	13	14,5	17	0,07	0,07

Примечание: *p1* – достоверность различий между группой 1 и контролем ($p<0,05$); *p1* – достоверность различий между группой 2 и контролем ($p<0,05$).

При анализе частот распределения генов среди работающих на предприятиях органического синтеза на севере и юге Пермского края не выявлено отличий в распределении аллелей между группами. Однако нормальные гомозиготы и гетерозиготы достоверно чаще встречаются у тех работающих, производственный процесс у которых связан с воздействием вредных производственных и неблагоприятных климатических факторов окружающей среды (север края).

5.9.3. Встречаемость вариантных аллелей генов у детей в условиях аэрогенной экспозиции фенолами

Проведена оценка транзиций и трансверсий у детей, экспонированных фенолами (табл. 44).

Выявлены изменения в частотах гена TP53: увеличение частоты патологической аллели гена TP53 и увеличение распространенности гомозиготных носителей этого аллеля у детей, проживающих в зоне экспозиции фенолами, в 2 раза по сравнению с контролем. Выявлено также

увеличение частоты патологического аллеля гена SULT1A1 с увеличением встречаемости гомозиготных носителей этого аллеля более чем в 2 раза по сравнению с контролем (см. табл. 44).

Таблица 44

Частоты генов у детей, экспонированных фенолами

Ген (ОНП)	Генотип/ аллель	Группа наблюдения, *n* = 265, % (абс.)	Группа контроля, *n* = 73, % (абс.)	*p*
1	2	3	4	5
p53	CC	47,5 (126)	55 (40)	0,02
	GC	44,5 (118)	41 (30)	0,07
	GG	8 (21)	4 (3)	0,04
	C	70	75	0,07
	G	30	25	0,05
BRCA1	GG	42 (112)	34 (25)	0,01
	AG	43,5 (115)	47 (34)	0,9
	AA	14,5 (38)	19 (14)	0,7
	G	64	57,5	0,02
	A	36	42,5	0,06
BRCA2	AA	86 (228)	82 (60)	0,6
	AG	14 (36)	18 (13)	0,7
	GG	0 (0)	0 (0)	0,1
	A	93	91	0,08
	G	7	9	0,09
ESR1	GG	68 (180)	64 (47)	0,06
	AG	28 (75)	36 (26)	0,06
	AA	4 (10)	0 (0)	0,08
	G	82	82	0,07
	A	18	18	0,06
SULT1A1	GG	35 (92)	48 (35)	0,04
	AG	49 (130)	45 (33)	0,1
	AA	16 (43)	7 (5)	0,05
	G	59	70,5	0,04
	A	41	29,5	0,04
cyp1A1	GG	77 (203)	74 (54)	0,07
	GA	22 (58)	24,5 (18)	0,08
	AA	1 (3)	1,5 (1)	0,6
	G	88	86	0,7
	A	12	14	0,1
CPOX	AA	71 (187)	75,5 (55)	0,09
	AC	27,5 (73)	23 (17)	0,06
	CC	1,5 (3)	1,5 (1)	0,6
	A	85	87	0,2
	C	15	13	0,09

Окончание табл. 44

1	2	3	4	5
TNFA	GG	81 (212)	73 (53)	0,02
	AG	18 (47)	27 (20)	0,05
	AA	1 (3)	0 (0)	0,07
	G	90	86	0,1
	A	10	14	0,1
MMP9	AA	38 (99)	29 (21)	0,04
	AG	46 (121)	48 (35)	0,7
	GG	16 (43)	23 (17)	0,02
	A	61	53	0,04
	G	39	47	0,04
MMP12	AA	92 (242)	89 (65)	0,7
	AG	8 (22)	11 (8)	0,1
	GG	0 (0)	0 (0)	0,08
	A	96	94,5	0,09
	G	4	5,5	0,9
VEGF	GG	55 (145)	44 (32)	0,03
	GC	37 (99)	45 (33)	0,04
	CC	8 (21)	11 (8)	0,07
	G	73	66	0,04
	C	27	34	0,05
eNOS	GG	52 (137)	56 (41)	0,1
	GT	42 (111)	40 (29)	0,1
	TT	6 (16)	4 (3)	0,9
	G	73	76	0,7
	T	27	24	0,2

Существует повышенная вероятность развития в будущем у детей, экспонированных фенолами, некоторых онкологических заболеваний (рака молочных желез, эндометрия, пищевода, легких и др.). Усиливать этот риск будет воздействие фенола, паранитрофенола, трикрезола и других производных ароматических спиртов. Особенное внимание в плане профилактики необходимо уделить детям, несущим мутантные аллели в нескольких генах (генах системы детоксикации и генах, способствующих опухолевому росту, а также генах, регулирующих иммунный ответ).

5.9.4. Вариантность аллелей генов у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции формальдегидом и бензолом

Анализ полиморфизма генов цитохром-450 (CYP1A1), CPOX, VEGF, MMP9, p53, SULT1 у детей, подвергающихся хроническому аэрогенному воздействию опасных концентраций формальдегида и бензола, позволил установить (табл. 45):

1. Полиморфность гена сульфтрансферазы, отвечающей за детоксикацию органических соединений, отличалась высокой встречаемостью как в основной, так и в контрольной группах.

2. Аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ, апоптоз и онкопролиферацию (p53, MMP9) характеризовался отсутствием достоверных различий между анализируемыми группами.

3. Полиморфизм гена эндотелиальной дисфункции (VEGF) отличал группу под воздействием за счет гетерозиготного состояния гена.

4. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1-ю фазу детоксикации органических токсикантов, превышала контрольную в 3,0 раза.

Таблица 45

Результаты генотипирования детей, экспонированных бензолом и формальдегидом

Ген	Генотип	Наблюдение		Контроль	
		абс.	%	абс.	%
1	2	3	4	5	6
VEGF	Всего	146	100	57	100
	GG	81	55	33	58
	GC	57	39	18	32
	CC	8	6	6	10
	Всего аллелей	292	100	114	100
	G	219	75	84	74
	C	73	25	30	26
CYP1A1	Всего:	146	100	57	100
	AA	129	88	55	96
	AG	17	12	2	4
	GG	0	0	0	0
	Всего аллелей	292	100	114	100
	A	275	94	112	98
	G	17	6	2	2
CPOX	Всего:	146	100	57	100
	AA	93	64	33	58
	AC	51	35	21	37
	CC	2	1	3	5
	Всего аллелей	292	100	114	100
	A	237	81	87	76
	C	55	19	27	24
SULT1A1	Всего:	146	100	57	100
	GG	54	37	17	30
	GA	63	43	26	46
	AA	29	20	14	24

Окончание табл. 45

1	2	3	4	5	6
	Всего аллелей	292	100	114	100
	G	171	59	60	53
	A	121	41	54	47
MMP9	Всего:	146	100	57	100
	AA	51	35	16	28
	AG	70	48	32	56
	GG	25	17	9	16
	Всего аллелей	292	100	114	100
	A	172	59	64	56
	G	120	41	50	44
TP53	Всего:	146	100	57	100
	CC	74	51	23	40
	CG	61	42	26	46
	GG	11	7	8	14
	Всего аллелей	292	100	114	100
	C	209	72	72	63
	G	83	23	42	37

5.9.5. Однонуклеотидные замены у детей, проживающих в зоне влияния металлургического комбината

Проведенными нами исследованиями точечных замен у детей, экспонированных тяжелыми металлами, установлено увеличение частот генов с вариантными аллелями (TP53, TNFA, MMP9, MMP12, VEGF) (табл. 46). Это говорит о существующих направленных адаптационных процессах в изменении полиморфных вариантов генов.

Таблица 46

Частоты генов у детей, проживающих в зоне экспозиции тяжелыми металлами

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	Экспозиция, % (абс.)	Контроль, % (абс.)	*p*
1	2	3	4	5
p53	CC	52 (45)	50 (23)	0,07
	GC	40 (5)	50 (22)	0,02
	GG	8 (7)	0 (0)	0,04
	C	72	75	0,07
	G	28	25	0,10
cyp1A1	AA	89 (77)	87 (39)	0,10
	AG	9 (8)	9 (4)	0,08
	GG	2 (2)	4 (2)	0,90
	A	93	91	0,70
	G	7	9	0,10

Окончание табл. 46

1	2	3	4	5
CPOX	AA	70 (61)	56 (25)	0,03
	AC	28 (24)	42 (19)	0,04
	CC	2 (2)	2 (1)	0,60
	A	84	77	0,04
	C	16	23	0,04
TNFA	GG	61 (53)	84,5 (38)	0,03
	AG	39 (34)	15,5 (7)	0,04
	AA	0 (0)	0 (0)	0,90
	G	80	92	0,06
	A	20	8	0,03
MMP9	AA	19 (25)	44 (20)	0,04
	AG	53 (46)	47 (21)	0,08
	GG	18 (16)	9 (4)	0,04
	A	55	68	0,03
	G	45	32	0,01
MMP12	AA	90 (78)	98 (44)	0,04
	AG	10 (9)	2 (1)	0,03
	GG	0 (0)	0 (0)	0,90
	A	95	99	0,70
	G	5	1	0,02
VEGF	GG	60 (52)	53 (24)	0,05
	GC	33 (29)	47 (21)	0,05
	CC	7 (6)	0 (0)	0,02
	G	76	77	0,70
	C	24	23	0,10
eNOS	GG	64 (56)	49 (22)	0,02
	GT	30 (26)	40 (18)	0,02
	TT	6 (5)	11 (5)	0,04
	G	79	69	0,60
	T	21	31	0,02

Направленность этих процессов может привести в дальнейшем к увеличению частоты дефектов репродуктивной сферы, развитию онкологических (TP53, MMP9, MMP12), аутоиммунных (TNFA) и сердечно-сосудистых (VEGF) заболеваний у детей и генетической фиксации в следующих поколениях. Различное соотношение между нормальной и патологической аллелью в экспонируемой и контрольной группах по генам cyp1A1, CPOX, eNOS требует генеологического уточнения причин формирования данных различий.

5.9.6. Аллели и генотипы детского населения, проживающего в зоне влияния крупного аэропорта

Нами выявлено увеличение доли патологических гомозигот по генам P53 и VEGF у детей, проживающих в зоне влияния крупного аэропорта, в популяции этих детей повышена распространенность патологического аллеля гена VEGF (табл. 47). Данная особенность генетического полиморфизма может способствовать развитию ряда хронических заболеваний и онкологии у этих детей.

Таблица 47

Частоты генов у детей, проживающих в зоне влияния крупного аэропорта (Пулково)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	Пулково (группа наблюдения), % (абс.)	Пулково (контроль), % (абс.)
1	2	3	4
p53	CC	54 (40)	52 (13)
	GC	31 (23)	48 (12)
	GG	15 (11)	0 (0)
	C	70	76
	G	30	24
cyp1A1	AA	81 (60)	68 (17)
	AG	17,5 (13)	32 (8)
	GG	1,5 (1)	0 (0)
	A	90	84
	G	10	16
CPOX (921A/C)	AA	63 (47)	56 (14)
	AC	34 (25)	40 (10)
	CC	3 (2)	4 (1)
	A	80	76
	C	20	24
TNFA (G308A)	GG	80 (59)	75 (18)
	AG	20 (15)	25 (6)
	AA	0 (0)	0 (0)
	G	90	87,5
	A	10	12,5
MMP9	AA	34 (25)	40 (10)
	AG	50 (37)	40 (10)
	GG	16 (12)	20 (5)
	A	59	60
	G	41	40
MMP12	AA	93 (69)	92 (23)
	AG	7 (5)	8 (2)
	GG	0 (0)	0 (0)
	A	97	96
	G	3	4

Окончание табл. 47

1	2	3	4
VEGF	GG	58 (43)	72 (18)
	GC	30 (22)	20 (5)
	CC	12 (9)	8 (2)
	G	73	82
	C	27	18
eNOS	GG	61 (45)	64 (16)
	GT	36 (27)	32 (8)
	TT	3 (2)	4 (1)
	G	79	80
	T	21	20

Необходимо в очередной раз подчеркнуть, что имеющиеся варианты однонуклеотидных замен не являются результатом онтогенетической экологической, социальной и другой факторной нагрузки. Хотя этот факт является дискутабельным исходя из доказанной лабильности транскриптома и прижизненно изменяющейся экспрессии генов, модифицируемой эндогенными и экзогенными факторами. В условиях полиморфно измененных генов возникает опасность реализации контролируемых (либо уже неконтролируемых) минорным аллелем эффектов. А разрешающим фактором для запуска данных эффектов может служить любой (либо комбинация факторов), превышающий предел устойчивости системы, подответственной кандидатному гену, которая для данного фактора является органом (системой, клеткой, тканью) мишенью. Именно в таком контексте следует рассматривать наблюдаемые результаты тестирования генетического полиморфизма.

5.9.7. Ключевые однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), отражающие характер и особенности адаптации организма в условиях стронциевой геохимической провинции

Стабильный стронций входит в перечень химических веществ, обладающих мутагенной активностью (токсикологические профайлы Агентства по регистрации токсичных веществ и заболеваний США (ATSDR), 2004, 2008).

Восприимчивость организма к воздействию мутагенов зависит от генетических особенностей, определяющих состояние внутриклеточных белков, белков внеклеточного матрикса, белков эндотелия сосудов, ферментов детоксикации [1–3, 250]. К ведущим полиморфизмам, реализующим взаимодействие факторов окружающей среды

и процессов иммунологического гомеостаза, относятся полиморфизмы патогенетических генов, в том числе эндотелиального фактора роста (VEGF), траскрипционного фактора 53 (TP53), матричной металлопротеиназы.

Суперсемейство цитохромов P-450 (CYP-450) отвечает за микросомальное окисление и представляет собой группу ферментов, которые не только осуществляют метаболизм лекарств, но и участвуют в синтетических процессах стероидных гормонов, холестерина и токсикантов.

Ген CPOX кодирует синтез фермента копропорфириногеноксидазы, который катализирует окислительное декарбоксилирование металлопорфиринов. При нарушении синтеза металлопорфиринов, обусловленных дефектом гена, происходит накопление неактивных форм металлоорганических соединений, что вызывает развитие симптомов интоксикации, повышение чувствительности к солнечному свету, неврологические нарушения, злокачественные опухоли [250].

Ген p53 – онкосупрессор, его продукт – белок p53 – контролирует ответ клетки на различные виды стресса, включая повреждения ДНК химическими и физическими агентами, нарушения микротрубочек цитоскелета, активацию онкогенов, гипоксию, гипертермию и др. Активация гена p53 ведет к остановке пролиферации клетки и к включению в ней программы апоптоза.

Матриксные металлопротеиназы (MMP) играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития матрикса, при онкогенной трансформации клеток, при ангиогенезе и патологии, ассоциированной с клеточной пролиферацией.

Фактор VEGF и его рецепторы (VEGFR) играют решающую роль в ангиогенезе, а следствием блока ангиогенеза являются гипоксия, эндотелиальная дисфункция, усугубление клинической картины многих заболеваний (сердечно-сосудистых, органов дыхания, заболеваний печени).

Проведена индикация особенностей полиморфизма генов CYP1A1, MMP9, p53, CPOX, VEGF (табл. 48).

Установлены негативные ассоциации полиморфизма генов детоксикации (CYP1A1, CPOX), характеризующиеся повышенной над группой контроля распространенностью гетерозиготного варианта гена CYP1A1 в 2 раза, а также минорного гомозиготного варианта гена CPOX, при отсутствии патологического аллельного варианта CC в группе контроля. Выявленные ассоциации усугубляются тем, что у детей, экспонирован-

ных стронцием, в 1,5 раза повышена частота минорной гомозиготы гена MMP9, а также гетерозиготы гена TP53 (в 1,3 раза), что указывает на наличие негативной генетической вариабельности с предрасположенностью к онкологическим и аутоиммунным заболеваниям.

Таблица 48

Распределение частот генов VEGF, CYP1A1, TP53, MMP9, CPOX у детей, потребляющих воду, содержащую стронций

Ген	Генотип/ аллель	Группа наблюдения, *n* = 115 (%)	Группа контроля, *n* = 48 (%)
VEGF	GG	49	62
	GC	42	32
	CC	9	6
	G	70	78
	C	30	22
CYP1A1	GG	87	94
	GA	13	6
	AA	0	0
	G	93	97
	A	7	3
TP53	CC	45	51
	GC	48	38
	GG	7	11
	C	69	70
	G	31	30
MMP9	AA	35	41
	GA	43	45
	GG	22	14
	A	56	64
	G	44	36
CPOX	AA	74	69
	CA	23	31
	CC	3	0
	A	86	84
	C	14	16

Для полиморфизма генов пролиферации эндотелия (VEGF) характерно преобладание как минорной гомозиготы (в 1,5 раза), так и гетерозиготного генотипа (в 1,3 раза) по сравнению с группой контроля. Статистический анализ SNP-различий гена цитохрома P-450 (CYP1A1) между группами наблюдения и контроля позволил установить, что «случай» и «контроль» находятся в равновесии Харди –

Вайнберга, позволяющем проанализировать данные с применением мультипликативной модели. В нашем случае различие генотипов CYP1A1 между выборками достоверно описывается как мультипликативной, так и аддитивной моделями.

Анализ результатов изучения полиморфизма генов позволил выявить SNP-особенности у детей в условиях стронциевой геохимической провинции, которые характеризовались избыточной распространенностью вариантных аллелей генов цитохрома Р-450, эндотелиального фактора роста (VEGF) и металлопрпотеиназы (MMP9), а также их ассоциацией с контаминацией биосред стронцием и негативным иммунологическим ответом (рис. 43).

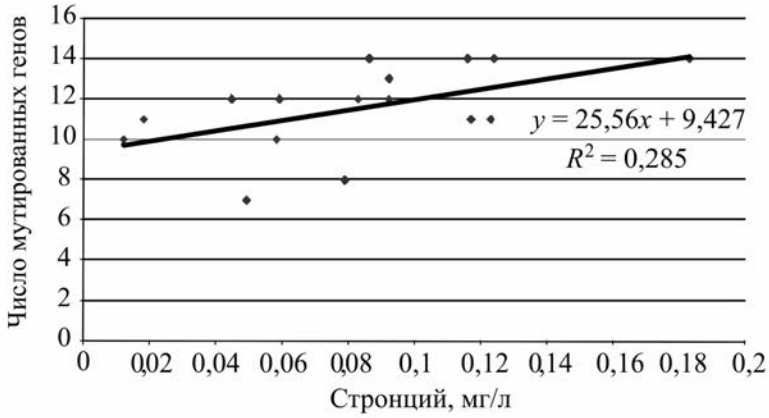


Рис. 43. Среднее количество генов, имеющих нуклеотидные замены, в условиях стронциевой эндемии

Проведенный анализ встречаемости однонуклеотидных замен в популяции европеоидов на территории стронциевой эндемии позволил установить достоверное увеличение количества мутированных генов при увеличении контаминантной нагрузки стронцием. Так, число вариантных генов возрастало с нарастанием концентрации стронция в крови с 7 в группе контроля до 14 из 30 изученных кандидатных генов ($p<0,05$).

5.9.8. Кандидатные гены нарушений иммунного ответа у детей, экспонированных хлороформом

Нарушения здоровья, обусловленные факторами водной среды, измененной продуктами хлорирования, определяют целесообразность научно-исследовательских работ по выявлению индивидуальной чувствительности организма к действию хлорорганических соединений

и функционального состояния систем генетической и иммунной регуляции гомеостаза. Проведено изучение полиморфизма генов детоксикации: CYP1A1 (цитохром), GSTA4 (глутатионтрансфераза), гена процедуры апоптоза FAS, гена ГКГС HLA DR1, TERT (теломераза), MMP9 (металлопротеиназа). Средние концентрации хлороформа в пробах воды исследуемой территории превосходили примерно в 2,5 раза аналогичные в пробах воды территории сравнения ($p<0,05$). Проведенное химико-аналитическое исследование выявило повышенные уровни хлороформа в биосредах обследуемых детей – в 2,0 раза выше, чем в крови детей, проживающих на территории сравнения.

В результате оценки полиморфизма генов иммунорегуляции и ферментов 1-й и 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков была выявлена достоверно повышенная ($p<0,05$) распространенность патологического аллеля гена цитохрома (в 3,0 раза), а также гетерозиготного генотипа гена глутатион-S-трансферазы (в 4,0 раза) у обследуемых детей относительно группы сравнения (табл. 49).

Аллельный полиморфизм гена металлопротеиназы характеризуется наличием достоверных различий группы наблюдения с группой сравнения (повышение распространенности мутантного аллеля MMP9 в 2,5 раза). Повышены распространенность вариантного гомозиготного генотипа гена FAS и гетерозиготного варианта генов HLA DR1 и теломеразы TERT по отношению к группе сравнения. Наблюдается достоверная взаимосвязь содержания ключевых ферментов и ответственных за них кандидатных генов ($p<0,05$).

В условиях контаминации питьевой воды хлороформом выявлены генетические нарушения экспрессии иммунорегуляторных белков, ассоциированные с полиморфизмом кандидатных генов иммунной системы: ген рецептора запуска процедуры апоптоза FAS, CYP1A1 (цитохром), GSTA4 (глутатионтрансфераза), ген главного комплекса гистосовместимости HLA DR1, TERT (теломераза), MMP9 (металлопротеиназа), характеризующих специфические различия между анализируемыми группами.

Результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения распространенности минорного аллеля генов иммунной регуляции и апоптоза, а также генов 1-й и 2-й фаз детоксикации. Белки иммунной регуляции (HLA DR1, FAS-рецептор) и кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров чувствительности и эффекта при оценке риска здоровью в условиях поступления избыточных концентраций хлороформа с питьевой

водой. Выявлен измененный генетический полиморфизм генов CYP1A1, GSTA4, TERT, MMP9, а также их ассоциация с контаминацией биосред хлороформом и специфическим иммунологическим ответом.

Таблица 49

Особенности генетического полиморфизма у детей, потребляющих воду с повышенным содержанием хлороформа (%)

Ген	Генотип	Группа сравнения (n = 46)	Группа наблюдения (n = 89)
CYP1A1	AA	96	88
	GA	4	12
	GG	0	0
	A	98	94
	G	2	6
MMP9	CC	72	44
	GC	28	47
	GG	0	9
	C	86	67
	G	14	33
TERT	CC	48	3
	CG	28	97
	GG	24	0
	C	62	52
	G	38	48
GSTA4	TT	88	78
	TC	4	16
	CC	8	6
	T	90	86
	C	10	14
SOD2	CC	52	47
	CA	28	28
	AA	20	25
	C	66	61
	A	34	39
ZMPSTE	TT	84	81
	TC	16	13
	CC	0	6
	T	92	88
	C	8	12

По результатам выполненных исследований полиморфной изменчивости генов на примере Пермского края и ряда территорий России научно обоснован базовый спектр маркеров чувствительности для изучения влияния антропогенных химических факторов (ароматических

углеводородов, фенолов, марганца и ванадия) на организм человека (ребенка и работающего населения) в условиях измененной генетической программы.

Целью продолжающихся исследований является обоснование перечня генетических маркеров для персонифицированной диагностики и идентификации индивидуального риска возникновения нарушений иммунологического здоровья в условиях гаптенной экспозиции (воздействия химических производственных и внешнесредовых факторов – органических соединений, металлов, шумового фактора) как модифицирующей, так и реализующей вариантную генетическую программу.

Генетическая диагностика в условиях гаптенной нагрузки как идентификация опасности факторов среды обитания должна быть представлена кандидатными генами, сформированными в следующие блоки: гены ферментов системы детоксикации ксенобиотиков; гены, участвующие в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях; гены предрасположенности к онкопролиферативным состояниям; гены состояния компонентов иммунного ответа.

Рекомендованный нами перечень значимых однонуклеотидных полиморфизмов, отвечающих за реализацию гаптенной активности факторов среды обитания, включает в себя следующие гены: цитохром-450 (CYP1A1), MTHFR, APO-E, TNF, MMP9, MMP12, CPOX, VEGF, NO-синтаза, p53, BRCA1, BRCA2, ESR1, SULT1A1. Причем для условий металлургического производства рекомендованный перечень генов состоит из TNF, MMP9, CPOX, VEGF, NO-синтазы, p53.

Для условий нефтедобычи рекомендован следующий перечень полиморфно измененных генов: CYP1A1, MTHFR, APO-E. Для задач мониторирования эффектов воздействия внешнесредовых факторов, в качестве которых выступают фенолы, рекомендуется оценка полиморфизмов следуюших генов как наиболее чувствительных: MTHFR, APO-E, MMP9, CPOX, VEGF, NO-синтаза, p53, BRCA1, SULT1A1. Для условий внешней среды, на качество которой оказывают влияние ванадий и марганец, определен перечень полиморфизмов, состоящий из APO-E, MMP9, VEGF, NO-синтазы, p53, TNF, SULT1A1. Для условий внешней среды, на качество которой оказывает воздействие комбинированная нагрузка – шум, марганец, бензол, формальдегид, перечень анализируемых полиморфизмов включает гены MMP9, VEGF, ENOs, p53.

5.10. Система ген-рецептор и особенности гендерных различий полиморфно измененных генов

Актуальным на сегодняшний день является выделение маркерных иммунологических и генетических показателей, оценка их взаимосвязей.

Нами проанализирован генетический статус (30 генов) мужчин и женщин, работающих на крупном предприятии химической промышленности Пермского края («Ависма»). В исследуемую группу включены работники с профессиями выбивщика титановой губки (ТГ) и сортировщика титановой губки (ТГ), в том числе 29 мужчин, 44 % от общего числа группы (выбивщики ТГ), и 37 женщин, 56 % от общего числа группы (все сортировщики ТГ). Средний возраст в группе наблюдения составляет 36,9 ± 2,4 г. Группу сравнения составили инженерно-технические работники (ИТР), численность группы 52 человека (44,2 % мужчин и 55,8 % женщин), средний возраст которых составляет 36,3 ± 1,4 г., средний стаж работы 12,5 ± 1,2 г. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, стажу, этническому составу.

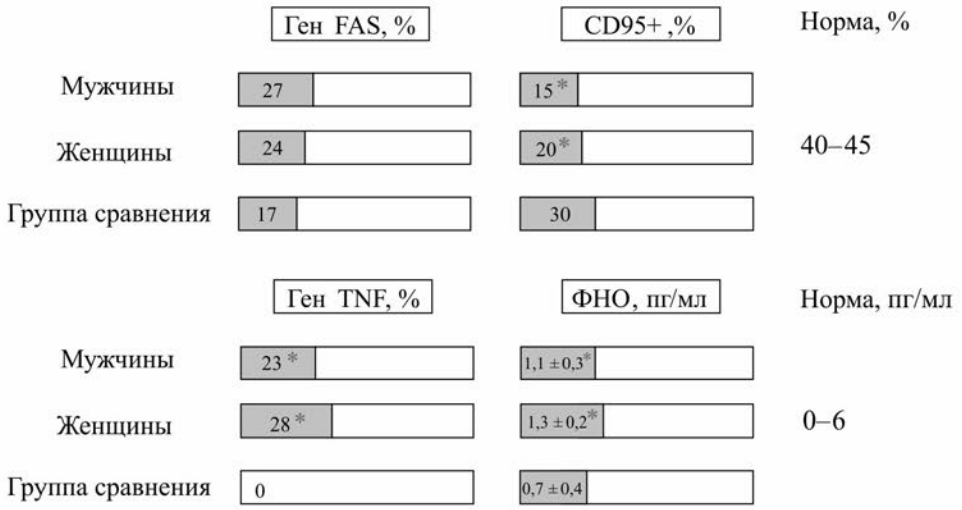
Изучен полиморфизм генов цитохром-450, MTHFR, GSTA4 (глутатион-трансфераза), SOD2, ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), TERT, FAS, FOXP3, MMP9, TNF-α. При анализе результатов аттестации рабочих мест по условиям труда установлено, что условия труда раздельщиков ТГ и сортировщиков ТГ ОПУ-1 цеха № 35 характеризуются сочетанным воздействием нанодисперсной пыли и производственного шума. Уровень шума на рабочем месте выбивщика и сортировщика ТГ достигает 88 дБА, что на 8 дБА превышает предельно допустимый уровень (ПДУ 80 дБА) и соответствует 2-й степени вредности третьего класса опасности (3.2). В образцах плазмы крови группы наблюдения преобладают частицы диапазона 0–30 нм, на их долю приходится в среднем 61,0 % (среднее процентное содержание в группе сравнения 48,8 %).

Результаты генетического типирования: мужская основная группа характеризовалась преобладанием вариантного аллеля по сравнению с таковыми в группе контроля и в женской подгруппе по следующим полиморфизмам генов: цитохрома CYP1A1, копропорфириногеноксидазы CPOX, рецепторов запуска процедуры апоптоза FAS и TNF, метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR, отвечающих за детоксикацию, нервную и эндокринную регуляцию, жировой и энергетический обмен [114].

Генотип работающих женщин характеризовался следующими генами с повышенной полиморфностью: металлопротеиназы MMP, цинк-

металлопептидазы ZMPSTE, фактора некроза опухоли TNF, метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR, отвечающих за детоксикацию, иммунную, нервную и эндокринную регуляцию, как за счет гетерозиготного, так и за счет гомозиготного вариантного генотипов.

Наибольший интерес представляли не столько гендерные различия в полиморфности генов и их спектра, сколько взаимоотношения в системе «ген – рецептор» (рис. 44).



Примечание: * – достоверная разница с группой сравнения

Рис. 44. Вариантные аллели генов FAS и TNF, ассоциированные с белками CD95+ и ФНО

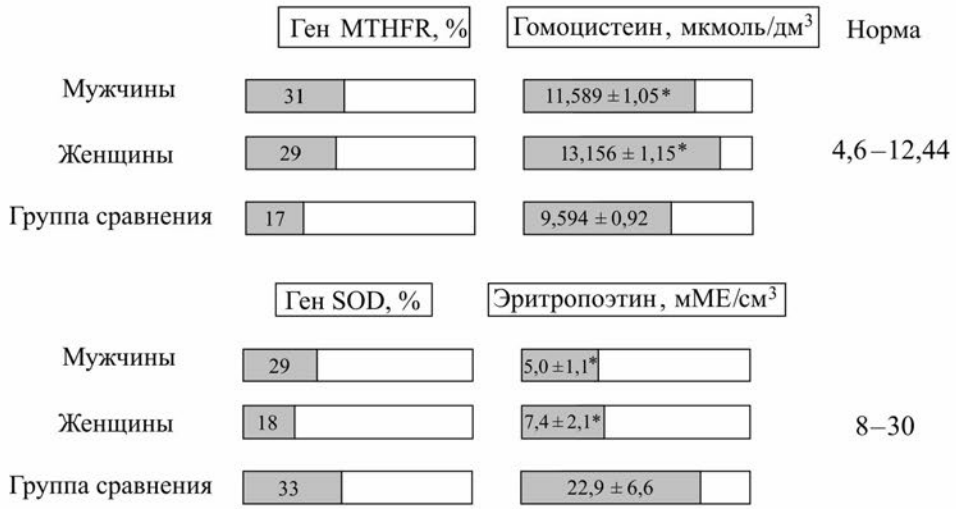
Проанализирована сравнительная экспрессия в парах «ген – кодируемый им белок»: ген метилентетрагидрофолатредуктазы – гомоцистеин; ген супероксиддисмутазы – эритропоэтин; ген FAS – CD95+; ген TNF – фактор некроза опухоли; ген ZMPSTE-релаксин; ген HTR2A – серотонин. Подконтрольные генам белки изменены адекватно встречаемости ответственных генотипов. Особенно четко «сцепленность» системы «фенотип – генотип» проявилась на примере иммуногенетических маркеров FAS и TNF, что подтверждает максимальную адаптационную устойчивость показателей иммунологического гомеостаза. Однако гены оксидации и детоксикации, которые характеризуются отсутствием достоверных различий, фенотипически различаются по величине кодируемых генами белков как у контингентов, имеющих разную по интенсивности факторную нагрузку, так и имеющих гендерные различия.

Так, при одинаковой вариантности аллеля гена метилентетрагидрофолатредуктазы количество гомоцистеина экспрессируется достоверно выше в условиях воздействия вредных производственных факторов и преимущественно у женщин (рис. 45).

Наблюдалось достоверное снижения уровня стресс-медиатора серотонина, ассоциированное с гетерозиготным генотипом гена серотонина у женщин (рис. 46).

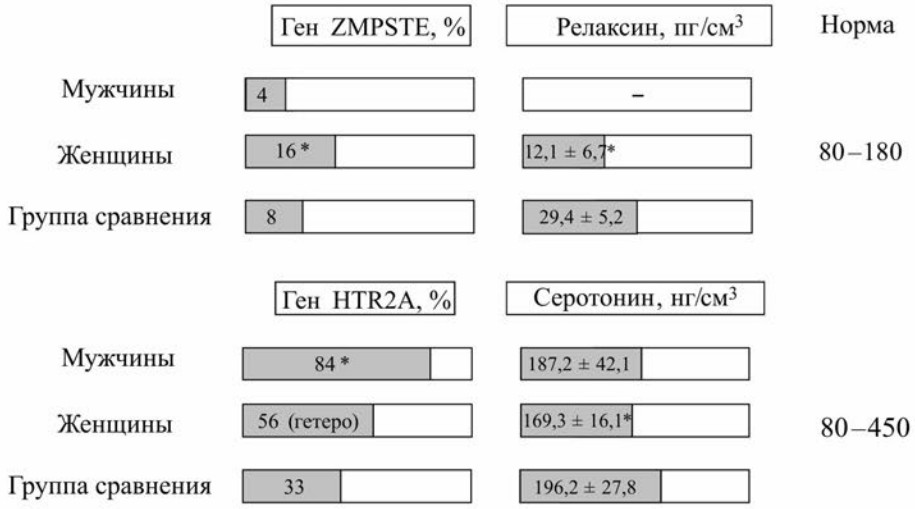
Таким образом, результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения у женщин по критерию распространенности минорного аллеля генов 1-й и 2-й фаз детоксикации, а также генов иммунной регуляции и апоптоза [170]. Белки иммунной регуляции (фактор некроза опухоли альфа, FAS-рецептор) и кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров чувствительности и эффекта при оценке риска здоровью комбинации вредных производственных факторов (шум и пыль).

При оценке взаимосвязей в системе «ген – белок» у нас постоянно возникал вопрос: насколько факторная нагрузка меняет жизненную генетическую программу? Каков количественный вклад фактора в реализацию аллельных наследственных особенностей?



Примечание: * – достоверная разница с группой сравнения

Рис. 45. Вариантные аллели генов MTHFR и SOD, ассоциированные с белками гомоцистеином и эритропоэтином



Примечание: * – достоверная разница с группой сравнения

Рис. 46. Вариантные аллели генов ZMPSTE и HTR2A, ассоциированные с белками релаксином и серотонином

Мы проанализировали динамичные ряды наиболее подходящей для такой оценки пары «ген – рецептор», отвечающей за апоптоз. Это ген FAS (ген смерти) и кодируемый данным геном рецептор смерти CD95+.

Использование в качестве инструмента при такой оценке гена рецептора CD95+ обусловлено тем, что, во-первых, среди маркеров апоптоза наиболее изученным является клеточный рецептор CD95 (FAS), по которому судят об активации иммунных клеток и их готовности к FAS-индуцированному апоптозу; во-вторых, измененный ген является предиктором, т.е. наиболее ранним предвестником возможных нарушений функции иммунной системы, системы, регулирующей адаптацию к факторам окружающей среды. В качестве индуктора, модифицирующего связь «ген – рецептор», мы выбрали условия чрезмерной контаминации умеренным мутагеном, в качестве которого выступал **стабильный** стронций (**Sr^{2+}**), **который принимает участие** в переключении основных режимов функционирования клетки, тем самым являясь промотором в **регуляции апоптоза**. При воздействии стронция как лиганда происходит запуск цепочки событий апоптоза через FAS-рецептор (CD95+), передача сигнала через мембрану в разные компартменты клетки, внутриклеточное распознавание, с последующим сигнальным процессингом, включающим активацию и транслокацию транскрипционных факторов, что в итоге приводит к транскрипции и экспрессии

требуемых генов. **В настоящее время не вызывает сомнения участие стронция в изменение трансдукции апоптотического сигнала, однако возможные механизмы участия Sr^2 в регуляции летальной программы иммунокомпетентных клеток остаются недостаточно изученными.** В качестве критерия оценки нарушения регуляции клеточной гибели в условиях химической контаминации нами использовался уровень снижения мембранного рецептора клеточной гибели CD95+ при условии гомо- и гетерозиготных аллельных вариантов гена FAS (ген CD95+). Ген FAS кодирует CD95+ и его экспрессию, и в случае полиморфизма гена (гетерозиготное или патологическое гомозиготное его состояние) наблюдается снижение функции запуска событий апоптоза и «старение» клетки. Цепочка молекулярных событий под воздействием чрезмерных по интенсивности факторов, таких как стронций, в основе действия которых лежит поломка апоптотического сигнала путем шединга сигнальных рецепторов, приводит к реализации негативной генетической программы. Нами были установлены количественные критерии этих показателей: наличие патологического гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена FAS, снижение в крови уровня лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD95+, в 1,5 раза и более по отношению к нижней границе физиологической нормы CD95+ для детей, и при превышении концентрации стронция в крови более чем в 1,5 раза по отношению к референтному уровню реализует негативную генетическую программу, замедляя процесс апоптоза (табл. 50).

Данные, приведенные в табл. 43, показывают, что при сочетании мутантного (гетерозиготное или патологическое гомозиготное состояние аллеля) гена FAS и концентрации виновного фактора (стронция) выше референтной (0,077 мг/л) более чем в 1,5 раза наблюдается снижение концентрации лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD95+, в 1,5 раза и более по отношению к значениям CD95+, соответствующим физиологической норме. Тогда как при допустимом (на уровне референтной концентрации) содержании стронция в крови, даже в условиях наследования мутантного генотипа гена FAS, содержание рецептора CD95+ снижено менее чем в 1,5 раза по сравнению с физиологической нормой.

Эти выводы подтверждаются показателем маркера апоптоза – аннексином. При совокупности трех указанных критериев (наличие патологического гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена FAS, снижение в крови уровня рецептора CD95+ в 1,5 раза и более по отно-

Таблица 50

Данные по установлению критериев оценки влияния стронция на апоптоз у обследованных детей

Пациент	Содержание стронция в крови, мг/л (референтный уровень 0,077 мг/л)	Аллельное состояние гена FAS, определенного в пробе буккального эпителия	Уровень рецептора CD95+, % (норма для детей – 15–25 %)	Уровень аннексина, % (норма 1,6–2,6)
Пациенты с мутантным аллелем гена FAS, снижением в крови уровня лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD95+, в 1,5 раза и более по отношению к нижней границе физиологической нормы и превышением Sr в крови более чем в 1,5 раза по сравнению с референтным уровнем				
Пациент 1	0,153	CT	9	1.35
Пациент 2	0,124	CT	10	1.51
Пациент 3	0,163	TT	10	1.25
Пациент 4	0,371	CT	8	1.08
Пациент 5	0,184	CT	9	0,96
Пациенты с мутантным аллелем гена FAS, не сниженным в 1,5 раза в крови уровнем лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD95+, по отношению к нижней границе физиологической нормы и отсутствием превышения Sr в крови более чем в 1,5 раза по сравнению с референтным уровнем				
Пациент 6	0,073	CT	14	2,54
Пациент 7	0,059	TT	18	1,86
Пациент 8	0,111	CT	11	1,75
Пациент 9	0,055	CT	19	1,99
Пациенты с нормальным гомозиготным аллелем гена FAS и высоким уровнем Sr в крови				
Пациент 10	0,163	CC	14	1,71
Пациент 11	0,122	CC	12	1,51
Пациент 12	0,159	CC	14	1,59
Пациент 13	0,181	CC	13	1,34
Пациенты с нормальным гомозиготным аллелем гена FAS и допустимым уровнем Sr в крови				
Пациент 14	0,009	CC	22	1,96
Пациент 15	0,043	CC	19	1,79
Пациент 16	0,066	CC	22	1,88
Пациент 17	0,059	CC	24	1,89

Примечание: С – нормальное гомозиготное состояние аллеля гена FAS; Т – гетерозиготное или патологическое гомозиготное состояние аллеля гена FAS (мутантный аллель). Зависимость содержания рецептора CD95+, %, от концентрации стронция в крови, мг/л, достоверна ($r^2 = -0,85$; $p = 0,000001$).

шению к нижней границе физиологической нормы рецептора CD95+ и при превышении концентрации стронция в крови более чем в 1,5 раза по отношению к референтному уровню) уровень аннексина в организме пациента (см. табл. 50) выходит за пределы нормы, а значит это указы-

вает на снижение процесса апоптоза или запрограммированной клеточной гибели, и таким образом подтверждает точность и достоверность предлагаемого способа. При других вариантах уровень аннексина в организме соответствует норме [17, 131].

Таким образом, для выявления реализации генетической поломки нарушений физиологического процесса клеточной гибели, ассоциированного с экспозицией стронция в крови, рекомендуется использование методического подхода, основанного на определении содержания стронция в крови, генотипа гена FAS, кодирующего белок смерти, и содержание самого рецептора CD95+. В случае, если наличие мутантного аллеля гена FAS ассоциировано со снижением концентрации белка рецептора CD95+ в 1,5 раза и более по отношению к нижней границе физиологической нормы CD95+, на фоне снижения апоптоза (аннексиновый тест), а также превышения концентрации стронция более чем в 1,5 раза по отношению к референтному уровню, фиксируется реализация стронцием негативной генетической программы у человека.

Приводим несколько примеров иммунологического и генетического исследования конкретных пациентов одного возраста и этнической принадлежности из группы обследованных: с повышенным содержанием стронция в крови и наличием мутантного аллеля гена FAS; с содержанием стронция в пределах референтной концентрации и наличием мутантного аллеля гена FAS; с повышенным содержанием стронция в крови и отсутствием мутантного аллеля; с содержанием стронция в пределах референтной концентрации и отсутствием мутантного аллеля гена FAS.

Пример 1. Пациент, 12 лет, русский. Определяется уровень стронция в крови более чем в 1,5 раза выше референтных уровней – 0,153 мг/дм^3. Определяется наличие мутантного аллеля гена FAS по гетерозиготному генотипу. Значение клеточного рецептора CD95$^+$: 9 % – в 1,67 раза ниже нижней границы нормы. Содержание аннексинпрокрашенных клеток, т.е. клеток, ушедших в апоптоз, – 1,35 % – ниже диапазона нормы (1,6–2,6 %). Таким образом, при анализе клеточного фенотипа CD95$^+$ установлено его снижение более чем в 1,5 раза по отношению к нижней границе нормы (15–25 %) на фоне повышенного по отношению к референтному уровню более чем в 1,5 раза содержания стронция в крови, а также наличия гетерозиготного полиморфизма гена FAS, кодирующего рецептор CD95+, и снижения числа клеток, ушедших в апоптоз, за пределы нижней границы нормы, что указывает

на реализацию негативной генетической программы угнетения апоптоза у данного пациента, инициированной действием стронция.

Пример 2. Пациент, 11 лет, русский. Определяется уровень стронция в крови, не превышающий в 1,5 раза референтный уровень, – 0,111 мг/дм^3. Значение клеточного рецептора смерти CD95$^+$: 11 % – в 1,36 раза ниже нижней границы нормы. Содержание аннексинпрокрашенных клеток, т.е. клеток, ушедших в апоптоз, 1,75 % – в диапазоне нормы (1,6–2,6 %). Таким образом, при анализе клеточного фенотипа CD95$^+$ установлено его снижение менее чем в 1,5 раза по отношению к нижней границе нормы (15–25 %), на фоне менее чем в 1,5 раза повышенного по отношению к референтному уровню содержания стронция в крови, а также наличие гетерозиготного полиморфизма гена FAS без снижения количества клеток, ушедших в апоптоз, что указывает на отсутствие у данного пациента реализации негативной генетической программы угнетения апоптоза при уровне воздействующего фактора – стронция – ниже значения, превышающего в 1,5 раза референтный уровень.

Пример 3. Пациент, 12 лет, русский. Определяется уровень стронция в крови более чем в 1,5 раза выше референтных уровней – 0,163 мг/дм^3. Отсутствует мутантный аллель гена FAS. Значение клеточного рецептора CD95$^+$: 14 % – в 1,07 раза ниже нижней границы нормы. Содержание аннексинпрокрашенных клеток, т.е. клеток ушедших в апоптоз, 1,71 % – в диапазоне нормы (1,6–2,6 %). Таким образом, при анализе клеточного фенотипа CD95$^+$ установлено его снижение менее чем в 1,5 раза по отношению к нижней границе нормы (15–25 %) на фоне повышенного по отношению к референтному уровню (более чем в 1,5 раза) содержания стронция в крови при отсутствии полиморфизма гена FAS, кодирующего рецептор CD95, и нормальном уровне клеток, ушедших в апоптоз, что указывает на воздействие повышенной концентрации стронция на рецептор смерти, но в отсутствии негативной генетической программы это превышение не изменяет физиологический процесс апоптоза.

Пример 4. Пациент, 11 лет, русский. Определяется уровень стронция в крови менее чем в 1,5 раза выше референтных уровней – 0,043 мг/дм^3. Отсутствует мутантный аллель гена FAS. Значение клеточного рецептора смерти CD95$^+$: 19 % – в пределах диапазона нормы. Содержание аннексинпрокрашенных клеток, т.е. клеток ушедших в апоптоз, 1,79 % – в диапазоне нормы (1,6–2,6 %). Таким образом, при анализе кле-

точного фенотипа $CD95^+$ установлено его допустимое содержание на фоне допустимого по отношению к референтному уровню содержания стронция в крови, при отсутствии полиморфизма гена FAS, кодирующего рецептор CD95+, и нормальном уровне клеток, ушедших в апоптоз, что указывает на физиологическое течение событий апоптоза на фоне мажорной генетической программы и допустимого уровня экспозиции стронцием.

Приведенные данные показывают, что анализ системы «рецептор CD95+ – варианты аллеля гена FAS» позволяет количественно оценить состояние клеточной гибели и прогнозировать негативные иммунологические события.

5.11. Генетическая фиксациия в системе «мать–ребенок»

Вопросы генетической фиксации в настоящее время позиционируются как наиболее важные в контексте многообразия антигенной, особенно гаптенной, нагрузки на человека. Филогенетически выработанные адаптационные факторы за тысячелетия существования человеческой популяции не защищают человека от синтезированных за короткое последнее время химических и других искусственных факторов, не обеспеченных метаболическими и конъюгационными ферментными системами и иммунологическими и другими антистрессорными механизмами.

Защитные генетические механизмы пытаются обезопасить геном человека от «мусорных», транскриптомно опосредованных «накоплений». Рецессивные мутантные замены не поддерживаются позитивным контроллингом, подвергаясь элиминации. Однако продолжающаяся гаптенная агрессия приводит к заркеплению минорных аллельных вариантов геномом, который видит в этом необходимую адаптационную перестройку.

Какие тенденции изменчивости генома прослеживаются сегодня в условиях специфической гаптенной нагрузки? И какие конкретно гены принимают участие в геномно-транскриптомной перестройке? На эти вопросы мы попытались ответить в рамках исследования особенностей генетического полимофизма родителей и их детей в экспонированных мутагенами условиях.

В условиях повышенной экспозиции стабильным стронцием наблюдались полиморфные изменения у родителей в 19 генах из 29 анализируемых, при этом фиксация минорных транзиций произошла по 8 генам, 3 из которых – это гены онкопролиферации, 2 – детоксикации

и оксигенации, остальные – гены репродукции, углевдного обмена и иммунорегуляции. Тогда как в группе, не экспонированной стронцием, генетически зафиксированы 2 замены – гена фермента конъюгации и фермента долголетия (рис. 47).

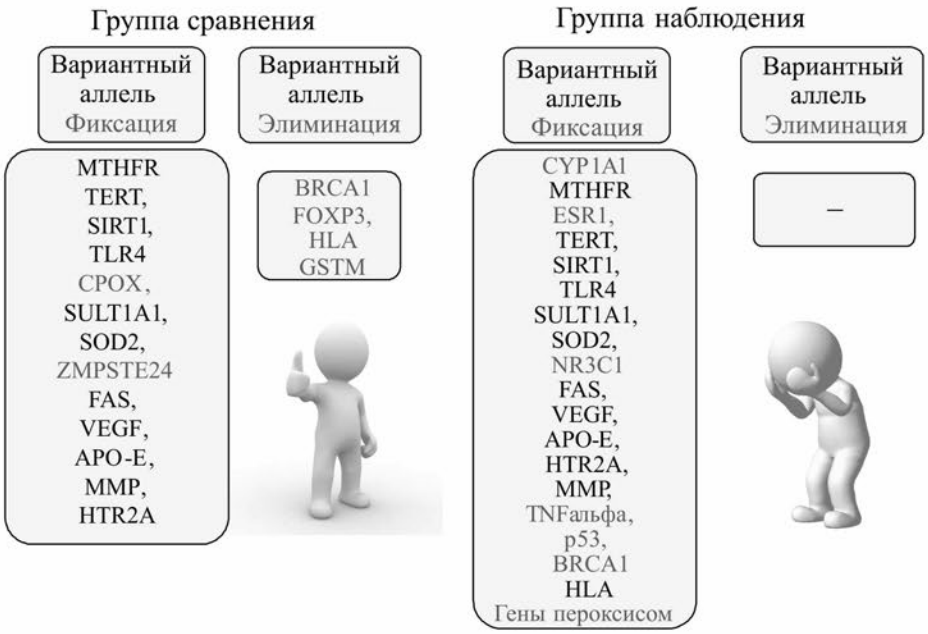


Рис. 47. Генетическая фиксация в условиях экспозиции мутагеном

Процесс элиминации негативных полиморфных перестроек в генах сопровождался их отсутствием в группе «под воздействием» и «потерей» вариантного аллеля генами иммунорегуляции (**FOXP3, HLA),** онкогенами (**BRCA1**) и геном детоксикации (**GSTM).**

Адекватность ответа организма на воздействие средовых химических факторов в значительной мере зависит от особенностей генетических ассоциаций, определяющих состояние компонентов иммунного ответа и активность ферментов системы детоксикации ксенобиотиков [3]. Для подтверждения этой гипотезы нами проведено изучение особенностей фиксации генов иммунной системы в диадах «мать–ребенок» в условиях воздействия отходов предприятия цветной металлургии.

Группу наблюдения составили 66 пар «мать–ребенок», проживающих в условиях воздействия отходов вольфрамового комбината. Средний возраст женщин в группе наблюдения составлял 36,9 ± 2,4 г., детей – 6,3 ± 1,4 г. Группу сравнения составили 26 пар, проживающих вне терри-

тории экспозиции тяжелыми металлами (возраст женщин – 36,3 ± 1,4 г., детей – 6,2 ± 1,2 г.). Группы были сопоставимы по хронической заболеваемости и этническому составу.

Для диагностики генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки на основании изучения специализированной литературы нами подобраны *гены и их участки в качестве маркеров чувствительности вероятных рисков возникновения индуцированных средой нарушений иммунитета*: иммуногенетические маркеры – FAS, FOXP3, TLR4 (толл-рецептор 4), HLA-DRA, TP53 (rs3950989, rs1042522), ген промоторной области TNFA (rs1800629) фактора некроза опухолей; гены систем детоксикации – цитохром P-450 CYP1A1 (rs4646421 и rs1048943), CYP2D6_rs38, CYP2D6_rs10, CYP17, копропорфириногеноксидазы CPOX (rs1131857), метилентетрагидрофолатредуктазы (rs1801133) MTHFR; гены сосудистых факторов – VEGF, эндотелиальной NO-синтазы eNOS (rs1799983), белка аполипопротеина E ApoE (rs429358); гены иммуноассоциированных белков (в том числе принимающих участие в апоптозе) – матриксных протеиназ MMP9 (rs17576), сульфотрансферазы SULT1A1 (rs9282861), GSTA4 (глутатионтрансаминаза), GSTP1_rs16 и GSTP1_rs11 (глутатионтрансфераза), супероксиддисмутаза SOD2, ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), теломераза TERT, сиртуин SIRT1, маркеры нейроэндокринной регуляции иммунной системы – ANKK, MTNR, PER2, HTR2A и обмена – TCF7L2, SLC2A, NR3C1, гены системы рецепторов пероксисом PPAR. Математический анализ в диадах «мать–ребенок» проводился с использованием статистического метода «копи-пара». Сравнительный анализ передачи генетической информации (ДНК) от матери ребенку в исследуемых группах и ее достоверность оценивались с использованием критерия Стьюдента и критерия согласия Пирсона (хи-квадрат).

Установлено, что население, проживающие на территории воздействия отходов предприятия цветной металлургии, подвергается комбинированной аэрогенной экспозицией металлами: свинец, кадмий, медь, цинк, никель, марганец, хром (VI), литий, магний оксид, алюминий, титан, ванадий пентоксид, железо, кобальт, стронций, вольфрам.

Проведена оценка генетического сдвига в виде закрепления материнского патологического аллеля у ребенка в исследуемой группе. Оказалось что иммунорегуляторные гены толл-рецептора 4, HLA-DRA, TP53 (rs3950989), ген фактора некроза опухолей, а также гены, отвечающие за вторую фазу метаболизма ксенобиотиков и одновременно

ассоциированные с процедурой апоптоза: GSTA (глутатионтрансаминаза), GSTP1_rs11 (глутатион-S-трансфераза), ZMPSTE (цинкметаллопептидаза), ген-онкосупрессор TP53_1, ДНК ребенка характеризуются достоверно (по критерию Пирсона) измененным аллельным полиморфизмом в сравнении с ДНК матери, отличаясь негативной фиксацией мутантного аллеля.

Проведен сравнительный анализ передачи генетической информации (ДНК) от матери ребенку в исследуемых группах статистическим методом «копи-пара». В табл. 51 представлены результаты фиксации вариантного аллеля кандидатных генов, достоверно различающиеся с контролем.

Таблица 51

Достоверные негативные сценарии генетической фиксации в экспонируемых диадах в сравнении с контролем ($p<0,05$)

Ген	Аллельные варианты передачи генотипа от матери ребенку			
	1–1	1–2	2–1	3–3
SLC2A	К>О			К<О
SOD2	К>О			
MMP9		К<О		
TLR4			К>О	
HLA-DRA	К>О	К<О		

Примечание: 1 – нормальная гомозигота; 2 – гетерозигота; 3 – вариантная гомозигота; К – контрольная группа; О – исследуемая группа.

Результаты изучения передачи генетической информации (полиморфно измененных генов) от матери ребенку в сравниваемых группах позволили установить достоверные изменения в экспонируемых диадах **по отношению к контролю** по следующим генам:

1. Ген HLA-DRA, играющий **важнейшую** роль в распознавании чужеродного и развитии иммунного ответа, характеризуется достоверным по отношению к контрольной группе ($p<0,05$) угнетением наследования здорового материнского генотипа ребенком, прежде всего за счет формирования у ребенка гетерозиготного генотипа.

2. Ген TLR4 (**толл-подобный рецептор**) ассоциирован с нарушением врожденного иммунитета и атопизацией организма. У детей исследуемой группы нарушается блокирование негативного генетического наследования от мам, имеющих гетерозиготность по данному гену, достоверно отличное от контрольной группы.

3. Ген SOD2, кодирующий одноименный белок **супероксиддисмутазу** и отвечающий за оксидативные митохондриальные процессы, играет важную роль в предупреждении оксидантного клеточного стресса, также характеризуется в исследуемой группе достоверным изменением передачи здоровой генетической информации от матери ребенку по сравнению с группой контроля. Известно, что мутация гена SOD2 ассоциируется с заболеваниями ЦНС (болезнь двигательного нейрона), ССС (ишемическая болезнь сердца, инфаркт), печени (нарушение синтетической и детоксикационной функции).

4. Ген MMP9 (**матриксная металлопротеиназа**) в анализируемых диадах отличается формированием в исследуемом регионе гетерозиготного генотипа у детей, имеющих мам со здоровым аллельным вариантом гена. Полиморфный вариант гена матриксной металлопротеиназы несет ответственность за развитие ряда патологических процессов продуктивного характера – РА, рассеянный склероз, астма, злокачественные опухоли, а также инфаркт, репродуктивные нарушения.

5. Ген SLC2A (**белок-переносчик глюкозы**) в исследуемой группе характеризуется достоверным нарушением (снижением) передачи здорового материнского генотипа ребенку, а также достоверной фиксацией у ребенка материнской мутантной гомозиготы. Мутантный аллель гена SLC2A ассоциирован с нарушениями в ЦНС и сердечно-сосудистой системе (эпилепсия, ишемия, инсульт), в системе обмена веществ (мочекислый диатез, подагра, диабет).

Таким образом, особенности фиксации генетической информации в диадах «мать–ребенок» характеризуются достоверным «мусорным», транскриптомно опосредованным «накоплением» у детей исследуемой территории рецессивных мутантных замен в генах, отвечающих за иммунорегуляцию, клеточную гибель и процессы метаболизма иммуноцитов, детоксикацию, репродуктивные нарушения и онкопролиферацию, и ассоциированы с условиями комбинированной экспозиции тяжелыми металлами. Белки иммунной регуляции толл-рецептора 4, HLA-DRA, TP53 (rs3950989), фактор некроза опухоли, а также белки, ассоциированные с апоптозом и метаболизмом ксенобиотиков (глутатионтрансаминаза, глутатион S-трансфераза, цинкметаллопептидаза, супероксиддисмутаза, матриксная металлопротеиназа), и кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров чувствительности и эффекта при оценке риска здоровью экспозиции вредных средовых факторов (металлы).

По результатам выполненных исследований нами на примере Пермского края, Свердловской и Ленинградской областей научно обоснован оптимальный подбор генетических маркеров для исследований и оценки опасности влияния техногенных химических факторов на здоровье человека, характеризующихся иммунотоксическим воздействием на организм (металлов, хлорорганических углеводородов, фенола и алифатических альдегидов), с учетом особенностей маркеров ДНК-полиморфизма иммунных и обменных нарушений. Дополнительный объем диагностических генетических исследований рекомендован в качестве расширения диагностических критериев и профилактики заболеваний детского и взрослого населения, в том числе работающих в условиях оказания стационарной и амбулаторно-поликлинической помощи и проведения ПМО.

В результате достижения поставленной в работе цели обоснован перечень генетических маркеров для гигиенической диагностики у детей и работающих иммунных нарушений, отвечающих за особенности мутагенной активности таких техногенных химических факторов, как CYP1A1, CYP1A2, MTHFR, APO-E, CPOX, SIRT1, GSTP1, VEGF, NO-синтаза, MMP9, TNF-α, SULTA1, p53, BRCA1, BRCA2.

6. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА. ЕГО ОСОБЕННОСТИ И РЕЗУЛЬТАТЫ В УСЛОВИЯХ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ

6.1. Генетический полиморфизм и тандемные повторы в генах

Генетическое тестирование методом ПЦР на индивидуальном уровне дает только качественные результаты, требующие дополнительного тестирования функциональной активности исследованных генов. Многосредовая комбинированная экспозиция химическими мутагенами (бенз(а)пирен, бензол, формальдегид, хлороформ, фенолы, ванадий и др.) ведет к возникновению генетических и эпигенетических нарушений, которые для своей идентификации требуют более тонких и развернутых молекулярных иследований. Для подтверждения реализации особенностей генетического полиморфизма требуется количественное тестирование геномных или эпигеномных нарушений, что позволяет методология сиквенса гена или его участков как оценка экспрессии генов.

Одной из сложных задач изучения генетического полиморфизма является выявление тандемных повторов и числа замен в генах, отвечающих за механизмы восприятия сигналов в иммунной и эндокринной системах, так как для их изучения невозможно использовать рутинные методы генотипирования, применяемые для выявления единичных однонуклеотидных замен (SNP).

В то же время для выявления гетерогенности популяции и выявления направления изменения генетического материала под воздействием естественных и антропогенных факторов среды обитания необходим маркер, имеющий помимо качественных характеристик, также количественное выражение. Одними из таких маркеров являются тандемные повторы и количество транзиций, делеций, трансверсий, так как при увеличении генетического разнообразия изменяется количество таких повторов. В таком случае можно говорить о сдвиге в количестве повторов в гене и о его функциональном значении (рис. 48).

Мы провели поиск такого маркера и остановились на маркере гена D2 рецептора дофамина (DRD2) как гена, отвечающего за регуляцию нейроэндокринного и иммунного гомеостазов. В то же время этот ген,

Рис. 48. Секвенатор линейки Roche 454 (Швейцария)

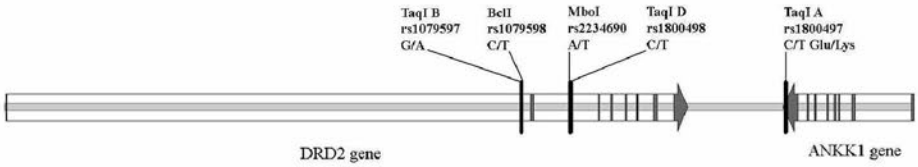


Рис. 49. Генетическая структура гена DRD 2

по литературным данным, характеризуется как ген, имеющий в своем составе множество вариантов тандемных повторов (рис. 49).

В пятом экзоне этого гена имеется участок, характеризующийся вариабельностью и имеющий от 2 до 8 тандемных повторов в своей структуре. При исследовании генетической структуры методом масс-спектрометрического анализа выявлены пики масс для продуктов гена DRD2, лежащие в диапазонах от 379 (для 2 повторов) до 667 (для 8 повторов) пар оснований (рис. 50).

Мы исследовали генетическую структуру гена DRD2 методом секвенирования. Для создания библиотеки использовались праймеры, позволяющие ограничить область исследования только этим геном. Праймеры были предоставлены ООО «Синтол» (г. Москва). Была использована процедура создания ампликоновых библиотек для накопления продуктов этого гена. После чего методом электрофореза в агарозном геле эти продукты были разделены (рис. 51).

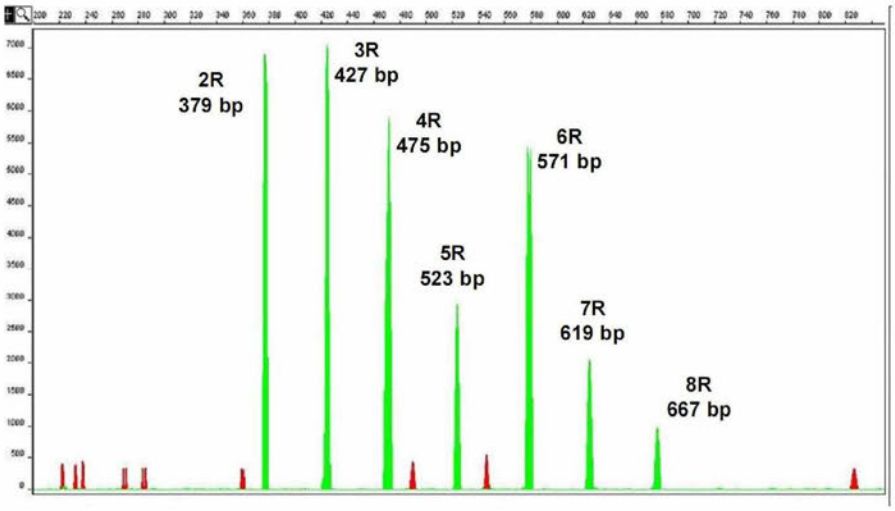


Рис. 50. Распределение тандемных повторов в гене DRD2 по массе

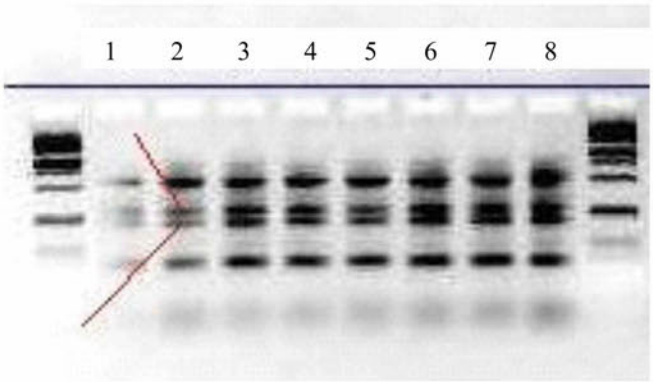


Рис. 51. Электрофорез продуктов гена DRD2

Нас интересовал диапазон продуктов, лежащий между двумя красными стрелками на уровне маркера длины 500 bp, поэтому все прочие продукты были отсечены с использованием специальной технологии очистки ампликонов на колонках.

Последовательность нуклеотидов в 5-м экзоне представлена:

– 69361 cgtgttcatc atctgctggc tgcccttctt catcacacac atcctgaaca tacactgtga;

– 69421 ctgcaacatc ccgcctgtcc tgtacagcgc cttcacgtgg ctgggctatg tcaacagcgc;

– 69481 cgtgaacccc atcatctaca ccaccttcaa cattgagttc cgcaaggcct tcctgaagat;

– 69541 cctccactgc tgactctgct gcctgcccgc acagcagcct gcttcccacc tccctgccca;

– 69601 ggccggccag cctcaccctt gcgaaccgtg agcaggaagg cctgggtgga tcggcctcct;

– 69661 cttcaccccg gcaggccctg cagtgttcgc ttggctccat gctcctcact gcccgcacac;

– 69721 cctcactctg ccagggcagt gctagtgagc tgggcatggt accagccctg gggctgggcc;

– 69781 ccccagctca ggggcagctc atagagtccc ccctcccacc tccagtcccc ctatccttgg;

– 69841 caccaaagat gcagccgcct tccttgacct tcctctgggg ctctagggtt gctggagcct;

– 69901 gagtc**agggc cca**gaggctg agttttctct ttgtggggct tggcgtggag caggcggtgg;

– 69961 ggagagatgg acagttcaca ccctgca**aggg ccca**caggag gcaagcaagc tctcttgccg;

– 70021 aggagccagg caacttcagt cctgggagac ccatgtaaat accagactgc aggttggacc;

– 70081 ccagagattc ccaagccaaa aaccttagct ccctcccgca ccccgatgtg gacctctact;

– 70141 ttccaggcta gtccggaccc acctcacccc gttacagctc cccaagtggt ttccacatgc;

– 70201 tctgagaaga ggagccctca tcttga**aggg ccca**ggaggg tctatgggga gaggaactcc;

– 70261 ttggcctagc ccaccctgct gccttctgac ggccctgcaa tgtatccctt ctcacagcac;

– 70321 atgctggcca gcctggggcc tggcagggag gtcaggccct ggaactctat ctgggcctgg;

– 70381 gctaggggac atcagaggtt ctttgaggga ctgcctctgc cacactctga cgcaaaacca;

– 70441 ctttcctttt ctattccttc tggcctttcc tctctcctgt ttcccttccc ttccactgcc;

– 70501 tctgccttag aggagcccac ggctaagagg ctgctgaaaa ccatctggcc tggcctggcc;

– 70561 ctgccctgag gaaggagggg aagctgcagc ttgggagagc ccctggggcc tagactctgt;

– 70621 aacatcacta tccatgcacc aaactaataa aactttgacg agtcaccttc caggacccct;

– 70681 gggta.

Выявлено 3 повтора в струкуре гена DRD2 – обозначены на последовательности гена жирным цветов с подчеркиванием.

У восьми исследованных нами человек были выявлены повторы, встречающиеся в геноме с частотой 5, 8 и 3 раза.

Метод секвенирования подходит также и для изучения однонуклеотидных полиморфизмов. На структуре гена DRD2 видно пять маркеров (Taq 1 A, Taq IB, Bel I, Mbo I, Taq I D). Можно одновременно генотипировать ДНК по все пяти маркерам. У восьми исследованных пациентов были выявлены полиморфизмы, представленные в табл. 52.

Таблица 52

Результаты генотипирования пациентов по 5 маркерам гена DRD2

Пациент	Taq 1 A	Taq IB	Bel I	Mbo I	Taq I D
№ 1	**CT**	GG	CC	**AT**	CC
№ 2	CC	GG	CC	AA	**CT**
№ 3	CC	**GA**	CC	AA	CC
№ 4	**CT**	GG	**CT**	AA	CC
№ 5	CC	GG	CC	**AT**	**TT**
№ 6	**CT**	GG	**CT**	AA	CC
№ 7	**CT**	GG	**CT**	**AT**	**CT**
№ 8	CC	**AA**	CC	**AT**	**CT**

Этот метод значительно увеличивает скорость генотипирования по множественным маркерам и позволяет выявлять новые мутации. Если ген вариабелен, то можно в одном исследовании изучить все варианты мутаций, имеющиеся у пациента.

Таким образом, впервые проведенными в Пермском крае исследованиями по расшифровке генома человека изучены распределения частот тандемных повторов гена D2 рецептора дофамина. Отмечаемый полиморфизм в структуре гена DRD2 у населения позволяет использовать данный маркер для изучения генетического разнообразия. С использованием технологии расшифровки последовательностей в дальнейшем проведено таргетное ресеквенирование интересующих нас участков ДНК и подобраны несколько участков, по которым необходимо провести сравнительные исследования. Представленные распределения аллельных вариантов по тандемным генетическим маркерам гена DRD2 (5-й экзон) характеризуются высоким уровнем полиморфизма и гетерозиготности. В структуре гена DRD2 мы различали пять маркеров (Taq 1 A, Taq IB, Bel I, Mbo I, Taq I D). Метод секвенирования позволяет одновременно генотипировать ДНК по всем пяти маркерам. При анализе полиморфизма триплетных повторов микро- и мини-сателлитных локусов в популяциях не было обнаружено достоверных различий в спектрах распределения аллелей. Однако у восьми исследованных нами человек выявлены повторы, встречающиеся в геноме с частотой 5, 8 и 3 раза. Отмечаемые сдвиги максимальных пиков в сторону с большим или меньшим числом повторов у представителей разных популяций, а также оценка вариабельности гена с оценкой всех вариантов мутаций, имеющихся у пациента, дает возможность использовать данные сиквенса для изучения генетического разнообразия в различных условиях природных и техногенных факторных комбинаций

6.2. Генетический полиморфизм и секвенирование на жидких биочипах

В этом разделе монографии приводим основные результаты впервые проведенной в Пермском крае расшифровке генома человека с использованием жидких биочипов. Методом таргетного секвенирования расшифрована структура 27 генов человека. Исследование включало расшифровку значимых полиморфизмов экзонов и регуляторных областей. Метод секвенирования позволил одновременно генотипировать

ДНК по всем изучаемым генам. Был разработан специальный жидкостный биочип, позволяющий унифицировать исследования и сравнивать полученные данные с референсной последовательностью и данные индивидуумов между собой. Различия в полиморфизмах выявлены по более чем 200 точкам у каждого отдельного индивидуума. Оценка вариабельности гена с оценкой всех вариантов мутаций, имеющихся у пациента, с использованием результатов сиквенса способствовала изучению генетического разнообразия в различных условиях природных и техногенных факторных комбинаций.

Библиотека зондов была подготовлена заранее по 27 интересующим нас генам и включала в себя около 2 млн олигонуклеотидных зондов, комплементарных интересующим нас областям. Проведено изучение полиморфизма генов CYP1A2, IL17F, IL17D, IL17C, IL17B, TLR4, TERT, FAS, FOXP3, TP53, HLADRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, NR3C1, VEGF, ZMPSTE, ESR1, ANKK1.

Полиморфизм может быть обусловлен единичными однонуклеотидными заменами или вызван более крупными перестройками, не затрагивающими биологически значимых функций организма, в противном случае мутации могут оказаться летальными или патологическими. Более крупные перестройки могут быть вызваны многократным повторением одной и той же последовательности (тандемные повторы). Если для выявления однонуклеотидных замен существует большое количество методов и диагностика единичной замены в гене не представляет сложности, то выявление тандемных повторов в генах является одной из сложных задач изучения генетического полиморфизма. Для изучения тандемных повторов невозможно использовать рутинные методы генотипирования, применяемые для выявления единичных однонуклеотидных замен (SNP).

В то же время для выявления гетерогенности популяции и выявления направления изменения генетического материала под воздействием естественных и антропогенных факторов среды обитания необходим маркер, имеющий помимо качественных характеристик, также количественное выражение. Одними из таких маркеров являются тандемные повторы, так как при увеличении генетического разнообразия изменяется количество таких повторов либо в сторону уменьшения, либо в сторону увеличения. В таком случае можно говорить о сдвиге в количестве повторов в гене и о его функциональном значении.

Технология выполнения секвенирования включает в себя несколько этапов. Прежде всего необходимо выделить ДНК человека из биоло-

гического материала. Мы использовали цельную кровь, полученную путем венепункции периферической вены. Кровь стабилизировали ЭДТА для предотвращения свертывания. Затем из ядерных клеток крови необходимо выделить ДНК. Использовалась сорбентная технология выделения нуклеиновой кислоты. Данным методом удается максимально сохранить весь объем получаемой ДНК и при этом хорошего качества, без повреждений и примесей.

После выделения ДНК необходимо приготовить библиотеку, которую впоследствии можно было бы использовать для секвенирования. Библиотека должна быть представлена относительно короткими участками ДНК, так как современные технологии секвенировния ограничены длинной прочтения порядка 800 нуклеотидов, для этого использовалась процедура небулизации ДНК в атмосфере азота. Азот при высоком давлении, 2,1 бар, расщепляет молекулу ДНК на отдельные участки различного размера, которые после последующей очистки с помощью специальных колонок можно подобрать по длине, подходящей для секвенирования.

Полученная библиотека носит название «шот-ган библиотека», или быстрая библиотека, так как для ее создание требуется всего около двух минут. В такой библиотеке каждая уникальная последовательность содержится в незначительном числе копий, так как изначально полученная ДНК была разрезана в случайном порядке, интересующие нас последовательности могли сохраниться только в нескольких копиях. Необходимо обогатить библиотеку, то есть амплифицировать все последовательности, содержащиеся в библиотеке несколько раз. Для этого проводится LM-ПЦР со специальной библиотекой зондов, комплементарных последовательностям адаптеров, присоединенных к имеющейся ДНК-библиотеке. После этого мы снова очищали полученную обогащенную библиотеку и подготавливали ее для эмульсионной ПЦР и секвенирования.

Проводится эмульсионная ПЦР для отжига нашей библиотеки на специальных частицах (шариках) и последующая ее амплификация на них. Таким образом образуются шарики, каждый из которых несет на своей поверхности уникальную последовательность ДНК, клонированную несколько раз (идентичную) для того чтобы люминесцентный сигнал, посылаемый в дальнейшем от прочитанного нуклеотида, можно было зарегистрировать (уловить). Таким образом, образованная эмульсия наносится на подготовленную пикотитровальную пластину, в кото-

рой имеется множество лунок, в каждую из которых может поместиться только один шарик. Именно в этих лунках и будет проходить реакция достраивания комплементарной цепи ДНК, то есть секвенирование. Каждое новое присоединение нуклеотида к достраивающейся цепочке регистрируется прибором (секвенатором) и в последующем обрабатывается с помощью программного обеспечения и преобразуется в привычную для нас последовательность нуклеотидов.

При работе с жидким биочипом происходит направленный отбор генов на этапе LM-ПЦР, когда в исходной библиотеке амплифицируются не все имеющиеся последовательности, а только те, которые гибридизировались с соответствующими зондами из библиотеки (библиотека зондов была подготовлена заранее по 27 интересующим нас генам и включала в себе около 2 млн олигонуклеотидных зондов, комплементарных интересующим нас областям). Такая библиотека уникальна и была разработана специалистами компании Roche специально для решения наших задач.

Метод секвенирования подходит также и для изучения однонуклеотидных полиморфизмов. Можно одновременно генотипировать ДНК по нескольким маркерам (мультиплексность). У шести обследованных пациентов были выявлены полиморфизмы в следующих генах (табл. 53).

Таблица 53

Результаты секвенирования генов человека по критерию количества ДНК полиморфизмов

Хромосома	Ген	Количество полиморфизмов в сравнении с референсной последовательностью					
		1-й п.	2-й п.	3-й п.	4-й п.	5-й п.	6-й п.
1	2	3	4	5	6	7	8
1	MTHFR	13	13	13	14	23	23
1	CLCN6	0	1	0	0	1	1
1	ZMPSTE24	4	3	3	4	1	4
3	CPOX	1	8	7	8	8	10
5	TERT	9	5	14	3	6	5
5	IL17B	0	2	0	2	1	1
6	PPARD	4	6	4	5	5	1
6	VEGFA	2	4	3	2	8	5
6	IL17F	0	0	0	0	0	1
6	GSTA4	11	12	9	15	11	15
6	SOD	4	0	6	2	0	6
6	HLADRB1	45	19	6	0	15	10
7	NOS3	19	14	12	14	12	14
9	TLR4	0	1	1	1	2	2

Окончание табл. 53

1	2	3	4	5	6	7	8
10	ACTA2	1	1	1	2	0	0
10	FAS	0	4	8	5	7	9
11	SIRT3	9	12	8	12	8	1
11	TH	17	16	15	8	16	18
11	DRD2	19	12	16	14	19	20
13	IL17D	3	1	2	1	1	1
15	CYP1A2	5	3	3	4	3	4
16	SULT1A1	41	33	37	10	39	37
16	IL17C	3	3	2	3	4	2
17	TP53	7	7	6	6	7	6
17	ACE	4	28	24	22	21	25
19	APOE	3	3	3	2	2	5
X	FOXP3	3	3	4	0	2	2
14 хромосом	27 генов	227	214	207	159	222	228
Итого							

Примечание: здесь и далее: п. – пациент.

Этот метод значительно увеличивает скорость генотипирования по множественным маркерам и позволяет выявлять новые мутации. Если ген вариабелен, то можно в одном исследовании изучить все варианты мутаций, имеющиеся у пациента (см. табл. 53). Для выделения кандидатных генов мы провели анализ и ранжирование полиморфности генов исходя из их функциональной принадлежности, разделив их на группы: гены иммунорегуляции, гены обмена веществ, гены детоксикации и соматические гены, представляющие преимущественно медиаторы нервной системы (табл. 54, рис. 52)

Из табл. 46 видно, что ранжирование пациентов по полиморфизму генов различных функциональных систем меняется от системы к системе. Так, наиболее критичным по функционированию генов системы детоксикации может оказаться пациент № 6 (несколько целевых генов), по функционированию систем иммунорегуляции – пациент № 1 (целевой ген HLADRB1), по полиморфизму в обменных генах – пациент № 2 (целевой ген ACE), а по генам нервно-мышечной системы – пациент № 6 (целевой ген DRD2) (табл. 55).

В структуре мутаций максимальной полиморфностью обладают гены детоксикации – 37,5 % из всей выборки генов, второй ранг занимают гены обмена – 27,5 %, замены в генах иммунорегуляции и соматических генах выражены в меньшей степени.

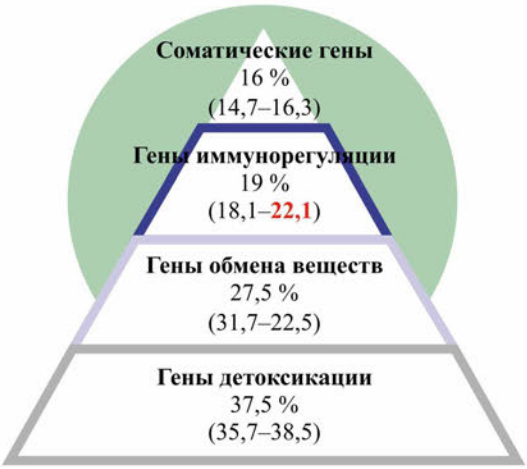


Рис. 52. Соотношение и структурные особенности полиморфно измененных генов в зависимости от условий контаминации мутагеном

Таблица 54

Результаты секвенирования по группам патогномоничных генов

Функциональные группы генов	Ген	Количество полиморфизмов в сравнении с референсной последовательностью					
		1-й п.	2-й п.	3-й п.	4-й п.	5-й п.	6-й п.
1	2	3	4	5	6	7	8
Гены детоксикации	MTHFR	13	13	13	14	23	23
	ZMPSTE24	4	3	3	4	1	4
	CPOX	1	8	7	8	8	10
	GSTA4	11	12	9	15	11	15
	SOD	4	0	6	2	0	6
	CYP1A2	5	3	3	4	3	4
	SULT1A1	41	33	37	10	39	37
Итого по генам детоксикации	7 генов	79	72	78	57	85	99
Гены иммунорегуляции	IL17B	0	2	0	2	1	1
	IL17C	3	3	2	3	4	2
	IL17D	3	1	2	1	1	1
	IL17F	0	0	0	0	0	1
	VEGFA	2	4	3	2	8	5
	HLADRB1	45	19	6	0	15	10
	TLR4	0	1	1	1	2	2
	FAS	0	4	8	5	7	9
	TP53	7	7	6	6	7	6
	FOXP3	3	3	4	0	2	2
Итого по генам ммунорегуляци и и пролиферации	10 генов	63	44	32	20	47	39
Гены обмена веществ	ACE	4	28	24	22	21	25
	APOE	3	3	3	2	2	5

Окончание табл. 54

1	2	3	4	5	6	7	8
	SIRT3	9	12	8	12	8	1
	PPARD	4	6	4	5	5	1
	NOS3	19	14	12	14	12	14
	TERT	9	5	14	3	6	5
Итого по генам обмена веществ	6 генов	48	68	65	58	54	51
Соматические гены	ACTA2	1	1	1	2	0	0
	CLCN6	0	1	0	0	1	1
	TH	17	16	15	8	16	18
	DRD2	19	12	16	14	19	20
Итого по соматическим генам (нервно-мышечные)	4 гена	37	30	32	24	36	39

Таблица 55

Анализ результатов секвенирования генов

Показатель	Пациент					
	1	2	3	4	5	6
Стронций в моче, мг/л	4,549	0,978	1,068	1,739	1,494	2,993
Стронций в крови, мг/л	0,129	0,0574	0,0704	0,266	0,166	0,258
Относительное влияние на гены детокикации	11,3	10,3	11,1	8,1	12,1	14,1
Относительное влияние на гены иммунорегуляции и пролиферации	6,3	4,4	3,2	2,0	4,7	3,9
Относительное влияние на гены обмена веществ	8	8,5	8,1	7,3	6,8	6,4
Относительное влияние на соматические гены	9,3	7,5	8	6	9	9,8

Однако в выборке пациентов с высокой контаминацией мутагена число транзиций генов иммунорегуляции возрастает и сравнивается с полиморфностью генов обмена веществ, число вариантных участков которых снижается (22,1 и 22,5 % соответственно). Это связано, скорее всего, с высокой лабильностью полиморфности функциональных белков и медиаторов обмена веществ, обеспечиающих адаптивность к изменяющимся характеристикам среды и высокой чувствительностью транскриптомно-геномных взаимосвязей для иммунорегуляторных генов.

Максимальное число полиморфно измененных участков генов выявлено в группе генов детоксикации, причем наибольший полиморфизм свойственен сульфотрансферазе 1A1 (SULT1A1) и метилентетрагидрофолатредуктазе, а наиболее консервативными из этой функциональной системы оказались супероксиддисмутаза (SOD) и копропорфириногеноксидаза (CPOX). Менее полиморфно изменены гены систем иммунной и нервной регуляции. При этом наибольшему полиморфизму из

этой системы подвержен HLADRB1, что объяснимо с позиций регуляции иммунного ответа, многие гены иммунного ответа и онкогенеза достаточно консервативны.

Методология секвенирования позволила количественно оценить генетическое закрепление точечных замен в системе «мать–ребенок» (рис. 53).

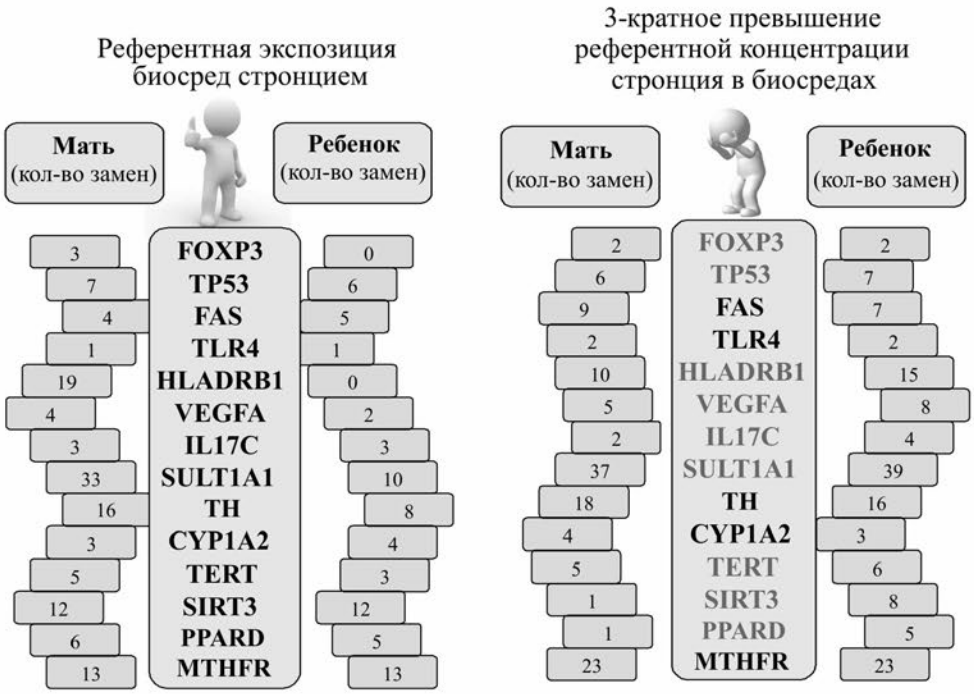


Рис. 53. Количество наследуемых нуклеотидных замен в системе «мать–ребенок» с разным уровнем экспозиции мутагеном

Так, в случае постоянной экспозиции мутагеном не наблюдалась элиминация однонуклеотидных замен у потомства или выявлялось увеличение количества вариантных участков следующих генов: гены транскрипционных факторов FOXp3 и p53, ген белка главного комплекса гистосовместимости, ген эндотелиального фактора роста, ген IL-17c, ген сульфтрансферазы, ген теломеразы, ген белка сиртуина, ген пролифератора пероксисом, ген метилентетрагидрофолатредуктазы.

Тогда как условия, соотносимые с референтным уровнем мутагена в среде, характеризовались фиксацией у потомства материнских генетических вариаций только по генам IL-17c, белка сиртуина и метилентетрагидрофолатредуктазы, а также гену смерти FAS. Причем общее число

нуклеотидных замен по анализируемым генам у неэкспонированного ребенка было в 2 раза ниже экспонированного мутагеном.

Отмечается достоверная зависимость числа полиморфно измененных участков генов от содержания в крови и моче стронция у «секвенированных» пациентов (рис. 54).

Установлены достоверные зависимости количества мутаций кандидатных генов от концентрации стронция в биологических средах (рис. 55). Например, наблюдались сильные прямые достоверные зависимости содержания стронция в крови и числа замен в генах MTHFR, GSTA4, HLADRB1, CYP1A2, DRD2, IL17D.

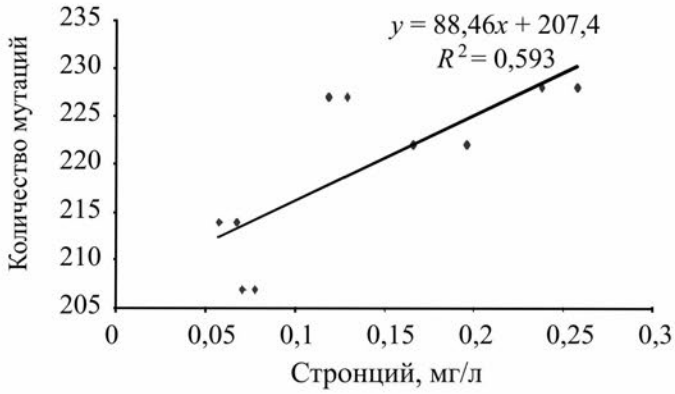


Рис. 54. Зависимость числа полиморфно измененых участков генов от содержания стронция в крови

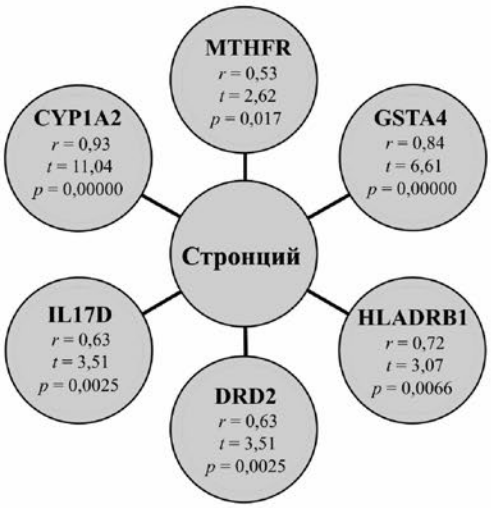


Рис. 55. Зависимость количества однонуклеотидных замен от гаптенной контаминации

Мы проследили наследственный вклад в генофонд ребенка: так, для пары № 2 (мать) – № 4 (ребенок) вклад матери составил 0,74, а для пары № 6 (мать) – № 5 (ребенок) – 0,97. Данный критерий может представлять интерес для исследователей, поскольку вторая пара проживает в экспонированных мутагеном условиях, а максимальный удельный вес передаваемой генетической информации в данном случае завышен, так как ребенок женского пола.

Анализ общего количества точечных замен позвоил определить среднее количество мутаций на одного человека по 25 кандидатным генам, которое составило 210 замен, тогда как среднее количество замен в экспонируемой группе составило 226, что на 7,1 % выше, чем в аналогичной популяции, проживающей вне стронциевой эндемии (рис. 56).

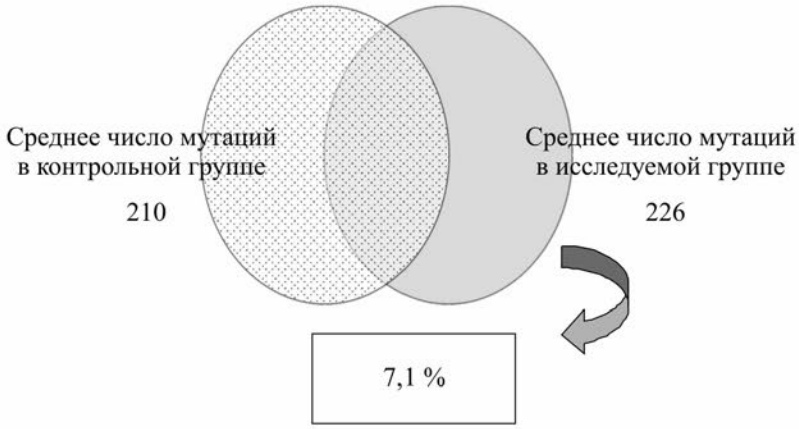


Рис. 56. Сравнительные результаты подсчета однонуклеотидных замен в исследуемой и контрольной группах

Таким образом, с использованием технологии расшифровки последовательностей можно провести таргетное ресеквенирование любого интересующего участка ДНК и/или подобрать несколько участков, по которым необходимо провести сравнительные исследования.

Проведенный анализ ассоциаций в системе «ген–рецептор» с использованием методов таргетного ресеквенирования, проточной цитометрии и иммунофлюресцентного анализа позволил оценить взаимосвязи между генами и кодируемыми ими белками (рис. 57). Зависимости строились между величинами точечных замен в конкретном гене и значением белка, кодируемого данным геном, установленного детекцией на флюоресцентном анализаторе. Выявлены сильные достоверные зависимости в биологических логистических системах «ген дофамина–дофамин»,

«ген IL-17d–IL-17», «ген FOXp3–CD127-», «ген p53–p53». Данный факт коррелирует с биологической необходимостью поддерживать адаптационную экспрессию данных генов и белков на достаточном гомеостатическом уровне в силу их огромной регуляторной значимости. Оказались разорванными логистические взаимосвязи в системах «ген GSTA4–GSTA», «ген SOD–SOD», «ген FAS–CD95+», «ген VEGF–VEGF», что указывает на физиологическую неприемлемость условий внешней среды, изменяющей адаптационные возможности процессов конъюгации, антиоксидантной защиты, контроля процесса апоптоза и функции эндотелия.

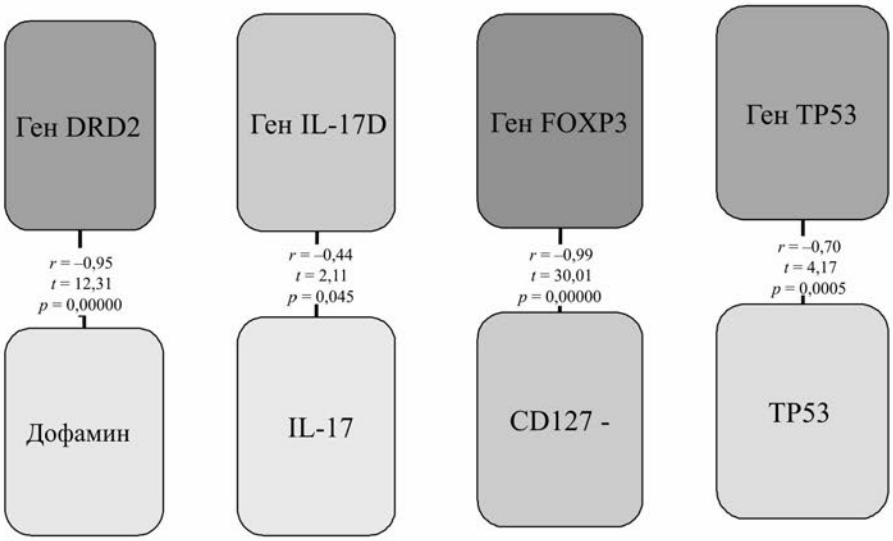


Рис. 57. Биологические логистические системы, обеспечивающие устойчивость нейроиммунологических гомеостатических процессов

Результаты параллельно проведенного анализа полиморфизма генов методом ПЦР в условиях повышенной экспозиции стронцием указывают на избыточную вариабельность генов CYP1A2, TLR4, FAS, FOXP3, TP53, HLADRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, отвечающих за особенности иммунорегуляции и детоксикации. На основании проведенных исследований точечных нуклеотидных замен методом секвенирования и одновременной детекцией однонуклеотидных полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в условиях экспозиции стронцием нами предлагается алгоритмическая последовательность изучения генетических нарушений в определенных условиях, определяемых этносом населения, географическими и эндемическими особенностями, экологическими и социальными факторами.

Чтобы установить пороговый уровень замен, превышение которого требует дальнейшего мониторирования генов у лиц, проживающих в условиях эндемии («под фактором» или их комбинацией), проведено изучение встречаемости полиморфизмов кандидатных генов методом ПЦР.

Оказалось, что значительный уровень полиморфизма выявлен в системе генов детоксикации и иммунорегуляции, причем наибольший полиморфизм свойственен генам сульфотрансферазе 1A1 (SULT1A1), HLADRB1, FAS, FOXP3. По результатам секвенирования, проведенного на ограниченном контингенте (10 человек), выполнен анализ на полиморфность кандидатных генов методом ПЦР для всей выборки (табл. 56).

Таблица 56

Пример изучения встречаемости вариантных аллелей генов у населения в условиях воздействия стронция (%)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	Группа	
		наблюдения	сравнения
FAS	CC	53	58
	TC	40	42
	TT	7*	0
	C	73	79
	T	27	21
FoxP3	TT	74	80
	TC	11	20
	CC	15*	0
	T	79	90
	C	21*	10

Примечание: * – разница достоверна относительно группы сравнения (p<0,05).

Установлено, что среднестатистическая встречаемость полиморфизмов кандидатных генов в группе наблюдения составила 45 % в группе контроля – 28 %. По полученным результатам проанализирована причинно-следственная связь встречаемости полиморфизмов в популяции, выявленной методом ПЦР и числом замен в генах по результатам секвенирования. Полученная достоверная модель описывается формулой $y = 0{,}149x + 1{,}453$ ($r = 0{,}46$; $t = 2{,}67$; $p = 0{,}012$), где x – встречаемость ДНК полиморфизмов генов человека (аллельных генотипов) на один ген методом ПЦР; y – число транзиций генов методом секвенирования. Установлено, что при встречаемости точечных замен в генах на уровне 28 % (величина, полученная в группе контрольной

популяции) это значение будет соответствовать 6 (5,6) полиморфизмам одного гена, выявленного таргетным ресеквенированием.

Таким образом, апробированный методический подход позволил нам обосновать критическое число замен в гене, что в дальнейшем упрощает подбор генов для адекватного популяционного генетического анализа. При наличии 6 замен и более в одном гене методом таргетного секвенирования на жидких чипах на ограниченном исследуемом контингенте (1–2 человека) подбираются гены для дальнейшего популяционного анализа и мониторирования генетических нарушений уже более простым и менее дорогостоящим методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Полученные данные позволяют рекомендовать использование методологии генотипирования нуклеотидных замен, заключающейся в алгоритмической последовательности проведения персонального таргетного сиквенса на биочипах и на основании его результатов (идентификация 6 однонуклеотидных замен и более) выполнение популяционного ПЦР-типирования выявленных кандидатных генов.

7. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И ГАПТЕННОЕ ОКРУЖЕНИЕ

Транскриптом (*transcriptome*) (лат. *transcript (io)* – переписывание и лат. – *om (a)* – суффикс, означающий всеохватываемость, совокупность) – совокупность экспрессирующихся нуклеотидных последовательностей генома. Оценка совокупности матричных РНК и особенностей их экспрессии в условиях избыточного поступления в организм мутагенов является одной из важнейших задач медицины и молекулярной биологии, решение которой невозможно без привлечения современных биотехнологий (рис. 58).

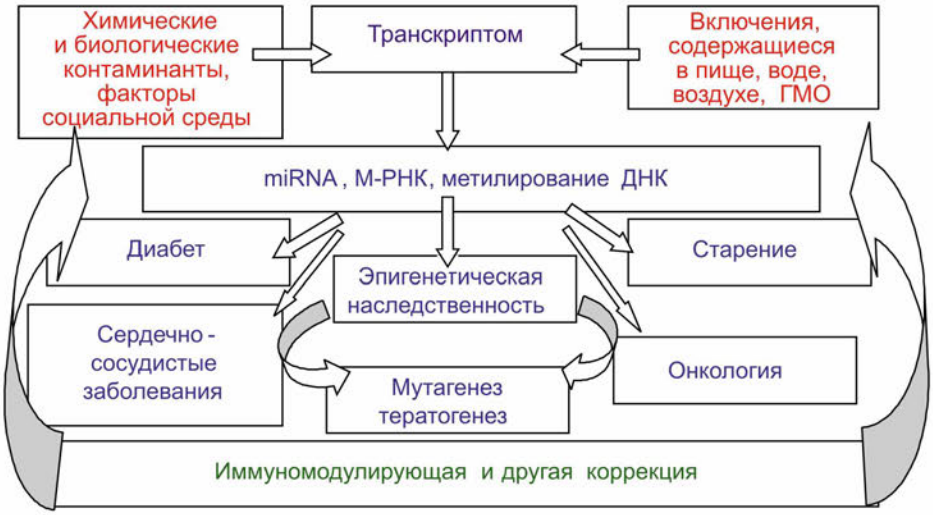


Рис. 58. Транскриптом и его роль в регуляции процессов жизнеобеспечения

На сегодняшний день отсутствуют методологии и способы оценки генетических и иммунных нарушений, ассоциированных со средовым воздействием токсикантов, в которых в качестве маркеров эффекта и чувствительности выступали маркеры и соответствующие им критерии, характеризующие модифицированную экспрессию патогномоничных генов [61, 152].

Экспрессия генов – это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок.

Методология оценки индуцированной гаптенами экспрессии кандидатных генов обеспечивает возможность идентификации и прогнози-

рования иммунных нарушений, ассоциированных с воздействием средовых химических факторов (рис. 59).

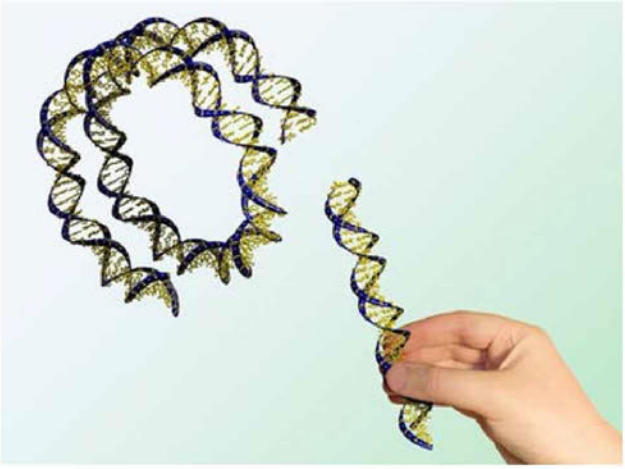


Рис. 59. Изучение особенностей транскриптома – важная научная задача

Выделение специфических клеточных фенотипов, являющихся мишенью поступающих в организм мутагенов, позволяет оценить их модифицирующее влияние на процесс экспрессии иммунотропных генов как спонтанной, так и индуцированной искусственно вводимой разрешающей дозой токсиканта.

7.1. Изучение и оценка экспрессии генов в условиях воздействии химических мутагенов

Анализируемым биосубстратом являлись лимфоциты, выделенные у населения, проживающего в зоне экспозиции мутагеном. Причем в качестве клеточного фенотипа отбирались (сепарировались) иммунокомпетентные клетки, которыми экспрессируются защитные белки, в том числе дефензин.

Выбор дефензина в качестве кандидатного гена не случаен, поскольку его роль как регуляторного иммунотропного гена неоспорима и он является не только хемотаксическим фактором, но и связывающим пептидом для факторов главного комплекса гистосовместимости. А минорность его экспрессии иммунокомпетентными клетками делает использование дефензина оптимальным в идентификации особенностей транскриптомного процессинга.

Известно, что влияние химических токсикантов, в частности стронция, на организм человека приводит к угнетению иммунитета, в том числе с использованием механизма транскриптомной регуляции. Стронций оказывает политропное действие на организм человека и животных в эксперименте: поражаются костная ткань, печень и кроветворные органы, обладает гонадотропным, эмбриотоксическим и тератогенным эффектами. Механизм иммунотропного воздействия стронция заключается в его антагонизме по отношению к кальцию. В норме активация Т-лимфоцитов происходит в результате мобилизации внутриклеточного кальция. Хроническая экспозиция стронцием приводит к его инактивации и модификации функциональных процессов в иммуноцитах, основным из которых является экспрессия защитных белков. Причем разрешающие концентрации токсиканта могут как стимулировать экспрессию, так и угнетать ее.

В качестве эндогенного внутреннего контроля, относительно которого проводили нормализацию продуктов амплификации исследуемых генов, был выбран ген GAPDH (ген домашнего хозяйства) (рис. 60). Индуцированная экспрессия осуществлялась пороговой концентрацией токсиканта. В опытную пробу иммуноцитов дополнительно добавляли токсикант в пороговой концентрации, т.е. концентрации, оказывающей минимальный действующий эффект, что обеспечивает возможность усиления и идентификации эффекта воздействия этого токсиканта на процесс экспрессии клеточным фенотипом гена, реализующего иммунную резистентность.

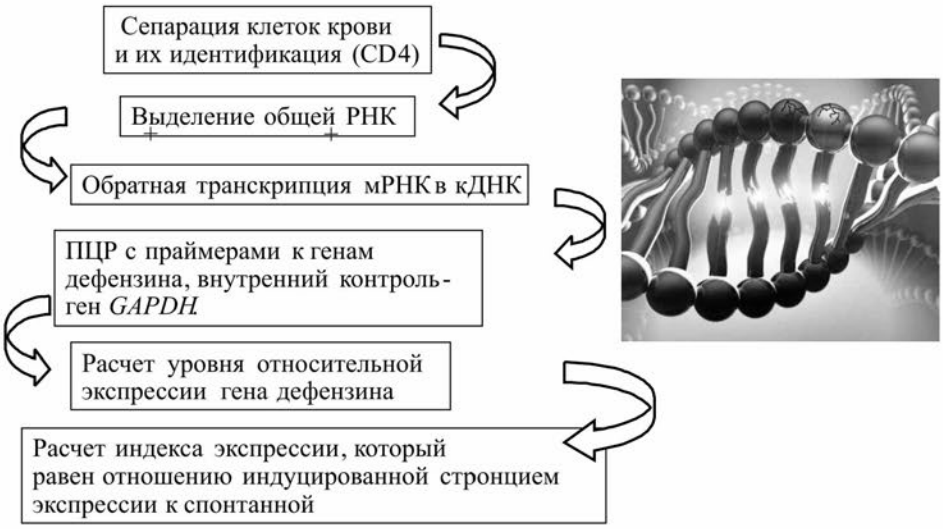


Рис. 60. Проведение исследований по оценке экспрессии генов

Чем выше обусловленное средовым поступлением содержание этого токсиканта над нормальной, допустимой концентрацией, тем значительнее его модифицирующее действие на процесс экспрессии защитных белков. Тем самым внесение фиксированной терапевтической концентрации токсиканта *ex vivo* позволяет выявить модифицирующее влияние адресной индукции виновным мутагеном генетического аппарата клетки.

Таким образом, имеющаяся хроническая средовая экспозиция токсиканта формирует мутагенный (эпигеномный) эффект, который реализуется (проявляется) разрешающей концентрацией токсиканта.

7.2. Технология идентификации индуцированной мутагенами генетической экспрессии

Изучаются биопробы пациентов, экспонированных мутагеном и проживающих на данной территории или работающих на вредном производстве не менее 10 лет. Замеряют содержание мутагена в крови пациента и сравнивают с допустимым (фоновым) уровнем. Иммуноциты или другие клетки-мишени токсиканта данных пациентов оцениваются по уровню спонтанной и индуцированной экспрессии тестируемого гена. Материалом сравнения служат контрольные биопробы с допустимым уровнем контаминации мутагеном.

Алгоритм оценки индуцированной экспрессии генов:

1. Взятие материала и его транспортировка в лабораторию.
2. Определение содержания стронция в крови.
3. Выделение клеток крови и их идентификация.
4. Подготовка образцов и выделение общей РНК.
5. Обратная транскрипция мРНК в кДНК.
6. Амплификация кДНК с подготовленными праймерами и зондами.
7. Расчет относительной экспрессии маркерного гена.
8. Статистический анализ.

Взятие материала для исследования: проводится забор у пациентов цельной крови в специальные пробирки с антикоагулянтом (использовали тризол – для стабилизации РНК, и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) (0,05М раствор ЭДТА в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта) – для выделения клеток крови и изучения маркеров клеточной дифференцировки).

Забор крови необходимо производить только в одноразовые пластиковые микроцентрифужные пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение 1 часа хромовой смесью, тщательно промытые и прокаленные.

В цельной крови пациентов определяют содержание токсиканта традиционным методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Выделяют пациентов с содержанием мутагена в крови выше фонового значения

У указанных пациентов проводят сепарацию из цельной крови субпопуляции клеток лимфоцитов с маркером-мишенью методом иммуномагнитной сепарации на клеточном сортере (рис. 61). Проводят ее идентификацию методом проточной цитофлюориметрии на цитометре. Чистота выделенных клеток была подтверждена методом проточной цитофлюориметрии и составляла > 90 %. Устанавливают и стандартизуют содержание клеток-мишеней в пробе крови.

Рис. 61. Клеточный сортер AutoMACS Pro

Выделенную фракцию лимфоцитов-мишеней делят на две части. Одну часть подвергают 12-часовой экспозиции с мутагеном (опытные пробы). Другую часть не подвергают воздействию мутагена, вместо него добавляют физраствор (контрольные пробы). При инкубации используют соли мутагена (если это металл) в пороговой (минимально дейст-

вующей) концентрации, подобранной на основании изученной специальной литературы или опытным путем.

Затем из обеих проб отсепарированных клеток выделяют клеточную РНК в несколько этапов с использованием набора для выделения РНК Tempus Spin RNA purification kit (Life Technologies, USA).

Первый этап – лизис клеток, денатурация РНК и связывание с тРНК.

В чистые полипропиленовые пробирки типа Эппендорфф объемом 1,5 мл вносят по 3 мкл тРНК и 450 мкл денатурирующего раствора (0,1% раствор фенола).

Второй этап – выделение РНК из сепарированных клеток CD8+, осаждение РНК.

Добавить 50 мкл взвеси клеток в соответствующие пробирки, используя наконечники с фильтрами. Параллельно необходимо выполнить выделение РНК из контрольных образцов, прилагающихся к набору (положительный и отрицательный контрольные образцы), для этого в одну пробирку добавить 50 мкл положительного контрольного образца, во вторую пробирку 50 мкл деионизованной воды – отрицательный контрольный образец. Пробирки плотно закрыть.

Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд, а затем инкубировать при комнатной температуре 10 минут.

Центрифугировать в течение 15 секунд при 12 тыс. об/мин.

Добавить 100 мкл хлороформа, плотно закрыть пробирки и перемешать на вортексе 5 секунд при 400 об/мин.

Центрифугировать 5 минут при 12 тыс. об/мин.

Перенести до 300 мкл верхней водной фазы в чистую полипропиленовую пробирку типа Эппендорфф объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл изопропилового спирта, используя наконечники с фильтрами. Перемешать на вортексе 5 секунд.

Центрифугировать 12 минут при 12 тыс. об/мин. В результате данной манипуляции образуется полупрозрачный рыхлый осадок.

Удалить супернатант вакуумным аспиратором в колбу-ловушку с использованием одноразовых наконечников, оставляя на дне пробирки около 20 мкл жидкости.

Третий этап – отмывка РНК.

В пробирку с осадком добавить 1 мл промывочного раствора (70 % раствор этилового спирта). Пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе и центрифугировать 10 минут при 12 тыс. об/мин.

Удалить супернатант как можно полнее вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, не захватив при этом осадок. Осадок подсушить 20–30 минут при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми.

Добавить 50 мкл деионизованной воды, пробирки закрыть, инкубировать 10 минут при комнатной температуре, затем перемешать встряхиванием.

Готовые пробы РНК аликвотируют и замораживают при – 80 °С.

Концентрацию и чистоту препаратов РНК определяют спектрофотометрически при длинах волн 260, 280 и 230 нм.

Четвертый этап – проведение исследований по изучению непосредственно экспрессии генов

Для непосредственного определения экспрессии генов в изучаемых образцах замороженных проб проводят процесс обратной транскрипции (далее – ОТ) РНК в ДНК.

Реакцию ОТ проводят в реакционной смеси с конечным объемом 20 мкл, приготовленной на деионизированной стерильной воде для молекулярной биологии (MQ), содержащей 67 мМ Трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ$(NH_4)_2SO_4$, 0,01 % Tween 20, 4 мМ $MgCl_2$, 1 мМ каждого dNTP, 3,2 мкг смеси праймеров со случайной последовательностью, 10 мМ дитиотреитола, 10 единиц активности ингибитора рибонуклеаз RiboLock, 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы M-MLV из набора для обратной транскрипции High Capacity RNA to cDNA kit (Life Technologies, USA) и 1 мкг тотальной РНК. Смесь инкубируют при 42 °С в течение 1 часа. Реакцию останавливают путем тепловой инактивации обратной транскриптазы, выдерживая смесь при 94 °С в течение 10 мин.

Проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами к генам дефензина (DEF), причем в качестве внутреннего контроля используют ген домашнего хозяйства – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

ПЦР проводят в реакционной смеси с конечным объемом 50 мкл, содержащей 67 мМ Трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ$(NH_4)_2SO_4$, 0,01 % Tween 20, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ каждого dNTP, 15 пкмоль каждого из пары праймеров с заданной последовательностью, 2,5 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы, 5 мкл реакционной ОТ-смеси, содержащей кДНК. Для амплификации к ДНК использовали последовательности специфических праймеров для GAPDH. Праймеры были подобраны на основе зонда TaqMan для мультиплексной ПЦР. Уровень

флюоресценции оценивали в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе.

Расчет уровня относительной экспрессии анализируемого гена проводят на специальном программном обеспечении (рис. 62).

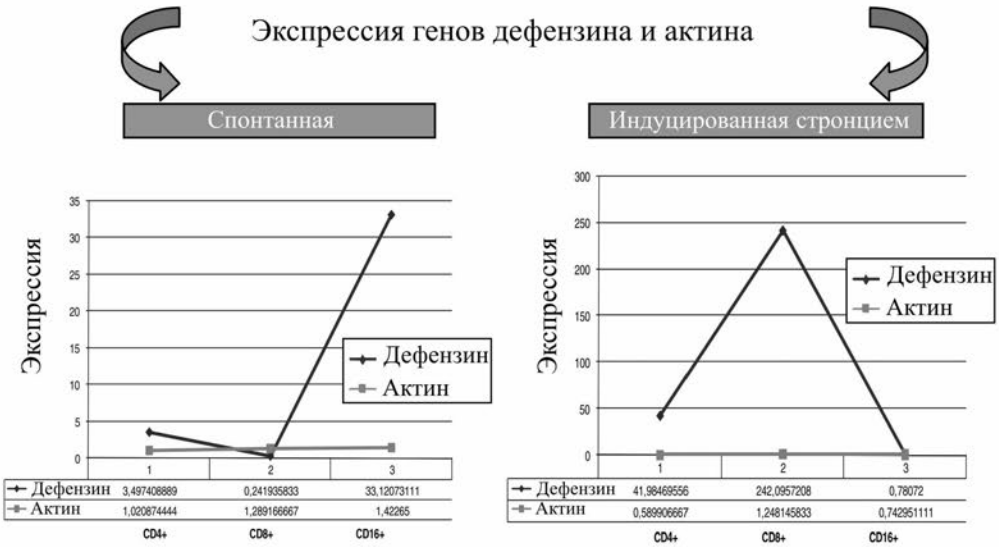


Рис. 62. Сравнительный анализ спонтанной и индуцированной стронцием экспрессии генов дефензина и актина иммунокомпетентными клетками (CD4, CD8, CD16)

Уровни экспрессии исследуемых генов нормализуют по отношению к уровню экспрессии гена домашнего хозяйства (GAPDH), который принимают за единицу.

Далее находят индекс экспрессии, равный отношению индуцированной экспрессии к спонтанной, по которому судят об иммуногенетических нарушениях у пациента, связанных с воздействием мутагена (принимают за спонтанную экспрессию уровень, относящийся к контрольной пробе, а за индуцированную экспрессию – уровень, относящийся к пробе, в которую введен мутаген).

При указанном индексе меньше 0,7 прогнозируют угнетение экспрессии и развитие иммунодефицитного состояния, а при индексе более 3 – увеличение экспрессии и развитие иммунопролиферативного состояния при условии одновременного обнаружения у пациента превышения содержания мутагена в крови более чем в 1,5 раза по сравнению с фоновым (рис. 63).

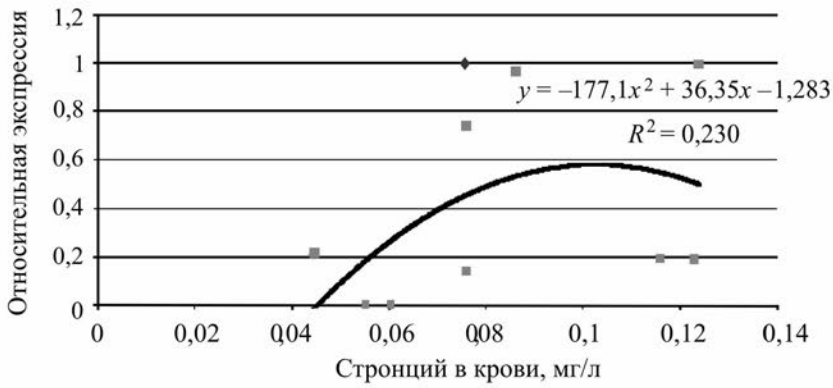


Рис. 63. Графическое описание зависимости относительной экспрессии гена дефензина Т-хелперами в условиях возрастания контаминантной нагрузки стронцием

Результаты конкретного анализа экспрессии генов позволили нам за счет выделения специфических клеточных фенотипов CD4+, $CD8^+$, CD16+, экспрессирующих ген дефензина альфа, обеспечить прогнозирование иммунных нарушений, ассоциированных с воздействием стронция.

Протоколом исследования нами выданы следующие результаты (приведенные внутренним контролем):

1. Относительное количество белка (РНК) дефензина альфа (спонтанный уровень экспрессии $CD8^+$).

2. Индуцированный стронцием уровень экспрессии белка (РНК) дефензина альфа (индуцированный уровень экспрессии $CD8^+$).

Анализ результатов производится по соотношению индуцированного стронцием и спонтанного уровней экспрессии дефензина альфа.

Состояние специфической индуцибельности оценивалось по величине и направлению изменчивости экспрессии, вызванной экспозицией стронцием *ex vivo* по сравнению со спонтанной экспрессией с учетом базовой экспозиции (содержание стронция в крови).

Данные, полученные в ходе опытов, приведены в табл. 57, 58.

В табл. 58 изложены данные об индексе экспрессии гена дефензина альфа для пациентов, проживающих на экологически неблагополучной территории и в крови которых концентрация стронция превышала региональный фоновый показатель более чем в 1,5 раза. Причем приведенные значения спонтанной и индуцированной экспрессии и предлагаемого индекса достоверно отличались от аналогичных данных в группе пациентов, проживающих на территории без техногенной экспозиции

Таблица 57

Характеристика индекса экспрессии гена дефензина альфа у пациентов с условно чистой территории и уровнем содержания стронция в крови, не превышающим региональный фоновый (0,024 ± 0,007 мг/дм^3) или превышающим менее чем в 1,5 раза

№ п/п	Пациент, возраст, лет	Экспрессия			Содержание CD8$^+$, %	Концентрация стронция в крови, мкг/мл
		спонтанная	индуцированная стронцием	индекс экспрессии		
1	40	0,0076	0,01718	2,26	24	0,0181
2	44	0,0115	0,0121	1,05	26	0,012
3	41	0,0515	0,1429	2,8	28	0,0216
4	46	0,072	0,19541	2,71	29	0,0347
5	50	0,02420	0,0394	1,63	32	0,032
6	41	0,033	0,05215	1,58	28	0,0201
7	Норма	–	–	0,7–3,0	28,0 ± 4, 7	0,024 ± 0,007

Таблица 58

Характеристика индекса экспрессии гена дефензина альфа у пациентов с уровнем содержания стронция в крови, превышающим региональный фоновый (0,024 ± 0,007 мг/дм^3) в 1,5 раза и более

№ п/п	Пациент, возраст, лет	Экспрессия			Содержание CD8$^+$, %	Концентрация стронция в крови, мкг/мл
		спонтанная	индуцированная стронцием	*индекс экспрессии		
1	47	0,0093	0,422	45,4	40	0,121
2	45	0,0174	0,291	16,7	38	0,124
3	49	0,0622	0,2349	3,8	35	0,123
4	46	0,0104	0,007	0,67	17	0,0605
5	49	0,603	0,359	0,60	14	0,0862
6	41	0,1285	0,085	0,66	21	0,0553
7	Норма	–	–	0,7–3,0	28 ± 4, 7	0,024 ± 0,007

* Примечание: значения индексов экспрессии достоверно отличались от аналогичных данных в группе пациентов с уровнем содержания стронция в крови ниже фонового (p<0,05).

стронцием (p<0,05). Данные, полученные у пациентов с высоким уровнем стронция в крови (см. табл. 58), в биопробах, содержащих CD8$^+$ Т-лимфоциты, показали либо повышение индекса экспрессии гена дефензина альфа после инкубации со стронцием более 3, либо его снижение в аналогичных биопробах менее 0,7. Кроме того, у пациентов с высоким уровнем стронция в крови и повышенным уровнем экспрессии дефен-

зима альфа $CD8^+$-клетками было повышено содержание $CD8^+$ Т-лимфоцитов в крови, в то время как у пациентов с высоким уровнем стронция и сниженным уровнем экспрессии дефензима $CD8^+$-клетками наблюдалось снижение содержания $CD8^+$ Т-лимфоцитов в крови, что указывает на наличие и направленность иммунных нарушений у этих пациентов.

Для обоснования пороговости индекса экспрессии, который бы характеризовал иммунные нарушения у пациента, исходили из следующего принципа.

Принцип пороговости предполагает разрыв между пороговыми (минимально действующими) уровнями фактора и недействующими с коэффициентом 3 и выше. Ряд авторов считают значимым изменение уровня экспрессии гена более чем в 1,5 раза, хотя они же идентифицируют повышение ее интенсивности у женщин с преэклампсией в 6–8 раз. Поэтому нами рекомендуется в качестве диагностически значимого критерия измененной экспрессии снижение ее в 1,5 раза как критический уровень угнетения экспрессии гена и индекс 3,0 как порог допустимого увеличения экспрессии гена, что будет выражаться диапазоном коэффициентов оптимума экспрессии (индекс экспрессии) от 0,7 до 3,0. Разница между коэффициентами, ограничивающими увеличение и снижение экспрессии генов, объясняется особенностями и интенсивностью этих процессов у эукариотов, режим сохранения генетического материала при супрессии и инициация синтеза при стимуляции (достигается путем многократной инициации синтеза ДНК) приводят в последнем случае к значительному увеличению генетического материала.

Приводим несколько примеров по конкретным пациентам одного этноса, возраста и пола из группы обследованных с повышенным содержанием стронция в крови и с содержанием стронция в пределах фоновой концентрации.

Пример 1. Пациент, 47 лет. Определяется уровень стронция в крови выше фоновых уровней – 0,121 мг/дм^3. Значение клеточного фенотипа $CD8^+$: 40 %. Отношение уровня стронция в крови к его фоновому уровню = 5,04. Значение индекса экспрессии = 45,4 (т.е. выше 3). Таким образом, при анализе клеточных фенотипов, отвечающих за иммунорезистентность, выявлен их повышенный уровень, что в ассоциации с высокой контаминацией биосред стронцием и активацией экспрессии специфического гена указывает на наличие пролиферативного статуса в иммунной системе пациента, обусловленного действием стронция.

Пример 2. Пациент, 49 лет. Определяется уровень стронция в крови выше фоновых уровней – 0,086 мг/дм^3. Значение клеточного фенотипа CD8$^+$: 14 %. Отношение уровня стронция в крови к его фоновому уровню = 3,58. Значение индекса экспрессии = 0,6 (т.е. ниже 0,7). Таким образом, при анализе клеточных фенотипов, отвечающих за иммунорезистентность, выявлен их дефицит, что в ассоциации с высокой контаминацией биосред стронцием и угнетением экспрессии дефензина альфа указывает на наличие иммунодефицитного состояния в иммунной системе пациента, обусловленного действием стронция.

Пример 3. Пациент, 40 лет. Определяется уровень стронция в крови в пределах фонового уровня – 0,0181 мг/дм^3. Значение клеточного фенотипа CD8$^+$: 24 %. Отношение уровня стронция в крови к его фоновому уровню = 0,75. Значение индекса экспрессии = 2,26 (т.е. в диапазоне 0,7–3,0). Таким образом, при анализе ответственных за иммунорезистентность клеточных фенотипов и экспрессию ими защитных белков в ответ на индукцию стронцием иммуногенетических нарушений, обусловленных действием стронция, выявлено не было.

Анализ индуцированной экспрессии генов рекомендуется использовать для определения выраженности индивидуальных и популяционных эпигенетических изменений в контингентах, подвергающихся хронической гаптенной интоксикации, в алгоритмической последовательности следующей за сиквенсом и ПЦР-идентификацией кандидатных генов.

Таким образом, предложена методология генотипирования нуклеотидных замен, заключающаяся в алгоритмической последовательности проведения сиквенса, ПЦР-типирования и экспрессии кандидатных генов. Результаты анализа полиморфизма генов в условиях повышенной экспозиции стронцием указывают на избыточную вариабельность генов CYP1A2, TLR4, FAS, FOXP3, TP53, HLADRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, отвечающих за особенности иммунорегуляции и детоксикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянно продолжающееся загрязнение окружающей среды химическими примесями в сочетании с нестабильной социально-экономической ситуацией приводит к ухудшению здоровья населения. Выявление реальной и потенциальной опасности загрязнения среды обитания и условий труда для здоровья населения приобретает особую актуальность и обусловливает необходимость реализации концепции гигиенической безопасности населения России.

Учитывая степень реально существующего в настоящее время загрязнения окружающей среды химическими факторами природного и техногенного происхождения, их способность к материальной и функциональной кумуляции, исследования по установлению особенностей апоптоза как адаптивной реакции иммунитета на их воздействие, актуализированные в данной монографии, приобретают приоритетное значение. Разработанные оригинальные диагностические алгоритмы для выявления групп риска в регионах, эндемичных по природной и антропогенной нагрузке, основу которых составляют генетические маркеры, маркеры специфической сенсибилизации и апоптоза клеток иммунной системы, уже сегодня успешо используются нами и готовы для тиражирования.

Апробированные в монографии элементы диагностики маркеров эффекта и чувствительности состояния здоровья будут способствовать решению задач по объективной диагностике связей между уровнями воздействия факторов среды и здоровьем населения.

Разработанные авторами монографии методологические подходы к реализации высокоэффективных технологий профилактической направленности позволяют не только осуществить переход к персонифицированной медицине, но и способствовать предотвращению угрозы здоровью людей в условиях дестабилизации среды обитания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авалиани С.Л. Теоретические и методические основы гигиенической оценки реальной нагрузки воздействия химических факторов окружающей среды на организм: автореф. дис. … д-ра наук. – М., 1995. – 42 с.

2. Авдеенко Н.В. Экологические факторы и аллергия у детей: автореф. дис. … канд. мед. наук. – М., 1989.

3. Аверьянова Н.И., Насонова Г.А. Экология и здоровье детей, родившихся преждевременно // Актуальные вопросы медицины и промышленной экологии. – Киров, 1994. – С. 84.

4. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – С. 490.

5. Акатова А.А. Распространенность и особенности течения аллергических болезней у детей в условиях экологического состояния города Перми: автореф. дис. … канд. мед. наук. – М., 1996. – 27 с.

6. Акафьева Т.И., Звездин В.Н. Токсиколого-гигиеническая оценка потенциальной опасности для здоровья человека нанодисперсного раствора диоксида кремния // Вестник пермского университета. Биология. – 2012. – № 2. – С. 71–74.

7. Акимова Т.А., Хаскин В.В. Экология. Человек – Экономика – Биота – Среда: учеб. для вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2000. – 566 с.

8. Активационные клеточные маркеры у аппаратчиков производства активированных углей / О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.В. Ланин // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 10 (223). – С. 37–39.

9. Актуальные проблемы комплексной гигиенической характеристики факторов городской среды и их воздействия на здоровье населения / Ю.А. Рахманин [и др.] // Гигиена и санитария. – 2007. – № 5. – С. 5–7.

10. Алексеева О.А., Дуева Л.А. Аллергия к промышленным химическим соединениям. – М.: Медицина, 1978. – 272 с.

11. Аллергические болезни у детей / под ред. М.Я. Студеникина, И.И. Балаболкина. – М.: Медицина, 1998. – 352 с.

12. Аллергические заболевания у детей: современные проблемы диагностики, терапии и реабилитации / под ред. проф. Л.Ф. Казначеевой. – Новосибирск, 1998. – 222 с.

13. Аллергия и иммунопатология / под ред. Г.В. Порядина. – М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 282 с.

14. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России» / С.А. Шальнова [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2012. – № 5 (97). – С. 6–11.

15. Андреева Е.И., Уварова Л.М. Оздоровление детей раннего возраста, рожденных работницами химического производства и проживающих в экологически неблагоприятных условиях // Новые технологии в педиатрии: материалы конгресса педиатров России. – М., 1995. – С. 6–7.

16. Анилин. Серия «Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ» / под ред. Н.Ф. Измерова. – М., 1984. – 49 с.

17. Аннексинзависимый апоптоз в условиях контаминации фенолами / Д.Г. Дианова [и др.] // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 49–53.

18. Апазов А.Д. Здоровье – ведущий системообразующий фактор национальной безопасности // Охрана здоровья населения России. Вып. 1: материалы Межведомственной комиссии Совета безопасности Российской Федерации по охране здоровья населения (март – декабрь 1994). – М.: Юрид. лит., 1995. – С. 4–10.

19. Апоптоз иммунокомпетентных клеток в условиях производства / О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, А.М. Гугович // Сборник материалов XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (11–15 апреля 2011 г., Москва). – М., 2011. – С. 594–595.

20. Арбузова Т.П., Пастухова О.М. Влияние загрязнения воздуха на здоровье матери и ребенка в исследованиях на население и в эксперименте // Экол. безопасность населения в зонах градопромышленных агломераций Урала: тез. докл. регион. науч.-практич. конф. – Пермь, 1995. – С. 14–15.

21. Атмосферные загрязнения как фактор риска для здоровья детского и подросткового населения / Н.П. Гребняк [и др.] // Гигиена и санитария. – 2002. – № 2. – С. 21–23.

22. Атопический дерматит у детей: руководство для врачей / под ред. Н.Г. Короткого. – Тверь: Триада, 2003. – 238 с.

23. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма у детей // International journal on immunorehabilitation. – 1999. – № 11. – С. 208–213.

24. Баранов А.А. Окружающая среда и здоровье // Педиатрия. – 1995. – № 5. – С. 5–6.

25. Безопасность наночастиц и наноматериалов для окружающей и производственной среды / А.И. Потапов [и др.] // Гигиена и санитария. – 2013. – № 3. – С. 8–14.

26. Белова О.Б., Винничук Ю.Д., Бережная Н.М. Функциональная активность клеток системы иммунитета интактных мышей при взаимодействии с наночастицами ферромагнетика в условиях *in vivo* и *in vitro* // Онкология. – 2011. – № 3. – С. 192–196.

27. Бензол. Серия: Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ / под ред. Н.Ф. Измерова. – М., 1985. – 45 с.

28. Беннет А.Е. Медицина окружающей среды. – М.: Медицина, 1981. – 150 с.

29. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система интерлейкинов и рак. – Киев: ДИА, 2000. – 224 с.

30. Биохимические сдвиги при хронической свинцовой интоксикации / А.Ш. Бышевский, А.М. Мкртумян, И.А. Мухачева, Е.В. Платонов // Здоровье человека и экологические проблемы: тез. докл. зональной научно-практической конференции. – Киров, 1991. – С. 34–36.

31. Блохин В.А. Некоторые аспекты патологической морфологии хромовой интоксикации: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Свердловск, 1968. – С. 22.

32. Бова А.А., Горохов С.С. Военная токсикология и токсикология экстремальных ситуаций: учебник. – М., 2005. – 662 с.

33. Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Fas-рецептор и его роль при атопических заболеваниях // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 24–29.

34. Бондаренко С.Г. Формирование иммунологической недостаточности под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3. – Ч. 2 (59). – С. 40–42.

35. Боровская Т.Ф., Ганьчева Е.А., Макаревич А.М. Выраженность экспресии маркеров мембран иммунокомпетентных клеток слизистой

оболочки толстой кишки и периферической крови в норме // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 123.

36. Васильев Е.А. Факторы риска и механизмы формирования риносинуситов в условиях экологического неблагополучия: дис. … канд. мед. наук. – Оренбург, 2004. – 136 с.

37. Вельтищев Ю.Е. Экологически детерминированная патология детского возраста // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1996. – № 2. – С. 60–64.

38. Вельтищев Ю.Е., Капустян А.М. Проблемы патологии детского возраста в аспекте нарушения структуры и функций биологических мембран: научный обзор. – М., 1982. – 68 с.

39. Взаимодействие кремнийсодержащих наночастиц с лейкоцитами периферической крови человека: исследование *in vitro* / Е.Р. Андреева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 3. – С. 377–380.

40. Взаимосвязь содержания малонового диальдегида, активности глутатионпероксидазы и полиморфизма гена GPX4 (718 C/T) при хроническом гепатите С / И.А. Булатова, А.П. Щекотова, А.В. Кривцов, В.В. Щекотов, О.Ю. Ненашева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 10. – С. 15–18.

41. Вирусные ассоциации у детей в условиях техногенной нагрузки / О.В. Долгих [и др.] // Сборник материалов XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (тезисы докладов) (11–15 апреля 2011 г., Москва). – М., 2011. – С. 378–379.

42. Влияние краткосрочных повышений загрязнения атмосферного воздуха на смертность населения / Б.А. Кацнельсон [и др.] // Гигиена и санитария. – 2000. – № 1. – С. 15–18.

43. Влияние наночастиц диоксида титана на показатели иммунной системы у крыс / Е.А. Арианова [и др.] // Вопросы питания. – 2012. – № 6. – С. 47–53.

44. Влияние различных экологических факторов на распространенность и течение аллергических заболеваний у детей ставропольского края / Л.Л. Максименко [и др.] // Альманах современной науки и образования. – 2008. – № 11 (18). – С. 86–87.

45. Влияние хлорорганических соединений на клеточную регуляцию / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, А.М. Гугович // Сборник материалов XLVI научно-практической конференции с международным

«Гигиена, организация здравоохранения и профпатология». – Новокузнецк, 2011. – С. 28–31.

46. Волков Н.А. Содержание микроэлементов никеля, цинка, марганца, серебра в крови беременных женщин // Некоторые вопросы акушерства и гинекологии. – Томск, 1971. – С. 52–56.

47. Воронцов И.М, Маталыгина О.А. Болезни, связанные с пищевой сенсибилизацией у детей. – Л.: Медицина, 1986. – 272 с.

48. Вредные вещества в промышленности: справочник: в 3 т. / под ред. Н.В. Лазарева, Э.Н. Левиной. – М., 1976. – 1824 с.

49. Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие органические соединения / под ред. В.А. Филова [и др.]. – СПб.: Химия, 1994. – 688 с.

50. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I–IV групп / под ред. В.А. Филова [и др.]. – СПб.: Химия, 1988. – 512 с.

51. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов V–VIII групп / под ред. В.А. Филова [и др.]. – СПб.: Химия, 1989. – 592 с.

52. Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов / под ред. В.А. Филова [и др.]. – СПб.: Химия, 1990. – 732 с.

53. Вторичные иммунодефициты – проблемы диагностики и лечения / под ред. В.С. Ширинского. – Новосибирск, 1997. – 111 с.

54. Выборов В.Б. Гигиеническая оценка загрязнения городской среды в зоне влияния энергетического комплекса: дис. … канд. мед. наук. – М., 2005. – 202 с.

55. Выявление интерферона у в сыворотке крови детей с бронхиальной астмой / Е.В. Просекова, Б.И. Гельцер, Т.Н. Шестовская, В.В. Деркач // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С 170.

56. Галактионов В.Г. Иммунология: учебник. – М.: Нива России, 2000. – 488 с.

57. Галиев Р.С., Галиева С.А. Особенности развития аллергической реакции в условиях воздействия выхлопных газов автотранспорта различной интенсивности // Экология человека. – 2007. – № 10. – С. 20–23.

58. Генетические и иммунологические маркеры чувствительности и эффекта у работников калийного производства в условиях комбинированного воздействия факторов риска / О.В. Долгих, А.В. Кривцов,

К.Г. Горшкова, Д.А. Ланин, О.А. Бубнова, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина, Н.А. Вдовина // Анализ риска здоровью. – 2014. – № 3. – С. 71–76.

59. Генетические особенности адаптивности иммунологического статуса у детей, экспонированных марганцем / А.В. Кривцов, Н.А. Вдовина, Е.А. Пирогова, О.А. Бубнова, Д.Г. Дианова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 562–564.

60. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В.С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н.-Л, 2009. – С. 527.

61. Гены и медиаторы как маркеры нарушений иммунного ответа у детей в условиях контаминации биосред тяжелыми металлами / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, Д.В. Ланин // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – № 12. – С. 27–29.

62. Германова А.А. Ацетальдегид / ЦМП ГКНТ. – М., 1989. – 65 с.

63. Германова А.Л. Формальдегид / ЦМП ГКНТ. – М., 1982. – 18 с.

64. Гигиеническая оценка особеннотей иммунной и эндокринной систем у женщин репродуктивного возраста, занятых на производстве активированных углей / Д.В. Ланин, Р.А. Харахорина, Л.В. Лютова, О.В. Долгих, М.А. Землянова, Д.А. Кирьянов // Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии. – 2011. – № 4/1 (38). – С. 138–139.

65. Гигиенические аспекты нарушения здоровья детей при воздействии химических факторов среды обитания / под ред. Н.В. Зайцевой. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 489 с.

66. Гигиенические критерии состояния окружающей среды № 135. – М., 1980.

67. Гигиенические критерии состояния окружающей среды № 17. – Женева, 1985. – 205 с.

68. Гигиенические критерии состояния окружающей среды № 61. – Женева, 1994. – 200 с.

69. Гичев Ю.П. Загрязнение окружающей среды и здоровье человека. – М., Новосибирск: СО РАМН, 2002. – 230 с.

70. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

71. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. – Л., 1986.

72. Гормональная регуляция фагоцитирующих клеток / С.В. Ширшев, Б.А. Бахметьев, Н.Н. Кеворков, Е.М. Куклина, С.А. Заморина, Н.С. Лихачева, А.В. Агафонова // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 137.

73. Городинский Б.В., Дроздова Л.А., Козлова Л.С. Иммунологическая недостаточность у детей в условиях сочетанного воздействия химического и биологического факторов // Экологическая безопасность городов: мат. конф. – СПб., 1993. – С. 37.

74. Горшкова К.Г., Долгих О.В. Анализ иммунных и нейроэндокринных показателей у детей в условиях внешнесредового воздействия марганцем // Экологический мониторинг и биоразнообразие. – 2014. – № 1 (9). – С. 144–146.

75. Горшкова К.Г., Долгих О.В., Харахорина Р.А. Особенности иммунной и нейроэндокринной регуляции у детей в условиях техногенного загрязнения окружающей среды // Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения: материалы Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора, Уфа, 25–27 сентября 2013 г. / под ред. Г.Г. Онищенко. – Уфа, 2013 – С. 70–72.

76. Громова Е.Н. Комбинированное влияние фенола и формальдегида в воздухе жилых помещений на клинико-иммунологические параметры организма человека: дис. … канд. мед. наук. – Тюмень, 2006. – 138 с.

77. Грядская Т.В. Комбинированное воздействие факторов окружающей среды на некоторые показатели здоровья детей: дис. … канд. мед. наук. – Ставрополь, 2004. – 125 с.

78. Гугович А.М. Модификация запрограммированной клеточной гибели лимфоцитов у детей в условиях экспозиции ванадия // Сборник материалов IX международной научно-практической конференции «Современные проблемы гуманитарных и естественных наук». – М., 2011. – С. 448–452.

79. Гугович А.М., Долгих О.В. Некоторые особенности процесса апоптоза у изолировщиков / Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения». – Пермь, 2012. – Т. 1 – С. 155–157.

80. Гугович А.М., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Запрограммированная клеточная гибель лимфоцитов у детей в условиях внешнесредовой экспозиции ванадия // Влияние окружающей и производственной среды

на здоровье человека. Пути решения проблемы: материалы XLVII науч.-практ. конф. с международным участием «Гигиена, организация здравоохранения и профпатология» и семинара «Актуальные вопросы современной профпатологии», Новокузнецк, 23–24 мая 2012 г. / под ред. В.В. Захаренкова. – Кемерово: Примула, 2012. – С. 110–113.

81. Гугович А.М., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Маркеры клеточной активации и апоптоза в условиях воздействия химических факторов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 3 (790). – Ч. 1. – С. 152–155.

82. Гугович А.М., Долгих О.В., Кривцов А.В. Полиморфизм генов белков, участвующих в апоптозе, в условиях комбинированной техногенной нагрузки // Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения: материалы Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора, Уфа, 25–27 сентября 2013 г. / под ред. Г.Г. Онищенко. – Уфа, 2013. – С. 72–76.

83. Гугович А.М., Долгих О.В., Кривцов А.В. Полиморфизм иммуногенетических маркеров TNF, CYP, 1A1 и HLA-DR у детей Пермского края // Современные вопросы организации медицины труда и управления профессиональными рисками: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием (Екатеринбург, 27–28 октября 2011 г.) / под ред. д-ра мед. наук В.Б. Гурвича. – Екатеринбург: ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2011. – С. 185–189.

84. Гугович А.М., Кривцов А.В Особенности полиморфизма гена VEGFA (-634 G/C) и уровня сывороточного VEGF-A в условиях шумовой нагрузки // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 195.

85. Гугович А.М., Лекомцева Е.М. Особенности клеточной активации у аппаратчиков в условиях производства активированных углей // Материалы XI окружной конференции молодых ученых «Наука и инновации XXI века» (Сургут, 25–26 ноября 2010 г.). – Сургут, 2011. – Т. 1. – С. 94–95.

86. Гугович А.М., Харахорина Р.А. Особенности клеточной дифференцировки у детей, проживающих в условиях техногенной контаминации частицами пыли PM_{10} // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 226.

87. Гугович А.М., Харахорина Р.А., Долгих О.В. Механизмы клеточной гибели в условиях различной химической нагрузки // Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по

микробиологии, иммунологии и биотехнологии. – 2011. – № 4/1 (38). – С. 129–130.

88. Гущин И.С. О физиологическом смысле аллергической реакции // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 16–18.

89. Давлетов Э.Г. Материалы к анализу некоторых сторон биохимического механизма токсического действия тяжелых металлов: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Л., 1974. – 22 с.

90. Даутов Ф.Ф., Хакимова Р.Ф. Загрязнение атмосферного воздуха и здоровье населения города Нижнекамска // Гигиена и санитария. – 2002. – № 3. – С. 12–14.

91. Двинских С.А., Зуева Т.В. Оценка экологической ситуации в Пермской области с учетом интенсивности природопользования // Экология и основы природопользования. – Пермь, 2005. – С. 124–137.

92. Дерфель К. Статистика в аналитической химии. – М.: Мир, 1994.

93. Дианова Д.Г., Гугович А.М. Транскрипционный фактор FOXP3 лимфоцитов у аппаратчиков, занятых на производстве активированных углей // Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по аллергологии и иммунологии. – 2011. – № 2 (2). – С. 82–83.

94. Дианова Д.Г., Долгих О.В., Лыхина Т.С. Оценка цитокинового статуса в условиях контаминации биосред фенолами // Тюменский медицинский журнал. Материалы научно-практической конференции с международным участием «Медицина: достижения нового века», Коста Брава, Испания 26–28 июня 2012 г. – 2012. – № 2. – С. 56.

95. Дианова Д.Г., Долгих О.В., Сафонова М.А. Экспрессия мембранных и внутриклеточных маркеров у работающих в условиях экспозиции фенолами // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – № 12. – С. 28–30.

96. Дианова Д.Г., Зайцева Н.В., Долгих О.В. Особенности апоптотической программы лимфоцитов в условиях техногенного загрязнения // Лечебное дело. – 2013. – № 4. – С. 41–45.

97. Дианова Д.Г., Зайцева Н.В., Долгих О.В. Особенности лимфоцитарных фенотипов у детей в условиях экспозиции фенола в питьевой воде // Вестник Уральской медицинской академической науки. – М., 2012. – № 4. – С. 227.

98. Дианова Д.Г., Зайцева Н.В., Долгих О.В. Экспрессия некроза опухоли у женщин в условиях экспозиции свинца и марганца // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6 (14), № 2 (1). – С. 45–47.

99. Дианова Д.Г., Лыхина Т.С. Идентификация апоптоза у работающих в условиях экспозиции тяжелыми металлами и пылью // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 130.

100. Дианова Д.Г., Харахорина Р.А., Ланин Д.В. Показатели иммунного статуса женщин, работающих в условиях воздействия бенз(а)пирена // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6 (14), № 2 (1). – С. 47–48.

101. Диминева Г.М., Гервазиева В.Б. Особенности иммунокомплексного механизма регуляции содержания IgE у больных атопическим дерматитом (АД) // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – 161 с.

102. Динамика показателей IFN-α у больных с инфекционной аллергией (ИА) в процессе иммунотерапии (ИТ) бактериальными аллергенами / Н.И. Баранова, Б.А. Молотилов, Е.М. Костина, С.Н. Болдина // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С 147.

103. Добияш Л.И. Исследование действия формальдегида на человека // Экол. кооп. – 1987. – № 3–4. – С. 30–35.

104. Довгуша В.В., Тихонов М.Н. От экологии и медицины к экологической медицине // Гигиена и санитария. – 1994. – № 4.– С. 70–74.

105. Долгих В.Т. Основы иммунопатологии. – М.: Медицинская книга, 2000. – 204 с.

106. Долгих О.В. Специфическая сенсибилизация к низкомолекулярным соединениям у детей: научное обоснование диагностических систем: дис. … д-ра мед. наук. – Пермь, 2002. – 299 с.

107. Долгих О.В., Гугович А.М. Оценка запрограммированной клеточной гибели в условиях контаминации биосред хлороформом // Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции, посвященной 10-летию кафедры «Защита в чрезвычайных ситуациях» СевКавГТУ (г. Ставрополь, 25 апреля 2011 г.). – Ставрополь, 2011. – С. 185–186.

108. Долгих О.В., Гугович А.М., Кривцов А.В. Иммуногенетические маркеры пролиферативных реакций в условиях экспозиции бензолом и формальдегидом // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 196.

109. Долгих О.В., Дианова Д.Г. Идентификация мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза у работающих в условиях воздействия ванадия, кремния, марганца // Профессиональные и экологические риски в медицине труда и экологии человека. Пути решения проблемы

от теории к практике: материалы XLVII науч.-практ. конф. с международным участием «Гигиена, организация здравоохранения и профпатология» и семинара «Актуальные вопросы современной профпатологии», Новокузнецк, 22–23 мая 2013 г. / под ред. В.В. Захаренкова. – Кемерово: Примула, 2013. – С. 18–21.

110. Долгих О.В., Дианова Д.Г., Гугович А.М. Апоптоз у работающих в условиях экспозиции фенолами // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. – 2012. – Т. XIX, № 1. – С. 41–43.

111. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. Анализ апоптотической активности лимфоцитов у женщин фертильного возраста в условиях воздействия репротоксикантов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 1 (1). – С. 58–59

112. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. Апоптотический сигналинг и его регуляция стронцием // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей междунар. конф., Пущино, 25–28 мая 2015 г. – Пущино, 2015. – Т. 2. – С. 547–552

113. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. Модификация клеточной регуляции иммунной системы ванадием // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, вып. 4. – С. 112–115.

114. Долгих О.В., Кривцов А.В., Бубнова О.А. Иммуногенетические показатели у работающих в условиях сочетанного воздействия пыли и производственного шума // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 551–553.

115. Долгих О.В., Перевалов А.Я., Кривцов А.В. Особенности полиморфизма генов липидного и углеводного обменов и его нутриентная коррекция // Материалы Всероссийского конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Персонифицированная диетология: настоящее и будущее». – М., 2011. – С. 25

116. Долгих О.В., Предеина Р.А., Вайсман Я.И. Особенности иммунорегуляции у детей в условиях контаминации фенолами // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 2 (1). – С. 46–49.

117. Долгих О.В., Предеина Р.А., Дианова Д.Г. Экспериментальная оценка влияния фенолов на иммунорегуляцию *ex vivo* // Анализ риска здоровью. – 2014. – № 1. – С. 83–87.

118. Домшлак М.Г. Анилин. Серия: Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических соединений / под ред. Н.Ф. Измерова. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1981. – 19 с.

119. Дуева Л.А. Специфические маркеры изменений иммунной системы при химических воздействиях // Мат. межд. симп. «Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века» / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 46–48.

120. Европейские рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в клинической практике // РФК. – 2005. – № 3. – URL: http: //cyberleninka.ru/article/n/evropeyskie-rekomendatsii-po-profilaktike-serdechno-sosudistyh-zabolevaniy-v-klinicheskoy-praktike-1 (дата обращения: 15.03.2013).

121. Евсюкова Е.В., Федосеев Г.Б. Роль метаболитов арахидоновой кислоты в механизмах аллергических реакций // Аллергология. – 2000. – № 4.

122. Елаховская Н.П. К изучению обмена никеля, поступающего в организм с питьевой водой // Гигиена и санитария. – 1972. – № 6. – С. 20–22.

123. Жарких М.А., Яблонский С.В., Мокроносова М.А. Значение лейкотриенов и антилейкотриеновых препаратов при аллергическом рините // Педиатрическая фармакология. – 2009. – Т. 6, № 5.

124. Жестков А.В. Иммунологические изменения при пылевой патологии легких // Гигиена и санитария. – 2000. – № 6. – С. 30–33.

125. Жолдакова И.А., Синицина О.О., Жолдакова З.И. Значение международных карт химической безопасности для комплексной оценки влияния веществ на здоровье человека // Мат. межд. симп. «Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века» / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 15–16.

126. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. Метод проточной цитометрии в диагностике нарушений показателей иммунной системы у детей, проживающих в условиях техногенной нагрузки // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 2 (1). – С. 60–62.

127. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Долгих О.В. Адаптационные возможности иммунной системы в условиях хронического воздействия фенола // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15, № 3 (6). – С. 1779–1782.

128. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Долгих О.В. Особенности апоптоза у детей при хроническом аэрогенном воздействии фенола // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 2. – С. 56–59.

129. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Влияние контаминации формальдегидом на показатели иммунной системы у детей // Из-

вестия Самарского научного центра РАН. – 2014. – Т. 16, № 5 (2). – С. 702–704.

130. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Мембранные маркеры апоптоза и медиаторы межклеточных взаимодействий у изолировщиков в условиях экспозиции фенолами // Влияние окружающей и производственной среды на здоровье человека. Пути решения проблемы: материалы XLVII науч.-практ. конф. с международным участием «Гигиена, организация здравоохранения и профпатология» и семинара «Актуальные вопросы современной профпатологии», Новокузнецк, 23–24 мая 2012 г. / под ред. В.В. Захаренкова. – Кемерово: Примула, 2012. – С. 119–123.

131. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности аннексинзависимого апоптоза у аппаратчиков производства активированных углей // Связь заболевания с профессией с позиции доказательной медицины: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием 19–20 мая 2011 г. – Казань, 2011. – С. 256–258.

132. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности иммунных нарушений в условиях производства активированных углей // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 2. – С. 21–23.

133. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности реактивности лимфоцитов в условиях экспозиции тяжелыми металлами // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, вып. 2. – С. 129–132.

134. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Акатова А.А. Эпидемиологические, клинические и клинико-лабораторные особенности развития и течения бронхиальной астмы у детей с эндемическим зобом в регионе техногенного воздействия химических факторов: монография. – Пермь, 2007. – 294 с.

135. Зайцева Н.В., Май И.В. Региональный опыт учета показателей риска для здоровья населения в задачах пространственного планирования // ARS ADMINISTRANDI. – 2011. – № 2. – С. 30–39.

136. Зайцева Н.В., Шур П.З. Концепция риска в системе мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия // Гигиена и санитария. – 2002. – № 6. – С. 19–21.

137. Закон РФ «Об охране окружающей среды» (с изменениями на 13 июля 2015 года) от 20 декабря 2001 года // КонсультантПлюс.

138. Залесский В.Н., Великая Н.В. Антиапоптические, проапоптические, антитоксические реакции молекул флавоноидов – растительных фенолов // Совр. проблемы токсикологии. – 2003. – № 3. – С. 64–72.

139. Захарченко М.П., Маймулов В.Г., Шатров А.В. Диагностика в практической медицине. – СПб.: Изд-во Международ. фонда истории науки, 1997. – 514 с.

140. Звездин В.Н., Акафьева Т.И. Оценка потенциальной опасности для здоровья человека наночастиц аморфного диоксида кремния // Здоровье населения и среда обитания. – 2012. – № 9 (234). – С. 14–17.

141. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы // Казанский медицинский журнал. – 2008. – Т. 89, № 1. – С. 1–7.

142. Змушко Е.И., Белозеров Е.С., Митин Ю.А. Клиническая иммунология: руководство для врачей. – СПб.: Питер, 2001. – 576 с.

143. Зуева Т.В., Китаев А.Б. Качество воды в родниках города Перми (по материалам 2002–2007 гг.) // Географический вестник. – 2010. – № 1. – С. 42–45.

144. Иванов А.В., Рылова Н.В. Роль факторов окружающей среды в формировании патологии пищеварительного тракта у детей // Казанский медицинский журнал. – 2009. – № 4. – С. 590–592.

145. Иванова И.Л. Влияние региональных факторов окружающей среды на формирование неинфекционных заболеваний органов пищеварительной системы: автореф. дис. … д-ра мед. наук. – Владивосток, 2012. – 22 с.

146. Изменение иммунологических показателей у работающих в условиях экспозиции ванадием, кремнием и марганцем / О.В. Долгих, Е.Д. Маерова, Р.А. Харахорина, А.М. Гугович // Профессиональные и экологические риски в медицине труда и экологии человека. Пути решения проблемы от теории к практике: материалы XLVII науч.-практ. конф. с международным участием «Гигиена, организация здравоохранения и профпатология» и семинара «Актуальные вопросы современной профпатологии», Новокузнецк, 22–23 мая 2013 г. / под ред. В.В. Захаренкова. – Кемерово: Примула, 2013. – С. 99–102.

147. Изменение иммунорегуляторных показателей у детей в условиях хронического воздействия хлорорганических соединений / Н.В. Зайцева, К.Г. Старкова, И.В. Перминова, Я.И. Вайсман // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 322–324.

148. Измеров Н.Ф. Здоровье трудоспособного населения России // Медицина труда и промышленная экология. – 2005. – № 11. – С. 34–36.

149. Измеров Н.Ф., Тихонова Г.И., Яковлева Т.П. Современная медико-демографическая ситуация в России // Медицина труда и промышленная экология. – 2005. – № 5. – С. 22–25.

150. Ильинова Е.А., Богова А.В., Гудима Г.О. Структура аллергической патологии в промышленном городе // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 166.

151. Иммунитет у детей в условиях воздействия техногенных химических факторов / О.В. Долгих [и др.] // Здоровье семьи – 21 век. – 2010. – № 1.

152. Иммунная система и ее генетические ассоциации у детей при комбинированном внешнесредовом воздействии / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, А.В. Кривцов, К.Г. Горшкова, Д.В. Ланин, О.А. Бубнова // Вестник КазНМУ. – 2014. – № 3 (1). – С. 60–63.

153. Иммунные и генетические маркеры эффекта при экспозиции фенолами / О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, Д.В. Ланин, А.В. Кривцов // Мат. XI Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей, Москва, 29–30 марта 2012 г. – М., 2012. – Т. 2. – С. 404–407.

154. Иммунные и ДНК-маркеры воздействия техногенной нагрузки / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Р.А. Харахорина, Д.В. Ланин // Вестник Уральской медицинской академической науки. – М., 2012. – № 4. – С. 240–241.

155. Иммуногенетические особенности апоптоза у работающих, занятых в производстве метанола / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, Р.А. Предеина, Д.Г. Дианова, О.О. Синицина, Н.Н. Малютина, Л.А. Тараненко // Медицина труда и промышленная экология. – 2013. – № 11. – С. 9–12.

156. Иммунодефицитные состояния / под ред. проф. В.С. Смирнов и проф. И.С. Фрейдлин. – СПб.: Фолиант, 2000. – 568 с.

157. Иммунологическая и генетическая диагностика угрозы прерывания беременности у женщин в условиях экспозиции метилированными фенолами / О.В. Долгих, Р.А. Харахорина, А.В. Кривцов, А.М. Гугович, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VII международного конгресса. – М., 2013. – С. 42–44.

158. Иммунологические аспекты экологически детерминированной бронхиальной астмы / О.В. Долгих [и др.] // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 2–3. – С. 179–180.

159. Иммунологические и генетические маркеры внешнесредовой экспозиции стронцием / К.Г. Горшкова, О.А. Бубнова, Е.Д. Маерова, О.В. Долгих // Санитарный врач. – 2014. – № 3. – С. 72–74.

160. Иммунологические и генетические маркеры воздействия ароматических углеводородов на работающих / О.В. Долгих, А.В. Кривцов,

А.М. Гугович, Р.А. Харахорина, Д.В. Ланин, Т.С. Лыхина, М.А. Сафонова // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – № 12. – С. 30–33.

161. Иммунологические маркеры нарушения здоровья детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием хлорорганических соединений / Д.Г. Дианова, О.В. Долгих, Р.А. Харахорина, А.М. Гугович // Мат. II международной научн.-практ. конференции «Чистая капля воды», 21 марта 2012 г. – Чита: РИО ЗабГУ, 2012. – С. 28–30.

162. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

163. Иммунологические особенности бронхиальной астмы у детей / Н.М. Калинина, А.В. Папаян, Ю.В. Пешехонова, А.Н. Галустян // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 163.

164. Иммунологические подходы к превенции экологичеки обусловленных заболеваний и реабилитации больных / Б. Саакадзе, М. Церетели, Р. Джавахадзе, Н. Ломататидзе, М. Цимакуридзе, Н. Хачапуридзе, Д. Зурашвили, Р. Бараташвили // International journal on immunorehabilitation. – 1999. – № 12. – С. 141.

165. Иммунология: пер. с англ. / А. Ройт [и др.]. – М.: Мир, 2000. – 692 с.

166. Иммунопатологический аллергический Th2-тип противовирусного гуморального иммунного ответа у детей с респираторно-синицитальной вирусной инфекцией / В.З. Кривицкая [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 34–40.

167. Исследование генотоксичности и репродуктивной токсичности нанокристаллов кремния / А.Д. Дурнев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 4. – С. 429–433.

168. Кадагидзе З.Г. Иммунология // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 131–139.

169. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова Н.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редоксзависимых процессов // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.

170. Кандидатные гены нарушений иммунного ответа у детей в условиях экспозиции хлороформом / О.В. Долгих, О.А. Бубнова, Н.В. Безрученко, В.А. Лучникова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 553–555.

171. Каримов Х.Е., Назаров А.А., Низамов К.Ф. Особенности диагностики атопической бронхиальной астмы // International journal on immunorehabilitation. – 1999. – № 12. – С. 22

172. Карташова Н.К. Современные особенности бронхиальной астмы в подростковом возрасте // Мат науч.-практ. конф. «Социальная педиатрия – проблемы, поиски, решения». – СПб., 2000. – С. 104–105

173. Качество воздушной среды и заболеваемость детей / Ю.И. Григорьев [и др.] // Гигиена и санитария. – 2010. – № 4. – С. 28.

174. Кеворков Н.Н., Долгих О.В. Особенности функционального состояния иммунной системы в условиях воздействия низкомолекулярных химических соединений // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4, № 3. – С. 473–476.

175. Кирдей Л.Е., Кирдей Е.Г. Особенности иммунного статуса у детей с бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 163–164.

176. Киреев А.А. Оценка аэрогенного риска для здоровья населения при обосновании размеров санитарно-защитных зон промышленных объектов: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Оренбург, 2010. – 24 с.

177. Кладов С. Ю. Смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы и внешних причин в условиях среднеурбанизированной территории западной Сибири // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 23, № 1–2. – С. 43–46.

178. Клинико-анамнестические особенности и состояние иммунитета при хроническом пиелонефрите у детей в условиях внешнесредового воздействия тяжелых металлов / И.Е. Штина [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 7. – С. 180–183.

179. Клиническая иммунология и аллергология / под ред. Г. Лолора-младшего [и др.]. – М.: Практика, 2000. – 806 с.

180. Клиническая иммунология и аллергология: пер. с нем. / под ред. Л. Йегера. – М.: Медицина, 1990. – 528 с.

181. Клиническая иммунология: руководство для врачей / под ред. Е.И. Соколова. – М.: Медицина, 1998. – 272 с.

182. Кобец Т.В., Танага В.А. Роль экологических факторов в формировании бронхиальной астмы у детей // Таврический медико-биологический вестник. – 2011. – Т. 14, № 1 (53). – С. 173–177.

183. Кобринский Б.А. Принципы математико-статистического анализа данных медико-биологических исследований // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1996. – № 4. – С. 60–64.

184. Количественная оценка биомаркеров апоптоза и клеточной регуляции у детей с повышенным содержанием стронция в организме / Д.Г. Дианова, Н.А. Вдовина, Е.А. Пирогова, В.П. Рочев // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 129–131.

185. Количественная оценка неканцерогенного риска при воздействии химических веществ на основе построения эволюционных моделей: методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. – 36 с.

186. Коломийцева М.Г., Габович Р.Д. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – С. 286.

187. Концепция региональной политики в области формирования здорового образа жизни населения Пермского края на период до 2020 года. – Пермь: ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, 2011. – 13 с.

188. Корреляционная связь между некоторыми показателями клеточного звена иммунитета и содержанием иммуноглобулина Е / Е.Л. Ратикина, Б.В. Щербакова, А.И. Титаренко, В.П. Бондарева, Н.И. Королева, М.В. Крошка // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 170.

189. Косохов А.Б. Нарушение иммунобиологической реактивности в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1999. – № 5. – С. 37–41.

190. Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Провосполительные цитокины в норме и при патологии // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С 147.

191. Кравченко Л.В., Трусов Н.В., Ускова М.А. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса // Токсикологический вестник. – 2009. – № 1. – С. 12–17.

192. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 544 с.

193. Кузьмин И.И., Шапошников Д.А. Концепция безопасности: от риска «нулевого» – к «приемлемому» // Вестник Российской академии наук. – 1994. – Т. 64, № 5. – С. 402–408.

194. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56 (issue 6). – С. 657–662.

195. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55 (issue3). – С. 255–277.

196. Курляндский Б.А. Концептуальные основы химической безопасности в XXI веке // Материалы межд. симп. «Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века» / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 7.

197. Курчевенко С.В. Оценка иммунореактивности организма работающих в условиях воздействия нейротоксикантов различной химической природы: дис. … канд. мед. наук. – Иркутск, 2011. – 117 с.

198. Кутепов Е.Н. Методические основы оценки состояния здоровья населения при воздействии факторов окружающей среды: автореф. дис. … д-ра мед. наук. – М., 1995. – 41 с.

199. Куценко С.А. Основы токсикологии. – М., 2004. – 720 с.

200. Кучма В.Р. Современное дошкольное образование: гигиенические проблемы и пути решения. – М.: Научный центр здоровья детей РАМН, 2011. – 356 с.

201. Кучма В.Ф. Гигиеническая оценка влияния окружающей среды в нефтегазодобывающем регионе на здоровье подростков призывного возраста: дис. … канд. мед. наук. – М., 2007. – 140 с.

202. Лаврентьев А.В., Гуревич О.Е., Зайцева О.В. Эффективность применения радиоаллергосорбентного теста в комплексном обследовании детей, больных бронхиальной астмой (БА) // International journal on immunorehabilitation. – 1999. – № 12. – С. 21.

203. Ланин Д.В., Зайцева Н.В. Особенности иммунного и гормонального статусов у мужчин, работающих в условиях воздействия химических производственных факторов // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 201.

204. Ланин Д.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. Гигиеническая оценка регуляторных систем у детей в условиях многосредового воздействия химичесих факторов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 228.

205. Ланин Д.В., Зайцева Н.В., Долгих О.В. Нейроэндокринные механизмы регуляции функций иммунной системы // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131, № 2. – С. 122–134.

206. Лыхина Т.С., Ожгибесова А.А., Беклемышева С.Н. Белок P53 в условиях контаминации биосред фенолами // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 229.

207. Лыхина Т.С., Харахорина Р.А. Цитокиновый профиль детей в условиях поступления хлорорганических соединений с питьевой водой // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/2 (35). – С. 95–96.

208. Магомет С.Д. Факторы окружающей среды и состояние здоровья населения // Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена. – 2011. – № 141. – С. 104–114.

209. Маерова Е.Д., Горшкова К.Г. Специфические иммунологические маркеры у детей в условиях комбинированной техногенной нагрузки // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 202–203.

210. Маерова Е.Д., Харахорина Р.А.Особенности иммунологического статуса взрослого населения при воздействии физических и химических техногенных факторов // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2013. – № 1. – С. 132–133.

211. Май И.В. Научные основы эколого-гигиенического мониторинга для задач управления аэротехногенной нагрузкой и здоровьем населения: дис. … д-ра биол. наук. – М., 1998.

212. Маркеры иммунного статуса у аппаратчиков, занятых на производстве активированных углей / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина // Пермский медицинский журнал. – 2011. – Т. 28, № 5. – С. 70–74.

213. Маршалкина Т.В., Байжанова М.М., Беляев Н.Н. Общность иммунологических механизмов патогенеза рецидивирующего обструктивного бронхита и бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 165.

214. Матышева Н.Н. Новый способ определения специфической сенсибилизации организма к пищевым аллергенам // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 180.

215. Медуницин Н.В. Цитокины и аллергия // International journal on immunorehabilitation. – 1999. – № 12. – С. 28.

216. Менджерицкий И.М., Сафронова Т.В. Аллергия у детей. – Ростов-н/Д.: Феникс, 1996. – 416 с.

217. Методические подходы к проведению медико-экологической реабилитации детского населения зон повышенной экострессорности / Н.В. Зайцева, И.П. Корюкина, Н.И. Аверьянова [и др.] // Экопатология детского возраста. – М., 1995. – С. 341–344.

218. Методологические аспекты оценки риска для здоровья населения при кратковременных и хронических воздействиях химических веществ, загрязняющих окружающую среду / Ю.А. Рахманин [и др.] // Гигиена и санитария. – 2002. – № 6. – С. 5–7.

219. Методы оценки состояния иммунной системы в клинической практике / Ю.И. Шилов, Н.Н. Кеворков, Б.А. Бахметьев, В.А. Черешнев, Н.А. Шилова. – Екатеринбург: УИФ «Наука», 1997. – 180 с.

220. Механизмы формирования предрасположенности к острым респираторным заболеваниям в регионах с высокой антропогенной нагрузкой / М.В. Скачков [и др.] // Гигиена и санитария. – 2002. – № 5. – С. 39–42.

221. Мизерницкий Ю.Л. Значение экологических факторов при бронхиальной астме у детей: автореф. дис. … д-ра мед. наук. – М., 1998. – 57 с.

222. Миронова Н.В. Аллергический ринит у работающих в контакте с органической пылью // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 293.

223. Михайлова Е.В. Гигиеническая оценка влияния антропогенных факторов окружающей среды на здоровье детей и подростков промышленного города: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Казань, 2005. – 22 с.

224. Михайлова Е.В., Сусликов В.Л. Иммунный статус в условиях антропогенного загрязнения атмосферы промышленного города // Сборник статей по материалам 64-й итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2005. – С. 27–29.

225. Михайлова И.В. Экологические особенности среды обитания и иммунный статус детей сельских населенных пунктов: дис. … канд. биол. наук. – Оренбург, 2001. – 165 с.

226. Модуляция жизненного цикла клетки в условиях экспозиции фенолами / Н.В. Зайцева [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 683–686.

227. Молекулярно-генетические особенности апоптоза в условиях гаптенной нагрузки / О.В. Долгих, Р.А. Харахорина, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов, А.М. Гугович, Т.С. Лыхина // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – Пущино, 2013. – Т. 1. – С. 374–378.

228. Морфологические особенности тканей внутренних органов и систем при воздействии нанодисперсного оксида марганца (III, IV) / Н.В. Зайцева [и др.] // Вестник РАМН. – 2013. – № 2. – С. 18–23.

229. Морфофункциональные критерии действия на организм факторов окружающей среды / под ред. А.И. Потапов. – М.: Медицина, 2001. – 184 с.

230. МР 2.1.9.100-10. Установление региональных фоновых уровней содержания контаминантов в биологических средах детей при проведении экспертиз, исследований, расследований / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – М., 2010. – 14 с.

231. МУК 4.1.763-4.1.779-99. Определение химических соединений в биологических средах: сборник методических указаний. – М., Минздрав РФ, 2000. – 76 с.

232. Мустафин И.Г., Бойчук С.В., Фассахов Р.С. Изучение механизмов апоптоза лимфоцитов периферической крови больных атопической бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С 166.

233. Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы): федеральная целевая программа / утв. Постановлением РФ № 791 от 27 октября 2008 г. – М., 2008.

234. Незабудкин С.Н., Антонова Т.И., Карташова Н.К. Сопутствующая патология у детей и подростков с атопической бронхиальной астмой // Материалы XI национального конгресса по болезням органов дыхания. – М., 2001. – С. 46.

235. Никель и его соединения. Серия «Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ» / под ред. Н.Ф. Измерова. – М., 1984. – 38 с.

236. Новиков Д.К. Выхристенко Л.Р., Новиков П.Д. Специфическая иммунотерапия аллергических заболеваний // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 167.

237. Новиков М.Г. Основные тенденции в области улучшения качества очистки поверхностных вод // Вода и экология. – 1999. – № 1. – С. 8–11.

238. Новый подход к интегральной оценке иммунной системы человека в условиях воздействия комплекса факторов химически опасных объектов / С.В. Петленко [и др.] // Токсикология. Иммунология. – 2010. – Т. 11. – С. 195–216.

239. О многоэтапном метрологическом подходе к проблеме оценки результатов количественного иммуноферментного определения антитоксических антител. / В.Ф. Петров, А.М. Николаева, В.А. Иванова,

Т.С. Шобухова, Г.М. Туманова // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1998. – № 2. – С. 43–46.

240. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пермском крае в 2011 году: Государственный доклад. – Пермь: Управление Роспотребнадзора по Пермскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае», 2012. – 272 с.

241. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пермском крае в 2013 году: Государственный доклад. – Пермь: Управление Роспотребнадзора по Пермскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае», 2014. – 273 с.

242. О связи ежедневных изменений концентраций загрязнителей атмосферного воздуха с развитием респираторной симптоматики у детей / Л.И. Привалова, С.В. Брезгина, Б.А. Кацнельсон, С.В. Кузьмин, С.А. Воронин, А.А. Кошелева, Б.И. Никонов, В.Б. Гурвич // Материалы межд. симп. «Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века» / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 67–68.

243. О сертификации набора для иммунологических испытаний / Т.А. Батимиров, В.Ф. Петров, П. Миете, Т.С. Шобухова, А.М. Николаева, Г.М. Туманова, У. Эрхардт, К.Ж. Эрхардт // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1998. – № 2. – С. 39–43.

244. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2011 году: Государственный доклад. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. – 316 с.

245. Об обеспечении единства измерений: Федеральный закон от 1 июня 1993 г. // Ведомости съезда народных депутатов РФ и Верховного Совета РФ. – 1993. – № 23.

246. Обоснование генетических и иммунных маркеров чувствительности и эффекта в условиях комбинированного воздействия факторов риска на работников горнорудной промышленности / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, А.В. Кривцов, К.Г. Горшкова, Д.В. Ланин, О.А. Бубнова, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина, Н.А. Вдовина // Медицина труда и промышленная экология. – 2014. – № 12. – С. 19–23.

247. Обоснование иммунных и ДНК-маркеров воздействия техногенной нагрузки на детей в условиях контаминации крови ароматическими углеводородами / Р.А. Харахорина, А.М. Гугович, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, А.А. Ожгибесова, Е.М. Лекомцева, С.Н. Беклемышева // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: материалы Всероссийской научно-

практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2012. – Т. 2. – С. 289–293.

248. Общая гигиена: учеб. пособие / А.М. Большаков [и др.]. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 832 с.

249. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и МАР-киназ ERK 1,2 / К.П. Василенко, Е.Б. Бурова, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский // Цитология. – 2006. – Т. 48 (6). – С. 500–507.

250. Окружающая среда. Оценка риска для здоровья (мировой опыт) / С.Л. Авалиани, М.М. Андрианова, Е.В. Печенникова, О.В. Пономарева. – М., 1996. – 159 с.

251. Онищенко Г.Г, Верещагин А.И. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2009 году: Государственный доклад. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 456 с.

252. Онищенко Г.Г. Городская среда и здоровье человека // Гигиена и санитария. – 2007. – № 5. – С. 3–4.

253. Онищенко Г.Г. Итоги и перспективы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации // Здравоохранение Российской Федерации. – 2008. – № 1. – С. 2–5.

254. Онищенко Г.Г. О санитарно-эпидимиологической обстановке в России // Гигиена и санитария. – 1997. – № 6. – С. 14–17.

255. Онищенко Г.Г. Оценка риска влияния факторов окружающей среды на здоровье в системе социально-гигиенического мониторинга // Гигиена и санитария. – 2002. – № 6. – С. 3–5.

256. Онищенко Г.Г. Стратегия безопасности наноиндустрии // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 4–8.

257. Онищенко Г.Г., Шестопалов Н.В. О практике применения федерального закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения и совершенствовании санитарного законодательства» // Гигиена и санитария. – 2003. – № 5. – С. 3–7.

258. Определение факторов, влияющих на заболеваемость бронхиальной астмой у детей / А.С. Цыбина [и др.] // Медицинский альманах. – 2009. – № 3 (8). – С. 145–149.

259. Орлова А., Линч Д. Свинец в окружающей среде. – М., 1995. – С. 23.

260. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 259–292.

261. Основы оценки риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду / под ред. Ю.А. Рахманина. – М.: НИИИЭЧ и ГОС, 2002. – 408 с.

262. Особенности апоптоза в условиях экспозиции хлорорганических соединений и ванадия / О.В. Долгих [и др.] // Гигиена и санитария. – 2012. – № 3. – С. 15–17.

263. Особенности апоптоза у детского населения экспонированного хлороформом / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, Я.И. Вайсман // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 2 (1). – С. 49–51.

264. Особенности воздействия техногенных химических факторов на иммунологическое и генетическое здоровье детей (Пермский край) / А.М. Гугович, Р.А. Харахорина, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, А.А. Ожгибесова, Е.М. Лекомцева, С.Н. Беклемышева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения». – 2012. – Т. 1. – С. 158–161.

265. Особенности генетического полиморфизма в условиях техногенного загрязнения (на примере детского населения Пермского края) / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, А.М. Гугович, Р.А. Харахорина // Экологический мониторинг и биоразнооообразие. – 2013. – № 1 (8). – С. 8992.

266. Особенности генетического полиморфизма и иммунного статуса у детей, экспонированных бенз(а)пиреном / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, К.Г. Горшкова, Д.Г. Дианова, Н.А. Вдовина, Е.А. Пирогова, В.А. Безденежных // Вестник пермского университета. – 2014. – № 4. – С. 97–100.

267. Особенности генетического полиморфизма у женщин с угрозой невынашивания в условиях хронической аэрогенной экспозиции фенолами / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, В.Б. Алексеев // Анализ риска здоровью. – 2013. – № 4. – С. 77–81.

268. Особенности иммунного и генетического статуса у женщин в условиях производства / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, А.М. Гугович, Р.А. Харахорина // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6 (14), № 2 (1). – С. 50–51.

269. Особенности иммунного ответа у детей с аллергическими заболеваниями в условиях влияния формальдегида, марганца и хрома /

Р.А. Харахорина, О.В. Долгих, Т.С. Лыхина, А.М. Гугович. – 2012. – Т. 2. – С. 301–305. (г. Пермь, 16–18 мая 2012 г.)

270. Особенности иммунной и генетической дезадаптации у детей в условиях избыточной гаптенной нагрузки / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, К.П. Лужецкий, Е.Е. Андреева // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 3. – С. 299–302.

271. Особенности иммунных и генетических нарушений у женщин в условиях производства / Р.А. Харахорина, А.М. Гугович, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, А.А. Ожгибесова, Е.М. Лекомцева, С.Н. Беклемышева // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2012. – Т. 2. – С. 293–296.

272. Особенности иммунных нарушений у работающих в условиях воздействия ароматических углеводородов / Р.А. Харахорина, А.М. Гугович, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, А.А. Ожгибесова, Е.М. Лекомцева, С.Н. Беклемышева // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2012. – Т. 2. – С. 297–300.

273. Особенности иммунных показателей в условиях контаминации питьевой воды тяжелыми металлами / К.Г. Старкова, Н.В. Безрученко, В.А. Лучникова, Т.А. Легостаева // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 320–321.

274. Особенности иммуногенетических показателей у работников предприятия цветной металлургии / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, О.А. Бубнова, Д.В. Ланин, Н.А. Вдовина, К.П. Лужецкий, Е.Е. Андреева // Гигиена и санитария. – 2015. – Т. 94, № 2. – С. 54–57.

275. Особенности клеточного звена иммунитета у детей в условиях внешнесредовой экспозиции толуолом, формальдегидом, фенолом / Н.В. Зайцева [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 5 (2). – С. 341–343.

276. Особенности клеточного звена иммунной системы у детей в условиях экспозиции фенолом и формальдегидом / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, Р.А. Харахорина // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 196.

277. Особенности лимфоцитарно-клеточного звена у детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях / О.В. Долгих, Н.В. Зай-

цева, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина, А.В. Кривцов, А.М. Гугович // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 5. – С. 349–353.

278. Особенности лимфоцитарно-клеточного звена у детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина, А.В. Кривцов, А.М. Гугович // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сб. статей международной конференции (24–26 мая 2011 г., Пущино). – Пущино, 2011. – С. 478–483.

279. Особенности нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы у женщин репродуктивного возраста, работающих в условиях экспозиции химических факторов / Д.В. Ланин, Н.В. Зайцева, М.В. Черешнева, В.А. Черешнев // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 1. – С. 59–64.

280. Особенности цитокинового профиля и иммунного статуса при аллергических заболеваниях у детей / Е.В. Просекова [и др.] // Pacific Medical Journal. – 2005. – № 3. – P. 44–48.

281. Оценка активационного профиля лимфоцитов у женщин, экспонированных сильвинитовой пылью / Д.Г. Дианова, Н.В. Зайцева, О.А. Бубнова, Н.А. Вдовина // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 1 (1). – С. 51–53.

282. Оценка вклада выбросов автотранспорта в интегральную характеристику риска загрязнений воздушной среды / С.Л. Авалиани [и др.] // Гигиена и санитария. – 2002. – № 6. – С. 21–25.

283. Оценка иммунного статуса в условиях внешнесредового воздействия ванадия и марганца (на примере детского населения Пермского края) / А.М. Гугович, Р.А. Харахорина, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, А.А. Ожгибесова, Е.М. Лекомцева, С.Н. Беклемышева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения». – 2012. – Т. 1. – С. 162–165.

284. Оценка иммунных и генетических нарушений у изолировщиков химического производства / А.М. Гугович, Р.А. Харахорина, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина, Д.Г. Дианова, А.А. Ожгибесова, Е.М. Лекомцева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения». – 2012. – Т. 1 – С. 166–169.

285. Оценка комплексного действия хлороформа питьевой воды / Т.И. Иксанова, А.Г. Малышева, Е.Г. Растянников, Н.А. Егорова // Гигиена и санитария. – 2006. – № 2. – С. 8–11.

286. Оценка некоторых показателей эндогенной интоксикации у человека при действии малых доз экотоксикантов / Е.В. Семенов, Н.Л. Елаева, Т.М. Иванова, А.М. Малов, А.С. Иванова, К.В. Сизова, Г.В. Шестова // Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии: тезисы докладов Российской научной конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 19–20 мая 2011 г. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2011. – 312 с.

287. Оценка экологической ситуации в зоне влияния крупного промышленного узла / Т.С. Уланова [и др.] // Вестник ПНИПУ. Урбанистика. – 2012. – № 1. – С. 124–130.

288. Паранько Н.М., Рублевская Н.И. Гигиеническая характеристика загрязнения тяжелыми металлами окружающей среды промышленного региона и иммунный статус детей // Гигиена и санитария. – 1999. – № 2. – С. 51–54.

289. Патогенетические закономерности каскадного механизма развития хронических гастродуоденальных заболеваний у детей, обусловленных потреблением питьевой воды ненадлежащего качества по содержанию продуктов гиперхлорирования и марганца / О.Ю. Устинова, К.П. Лужецкий, О.А. Маклакова, М.А. Землянова, О.В. Долгих, Т.С. Уланова // Анализ риска здоровью. – 2014. – № 3. – С. 61–70.

290. Паттерсон Р., Грэммер Л.К., Гринбергер П.А. Аллергические болезни: диагностика и лечение: пер. с англ. / под ред. А.Г. Чучалина, И.С. Гущина и др. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – 768 с.

291. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1982. – С. 360–379.

292. Плейфер Дж. Наглядная иммунология. – М.: Медицина, 1999. – 96 с.

293. Полиморфизм гена фактора некроза опухоли и гена CPOX у работающих в условиях химического производства / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Д.Г. Дианова, А.М. Гугович, Р.А. Харахорина // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 11. – С. 29 – 32.

294. Полиморфизм генов белков ангиогенеза в условиях шумовой и химической техногенной экспозиции / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, Е.Д. Данилова, О.О. Синицина, Р.А. Предеина, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. – № 11 (248). – С. 42–44.

295. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков GSTM1, GSTT1, CYP2D6, вероятных маркеров риска онкологических заболеваний, в популяции коренных этносов у русских северной Сибири / Р.П. Корчагина, Л.П. Осипова, Н.А. Вавилова, Н.А. Ермоленко, Е.Н. Воронина, М.Л. Филиппенко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, № 3. – С. 448–461.

296. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в популяциях русского населения европейской части России/ А.В. Хрунин, Д В. Хохрин, С.А. Лимборская // Генетика. – 2008. – № 44. – С. 1429–1434.

297. Полиморфизм генов и особенности иммунной регуляции у работающих в условиях металлургического производства / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Р.А. Предеина, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, О.О. Синицина // Здоровье семьи – 21 век. – 2013. – № 4 (4). – С. 27–39.

298. Понкратов А.В., Махотина И.Г. Качество питьевой воды как фактор риска заболеваемости острыми кишечными инфекциями // Здравоохранение РФ. – 2001. – № 2. – С. 52 55.

299. Потапов А.И., Винокур И., Гильденскиольд Р.С. Здоровье населения и проблемы гигиенической безопасности. – М., 2006. – 303 с.

300. Потемкина А.М., Клыкова Т.В. Клинико-иммунологические особенности различных вариантов атопической бронхиальной астмы // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С 169.

301. Предеина Р.А., Долгих О.В., Синицына О.О. Экспериментальное подтверждение экспрессии медиаторов регуляции иммунного ответа в условиях хронической экспозиции фенолами // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. – № 11 (248). – С. 30–32.

302. Применение стрептавидин-биотинового метода фенотипирования лимфоцитов в иммунологическом мониторинге / Н.В. Козаченко, И.К. Гальстер, И.Ф. Мингазова, А.С. Ракишева // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 146–147.

303. Проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Ч. 1: Научно-методические аспекты анализа санитарно-эпидемиологической ситуации (монография) / Г.Г. Онищенко, Г.И. Куценко, Е.Н. Беляев, Н.В. Зайцева, П.З. Шур. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000. – 251 с.

304. Пульмонология детского возраста: проблемы и решения / под ред. Ю.Л. Мизерницкого и А.Д. Царегородцева. – М., 2006. – Вып. 6. – 304 с.

305. Разработка расширенной системы иммунологических показателей для оценки влияния факторов окружающей среды на состояние здоровья населения / В.Н. Федосеева [и др.] // Гигиена и санитария. – 2010. – № 1. – С. 11–12.

306. Распространенность йоддефицитной тиреоидной патологии у детей, проживающих в условиях низкого природного йодного обеспечения и воздействия химических техногенных факторов среды обитания / К.П. Лужецкий [и др.] // Социально-гигенические проблемы общественного здоровья и экологии человека на современном этапе: материалы XLIV науч.-практич. конф. с международным участием «Гигиена, организация здравоохранения и профпатология». – Кемерово: Примула, 2009. – С. 173–176.

307. Рахманин Ю.А., Ревазова Ю.А. Донозологическая диагностика в проблеме окружающая среда здоровье населения // Гигиена и санитария. – 2004. – № 6. – С. 3–5.

308. Ревич Б.А. Свинец в биосубстратах жителей промышленных городов // Гигиена и санитария. – 1990. – № 4. – С. 28–33.

309. Ревич Б.А., Гуревич Е.Б. Региональные и локальные проблемы химического загрязнения окружающей среды и здоровья населения // Медицина труда и промышленная экология. – 1995. – № 9. – С. 23–29.

310. Регуляторные показатели иммунной системы у детей в условиях техногенной нагрузки / О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, Д.В. Ланин, Т.С. Лыхина // Медицинская иммунология. – СПб., 2011. – Т. 13, № 4–5. – С. 468.

311. Регуляция цитокинового профиля у работающих в условиях вредного производства / О.В. Долгих [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 9. – С. 45–46.

312. Резник И.Б. Генетические механизмы развития бронхиальной астмы // Аллергология. – 1998. – № 1. – С. 8–12.

313. Результаты иммуногенотипирования детей и взрослых, экспонированных техногенными гаптенами / О.В. Долгих, О.А. Бубнова, К.Г. Горшкова, Е.А. Пирогова // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 3. – С. 302–305.

314. Роль активных форм кислорода в патогенезе синдрома пренатального стресса / Ю.И. Губский И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов, Е.Л. Левицкий // Современные проблемы токсикологии. – 2006. – № 2. – С. 47–42.

315. Роль реагинов и лейкотриенов в развитии техногенно обусловленных нарушений у детей / Р.А. Харахорина, А.М. Гугович, О.В. Дол-

гих, А.В. Кривцов, Т.С. Лыхина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 233.

316. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева [и др.] // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 4. – С. 329–334.

317. Роль цитокинов в развитии профессиональных нейроинтоксикаций у работающих на различных стадиях патологического процесса / Г.М. Бодиенкова [и др.] // Fundamental Research. – 2010. – № 11. – С. 22–26.

318. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. – М.: Федер. центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 143 с.

319. Рылова Н.В. Особенности формирования заболеваний верхнего отдела пищеварительного тракта у детей (медико-экологические аспекты): дис. … д-ра мед. наук. – М., 2009. – 264 с.

320. Саноцкий И.В. Профилактическая токсикология в XXI веке // Материалы межд. симп. «Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века» / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 8–9.

321. Сетко А.Г. Оценка последствий для здоровья населения, проживающего на территории с развитой промышленностью // Вестник ОГУ. – 2005. – № 5. – С. 101–103.

322. Сетко А.Г., Очнева Г.И. Факторы, формирующие здоровье детского населения, проживающего на урбанизированных территориях, и оценка риска их воздействия // Вестник ОГУ. – 2005. – № 5. – С. 104–106.

323. Сидоров А.В. Физиология межклеточной коммуникации. – М., 2008. – 215 с.

324. Сизых Т.П., Ефимова Н.Ю. Способ диагностики индивидуальной непереносимости аспирина у больных бронхиальной астмой: пат. 2094800 Россия, МКИ6 G01N33/48. Иркут. гос. мед. ин-т. № 5054713/14; Заявл. 13.07.92; Опубл. 27.10.97, Бюл. № 30. – Иркутск, 1997.

325. Синицына О.О, Красовский Г.Н., Жолдакова З.И. Критерии порогового действия химических веществ, загрязняющих различные объекты окружающей среды // Вестник РАМН. – 2003. – № 3. – С. 17–23.

326. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели: учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза». – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.

327. Скрининговый тест для формирования групп риска по развитию патологии респираторной системы у детей, проживающих в небла-

гоприятных экологических условиях / А.Ф. Перковская, А.Н. Черевко, Е.Е. Тарасова, И.Н. Гирко, Е.В. Кильчевская // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 188.

328. Славин М.Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1989. – 304 с.

329. Современные особенности питания и иммунная система / И.М. Петров, Т.А. Гагина И.А. Трошина И.В. Медведева // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – № 6. – С. 10–13.

330. Современные технологии реабилитации детей с аллергодерматозами / Л.Ф. Казначеева, М.Ю. Денисов, А.В. Молокова [и др.] / под ред. Л.Ф. Казначеевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – Новосибирск, 2000. – 196 с.

331. Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Кремень Н.В. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты): учебное пособие для врачей. – М.: Академия Естествознания, 2008.

332. Солодовникова О.Н., Молочный В.П. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 118–122.

333. Состояние атмосферного воздуха в Пермском крае / Ф.Г. Сайткулова [и др.] // Экология и охрана окружающей среды. – URL: http: //www.eco-oos.ru/biblio/konferencii/ekologicheskie-problemy-okrujayuscheisredy-puti-i-metody-ih-resheniya/20/ (дата обращения: 19.03.2013).

334. Состояние водных объектов в Пермском крае / Ф.Г. Сайткулова [и др.] // Экология и охрана окружающей среды. – URL: http: // www.eco-oos.ru/biblio/konferencii/ekologicheskie-problemy-okrujayuscheisredy-puti-i-metody-ih-resheniya/01/ (дата обращения: 20.03.2013).

335. Состояние водных объектов города Перми и вопросы качества их вод / Г.В. Морозова [и др.] // Географический вестник. – 2012. – № 1 (20). – С. 60–71.

336. Состояние здоровья детей как фактор национальной безопасности / А.А. Баранов [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2005. – № 2. – С. 4–8.

337. Состояние здоровья и анализ взаимосвязей в системе «среда – здоровье населения» на экологически неблагополучных территориях / Н.В. Зайцева, М.В. Пушкарева, И.В. Май [и др.] // Экологическая безопасность городов Урала. – Пермь, 1994. – С. 35–38.

338. Состояние и охрана окружающей среды Пермского края в 2011 году // Природа Пермского края: официальный сайт. – URL: http: //www.permecology.ru/reports2011.php (дата обращения: 20.03.2013).

339. Состояние иммунной и эндокринной систем у женщин, работающих на производстве активированных углей / Д.В. Ланин, Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, М.А. Землянова, Д.А. Кирьянов // Медицина труда и промышленная экология. – 2013. – № 3. – С. 11–15.

340. Состояние иммунной системы в зависимости от возраста у часто и длительно болеющих детей, проживающих в условиях промышленного города / И.Н. Гирко, А.Ф. Перковская, Е.Е. Тарасова, А.Н. Черевко, Е.В. Кильчевская // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 156.

341. Сравнительная диагностическая значимость различных аллергологических тестов / Н.К. Карташова, С.Н. Незабудкин, Т.И. Антонова, П.Х. Варнаков // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 183–184.

342. Степанова Н.В. Иммунный статус детей в условиях загрязнения крупного города тяжелыми металлами // Гигиена и санитария. – 2003. – № 5. – С. 42–44.

343. Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е. Иммунология и иммунопатология детского возраста. – М.: Медицина, 1996. – 384 с.

344. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности нанодисперсного и микродисперсного оксида марганца (III, IV) / Н.В.Зайцева [и др.] // Вопросы питания. – 2012. – № 5. – С. 13–19.

345. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы: в 2 т. – СПб.: Наука, 1999. – 232 с.

346. Уланова И.П., Тиунов Л.А., Архипова О.Г. Токсикология химических веществ, загрязняющих окружающую среду. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1986. – С. 215–251.

347. Уланова Т.С., Нурисламова Т.В. Питьевая вода Пермского края как фактор экспозиции хлорорганических соединений на организм // Чистая вода: сборник материалов межрегион. конгресса. – Пермь, 2009. – С. 115–119.

348. Уланова Т.С., Нурисламова Т.В. Химико-аналитическое обеспечение в диагностике экопатологии // Тезисы конференции «Актуальные проблемы экологической безопасности территорий и населения», Бангкок–Патайя, 20–23 апреля, 2000 г. – М., 2000.

349. Уокер Д. Формальдегид. – М.: Госхимиздат, 1957. – 405 с.

350. Уровни лейкотриенов 4 и 5 серии в лейкоцитах периферической крови у детей, больных бронхиальной астмой различной тяжести / О.Н. Комарова, Н.М. Шилина, Н.Н. Погомий, Т.С. Окунева, Ю.Л. Мизерницкий, И.Я. Конь // Пульмонология детского возраста: проблемы и решения. – М., 2006. – С. 150–155.

351. Усманова А.Р. Гигиеническая характеристика факторов окружающей среды и изменение микроэлементного гомеостаза детей при различных уровнях техногенной нагрузки (на примере Республики Татарстан): автореф. дис. … канд. мед. наук. – Казань, 2010. – 20 с.

352. Утц С.Р. Оценка степени тяжести атопического дерматита с помощью полуколичественных шкал и перспективы использования неинвазивных методов диагностики в дерматологии и аллергологии // Аллергология. – 1998. – № 4. – С. 33–42.

353. Фадеева М.М., Бейкин Я.Б., Сбитнева Н.Н. Лабораторная диагностика аллергических заболеваний методом иммуноферментного анализа // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 172

354. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 4. – С. 578–584.

355. Физиология иммунной системы и экология / В.А. Черешнев, Н.Н. Кеворков, Б.А. Бахметьев [и др.] // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 12–16.

356. Хаитов М.Р. Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 528 с.

357. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: учебник. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.

358. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии // Иммунология. – 2001. – № 4. – С. 4–6.

359. Ханферян Р.А., Котова Н.В. Нейропептидзависимая регуляция синтеза IgE при атопии // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 173.

360. Характеристика генотипов детей и взрослых, проживающих в условиях воздействия химических факторов риска / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, К.Г. Старкова, В.А. Лучникова, Е.А. Пирогова // Анализ риска здоровью. – 2015. – № 1. – С. 55–59.

361. Характеристика лимфоцитарного звена у детей, проживающих на техногенно измененных территориях / Н.В. Зайцева, О.В. Дол-

гих, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина, А.В. Кривцов, А.М. Гугович // Лаборатория. – 2011. – № 1. – С. 10–11.

362. Характеристика регуляторных систем у детей при воздействии химических факторов среды обитания / Д.А. Ланин, Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова // Гигиена и санитария. – 2014. – № 2. – С. 23–26.

363. Характеристика цитокинового статуса в условиях контаминации биосред фенолами / Д.Г. Дианова [и др.] // Сибирская ассоциация консультантов. Заочные научно-практические конференции. – URL: http: //sibac.info/index.php/component/content/article/50-2011-12-21-06-47-43/1554-2012-03-14-19-33-34 (дата обращения: 28.03. 2013).

364. Характеристика цитокинового статуса в условиях контаминации биосред фенолами / Д.Г. Дианова, О.В. Долгих, Т.С. Лыхина, А.В. Кривцов, Р.А. Харахорина, А.М. Гугович // Материалы международной заочной научно-практической конференции (29 февраля 2012 г.). – Новосибирск: Изд-во «Сибирская ассоциация консультантов», 2012. – С. 150–155.

365. Харахорина Р.А., Долгих О.В., Лыхина Т.С. Механизмы развития аллергической реакции у детей в условиях контаминации биосред формальдегидом // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные вопросы организации медицины труда и управления профессиональными рисками». – Екатеринбург, 2011. – С. 204–207.

366. Харахорина Р.А., Долгих О.В., Лыхина Т.С. Роль метаболитов арахидоновой кислоты в развитии сенсибилизации у детей в условиях воздействия экзогенных химических факторов. – 2012. – Т. 2. – С. 305–308 (г. Пермь, 16–18 мая 2012 г.)

367. Харахорина Р.А., Лыхина Т.С. Сравнительная оценка продукции цитокинов в условиях экспозиции фенолом // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2–3. – С. 210.

368. Хацкель С.Б. Аллергология в схемах и таблицах: справочное руководство. – СПб.: СпецЛит, 2000. – 715 с.

369. Хром и его соединения. Серия: Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ / под ред. Н.Ф. Измерова. – М., 1984. – 43 с.

370. Цитокиновый профиль и модуляция апоптоза при термической травме / Т.А. Ушакова [и др.] // Иммунология. – 2007. – № 4. – С. 226–331.

371. Цитокиновый статус аппаратчиков производства активированных углей / О.В. Долгих [и др.] // Гигиенические и медико-профилактические технологии управления рисками здоровью населения в промышленно развитых регионах: материалы научно-практической конференции с международным участием. – 2010. – С. 344–346.

372. Черешнев В.А. Экология, иммунитет, здоровье // Известия Уральского государственного университета. – 2000. – № 16. – С. 79–89.

373. Чернышева Н.В., Рзянкина М.Ф. Анализ внешних причин смертности детей и подростков г. Хабаровска // Дальневосточный медицинский журнал. – 2005. – № 3. – С. 104–106.

374. Чибураев В.И., Ревич Б.А. Химическое загрязнение окружающей среды и здоровье населения в Российском национальном плане действий по гигиене окружающей среды // Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 9–10.

375. Чиркин В.В., Семенков В.Ф., Карандашов В.И. Вторичные иммунодефициты. – М.: Медицина, 1999. – 248 с.

376. Шапошников А.А. Володин А.С. Влияние факторов среды обитания на здоровье подростков в нефтегазодобывающем регионе и обоснование профилактических мероприятий // Военно-медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 19–25.

377. Шварцкопф Е.С., Окушко Р.В. Некоторые особенности показателей иммунного статуса у детей в Приднестровье, страдающих аллергическими заболеваниями // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 3. – С. 93–97.

378. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Гуморальные факторы иммунной системы: учебное пособие. – Пермь: ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава, 2011. – 247 с.

379. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Клетки врожденного иммунитета: учебное пособие. – Пермь: ГОУ ВПО ПГМА им. Ак. Е.А. Вагнера Росздрава, 2011. – 242 с.

380. Шульга А.И. Факторы риска в формировании хронического тонзиллита в условиях промышленного города: дис. … канд. мед. наук. – Оренбург, 2005. – 117 с.

381. Шур П.З. Научно-методические основы управления риском для здоровья населения на территориях с высокой антропогенной нагрузкой: автореф. дис. …д-ра мед. наук. – Пермь, 1999. – 52 с.

382. Экология и аллергопатология детей / Р.Ф. Хакимова [и др.]. – Казань: Дом печати, 2003. – 311 с.

383. Экспериментальное исследование зависимости изменения иммунных и биохимических механизмов поддержания гомеостаза от особенностей и выраженности материальной кумуляции свинца в организме / Ю.И. Кундиев, В.А. Стежка, Н.Н. Дмитруха [и др.] // Мед. труда и пром. экология. – 2001. – № 4. – С. 327–338.

384. Экспрессии внеклеточного маркера апоптоза TNFRI в условиях экспозиции фенолами / Д.Г. Дианова, О.В. Долгих, Р.А. Харахорина, В.А. Копылов, Е.М. Лекомцева // Академический журнал Западной Сибири. – 2011. – № 4–5. – С. 63–64.

385. Экспрессия Fas (CD95) лимфоцитов в реакции апоптоза у больных хроническим панкреатитом / О.Е. Турышева [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 9. – С. 40–44.

386. Экспрессия молекулярных маркеров регуляторных лимфоцитов FoxP3 и TGF-β1 при вирусных инфекциях, аутоиммунных и онкологических заболеваниях / Е.К. Олейник, В.М. Олейник, А.В. Чуров [и др.] // Известия научного Самарского центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11, № 1 (5). – С. 1006–1008.

387. Эюбова А.А., Искендерова В.Ш. О взаимосвязи систем иммунитета с некоторыми показателями гемостаза у детей с бронхиальной астмой (БА) // International journal on immunorehabilitation. – 1999. – № 12. – С. 23.

388. Юмагузин В.В., Винник М.В. Оценка вклада внешних причин смерти в изменение ожидаемой продолжительности жизни в России в 1990–2010 гг. // Электронный научный журнал «Социальные аспекты здоровья населения». – URL: http: //vestnik.mednet.ru/content/view/445/30/lang,ru/ (дата обращения: 14.03.2013).

389. Яковлева Т.В., Баранов А.А. Государственная политика в области охраны здоровья детей: проблемы и задачи // Вопросы современной педиатрии: научн.-практ. журнал союз педиатров России. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 6–11.

390. Якушева М.Ю. Гигиенические проблемы медико-биологической профилактики профессиональных и экологически обусловленных заболеваний: автореф. дис. … д-ра мед. наук. – СПб., 2000. – 43 с.

391. Якушева М.Ю. Экологический риск для здоровья населения от загрязнения атмосферного воздуха // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 236.

392. Ярилин, А.А. Основы иммунологии: учебник. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.

393. 4-chloro-1,2-phenylenediamine induces apoptosis in Mardin-Darby canine kidney cells via activation of caspases / L.C. Onn, C.S. Ching, T.Y. Lian, L.V. Foon, Hee N. Chew, C.S. Moi // Environ. Toxicol. – 2014. – Vol. 29 (6). – P. 655–664.

394. 8-Cl-cAMP affects glioma cell-cycle kinetics and selectively induces apoptosis / O. Grbovic, V. Jovic, S. Ruzdijic, V. Pejanovic, L. Rakic, S. Kanazir // Cancer. Invest. – 2002. – Vol. 20 (7–8). – P. 972–982.

395. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span / M.K. Lehtinen, Z. Yuan, P.R. Boag [et al.] // Cell. – 2006. – Vol. 125. – P. 987–1001.

396. A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes / S.M. Goldberg, J. Johnson, D. Busam, T. Feldblyum, S. Ferriera, R. Friedman, A. Halpern, H. Khouri, S.A. Kravitz, F.M. Lauro, K. Li, Y.H. Rogers, R. Strausberg, G. Sutton, L. Tallon, T. Thomas, E. Venter, M. Frazier, J.C. Venter // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – Vol. 103. – P. 11240–11245.

397. A twelve-year clinical and immunologic evaluation of workers involved in the manufacture of trimellitic anhydride (TMA) / C.R. Zeiss [et al.] // Allergy Proc. – 1990. – Vol. 11. – P. 71.

398. Aiyar J., Bercovits H.J., Floyd R.A. Reaction of chromium with gluta-tione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium-induced DNA-damage // Env. Health Perspect. – 1991. – Vol. 92. – P. 53–62.

399. Alloway B.J., Ayres D.C. Chemical Principles of Environmental Pollution. – Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994. – 291 p.

400. Ambroise D. Cancer mortality among municipal pest-control workers // Int Arch Occup Environ Health. – 2005. – № 78 (5). – P. 387–393.

401. American Academy of Allergy. Position statement: skin testing and radioallergosorbent testing (RAST) for diagnosis of specific allergens responsible for IgE-medialed diseases // Ibid. – 1983. – Vol. 72. – P. 515.

402. American Academy of Allergy. Position statements: controversial techniques // J. Allergy. Clin. Immunol. – 1981. – Vol. 67. – P. 333.

403. American College of Physicians. Clinical ecology // Ann. Intern. Med. – 1989. – Vol. 111. – P. 168.

404. An Outbreak of High Fever and Chills Increased Blood Pressure and Pruritus Among a Hemodialysis Iranian / F. Wantke, C.M. Demmer, P. Tappler, M. Götz // Journal of Kidney Diseases. – 2008. – Vol. 2, № 3.

405. Angiotensin II-induced egr-1 expression is suppressed by peroxisome proliferator- activated receptor-γ ligand 15d-PGJ2 in macrophages / Y. Meng, C. Chen, C. Tian, J. Du, H.-H. Li // Cell Physiol Biochem. – 2015. – Vol. 35. – P. 689–698.

406. Anti-inflammatory effect of Taraxacum officinale leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells / Y.J. Koh, D.S. Cha, J.S. Ko, H.J. Park, H.D. Choi // J. Med. Food. – 2010. – Vol. 13 (4). – P. 870–878.

407. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy / J.F.R. Kerr, C.M. Winterford, B.V. Harmon // Cancer. – 1994. – Vol. 73. – P. 2013–2026.

408. Ashford N.A., Miller C.S. Chemical Exposures. – N.Y.: Van Nostrand Reinhold, 1991.

409. Assessment of immunotoxic effects in humans / J. Descotes [et. al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, № 12. – P. 1870–1873.

410. Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes / R. Nlilsson [et al.] // Br. J. Ind. Med. – 1993. – Vol. 50. – P. 65.

411. Atopic Diseases, allergic sensitization and exposure to traffic-related air pollution in children / V. Morgenstern [et. al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2008. – Vol. 177. – P. 1331–1337.

412. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils / R.W. Watson, O.D. Rotstein, M. Jimenez, J. Parodo, J.C. Marshall // Blood. – 1997. – Vol. 89. – P. 4175–4181.

413. Avoiding formaldehyde allergic reactions in children, aspartame, vitamins, shampoo, conditioners, hair gel, baby wipes / E. Sharon, M.D. Jacob, Tace Steele, U. Miami // Pediatric Annals. – 2007. – URL: http: //rmforall.blogspot.com/2008_03_01_archive.htm (дата обращения: 14.03.2013).

414. Balendiran G.K., Dabur R., Fraser D. The role of glutathione in cancer // Cell Biochem Funct. – 2004. – № 22. – P. 343–352.

415. Barinaga M. Apoptosis: death by dozens of cuts. Science. – 1998. – Vol. 280. – P. 32–34.

416. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus / D.W. Voehringer, D.J. McConkey, T.J. McDonnell, S. Brisbay, R.E. Meyn // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95. – P. 2956–2960.

417. Bearer C. F. Biomarkers in pediatric environmental health: a cross-cutting issue // Environ Health Perspect. – 1998. – Vol. 106, suppl 3. – P. 813–816.

418. Bellomo G., Palladin G., Vairetti M. Intranuclear distribution, function and fate of glutathione and glutathione-S-conjugate in living rat hepatocytes studied by fluorescence microscopy // Microscopy Research and Technique. – 1997. – № 36. – P. 243–252.

419. Berstein I.L. Proceedings of the Task Force on Guidelines for Standardizing Old and New Technologies Used for the Diagnosis and Treatment of Allergic Diseases // Ibid. – 1988. – Vol. 82. – P. 487.

420. Bhupinder S. Matrix metalloproteinases – an overview // Research and Repost in Biology. – 2010. – Vol. 1. – P. 1–20.

421. Bjorksten B. The environmental influence on childhood asthma // Allergy. – 1999. – Vol. 54, suppl. 49. – P. 17–23.

422. Blanc P. Occupational asthma in a national disability survey // Chest. – 1987. – Vol. 92. – P. 613.

423. Blossom S.J., Gilbert K.M. Exposure to a metabolite of the environmental toxicant, trichloroethylene, attenuates CD4+ T cell activation-induced cell death by metalloproteinase – dependent FASL shedding // Toxicol Sci. – 2006. – № 92 (1). – P. 103–14.

424. Bosetti C. Occupational exposure to polychlorinated biphenyls and cancer risk // Eur. J. Cancer. Prev. – 2003. – Vol. 12 (4). – P. 251–255.

425. Bosetti C. Pesticide exposure and lymphohaematopoietic cancers: a case-control study in an agricultural region (Larissa, Thessaly, Greece) // BMC. Public. Health. – 2011. – № 11. – P. 5.

426. Brandt H.C., Watson W.P. Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds // Ann. Occup. Hyg. – 2003. – № 47 (5). – P. 349–78.

427. Bush R.K., Kagen S.L. Guidelines for the preparation and characterization of high molecular weight allergens used for the diagnosis of occupational lung disease // J. Allergy Clin. Immunol. – 1989. – Vol. 84. – P. 814.

428. Calabrese E.J., Kenyon E.M. Air Toxics and Risk Assessment. – Lewis Publishers, Chelsea: MI, 1991.

429. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate / O. Fromigué, E. Haÿ, A. Barbara, C. Petrel, E. Traiffort, M. Ruat, P.J. Marie // J. Cell. Mol. Med. – 2009. – № 13 (8B). – P. 2189–2199.

430. Casillas Adrian M., Net Andre E. An update on the immunopathogenesis of asthma as an inflammatory disease enhanced by environmental pollutants // Allergy and asthma proc. – 1997. – Vol. 18, № 4. – P. 227–233.

431. CD95-Mediated murine hepatic apoptosis requires an intact glutathione status / H. Hentze, G. Kunstle, C. Volbracht, W. Ertel, A. Wendel // Hepatology. – 1999. – Vol. 30. – P. 177–185.

432. Chemical pollution, respiratory allergy and asthma: a perspective / G.S. Evans [et. al.] // Journal of applied toxicology. – 2008. – Vol. 28, № 1. – P. 1–5.

433. Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment / P.J. Landrigan [et. al.] // Environ Health Perspect. – 2004. – Vol. 112 (2). – P. 257–265.

434. Circu M.L., Aw T.Y. Glutathione and apoptosis // Free. Radic. Res. – 2008. – Vol. 42 (8). – P. 689–706.

435. Clin. Immunol. – 1992. – Vol. 2. – P. 167.

436. Clinical aspects of allergic disease: occupational asthma in a technolog exposed to glutaraldehyde / M. Chan-Yeung [et al.] // Ibid. – 1993. – Vol. 91. – P. 974.

437. Clinical efficiency of in vitro and in vivo tests for allergic diseases / M. Plebani [et al.] // Ibid. – 1994. – Vol. 74. – P. 21.

438. Coles B.F., Kadlubar F.F. Human alpha class glutathione Stransferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease // Methods in Enzymol. – 2005. – Vol. 401. – P. 9–42.

439. Comparison of skin tesling and three in vitro assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensilivily / P.B. Williams [et al.] // Ibid. – 1992. – Vol. 68. – P. 35.

440. Conour J.E., Graham W.V., Gaskins H.R. A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression // Physiol. Genomics. – 2004. – Vol. 18 (2). – P. 196–205.

441. Correlative study of serum Th1/Th2 cytokines levels in patiens with systemic lupus erythematosus with SLEDAI / El-Sayed [et. al.] // Egyptian Dermatology Online Journal. – 2008. – Vol. 4, № 1.

442. Corsini E., Kimber I. Factors governing susceptibility to chemical allergy // Toxicology letters. – 2007. – Vol. 168, № 3. – P. 255–259.

443. Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia / J.M. Lluis, A. Morales, C. Blasco, A. Colell, M. Mari, C. GarciaRuiz, J.C. Fernandez-Checa // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 3224–3232.

444. Cross J.V., Templeton D.J. Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathiony lation in the ATP-binding domain // Biochem. J. – 2004. – Vol. 381. – P. 675–683.

445. Cuenca P., Ramirez V. Environmental mutagenesis and use of biomarkers in cancer risk prediction // Rev. Biol. Trop. – 2004. – Vol. 52 (3). – P. 585–590.

446. Curiel T.J. Regulatory T cells and treatment of cancer // Curr. Opin. Immunol. – 2008. – Vol. 20, № 2. – P. 241–246.

447. Cytokine gene polymorphism in human disease on-line databases/ J.Bidwell, L. Keen, G. Gallagher [et al.] // Genes and Immunity. – 1999. – № 1. – P. 3–19.

448. Cytokine profiles in human exposure to metals / Klein R. [et. al.] // Pure Appl. Chem. – 2006. – Vol. 78, № 11. – P. 2155–2168.

449. Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate / C.S. Newby [et. al.] // Journal of Investigative Dermatology. – 2000. – Vol. 115. – P. 292–298.

450. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies / P. Duramad [et al.] // Toxicol. Lett. – 2007. – Vol. 172 (1–2). – P. 48–59.

451. Cytokines, allergy, and asthma / L.P. Ngoc [et. al.] // Curr. Opin. Allergy Clin immunology. – 2005. – № 5. – P. 161–166.

452. Dacou-Voutetakis C. Environmental factors and nosology of the endocrine system // Hormones. – 2010. – № 9 (1). – P. 7–8.

453. Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice / H. Hentze, F. Gantner, S.A. Kolb, A. Wende // Am. J. Pathology. – 2000. – Vol. 156 (6). – P. 2045–2056.

454. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence // Toxicology in Vitro. – 1994. – Vol. 8, № 5. – P. 963–966.

455. Development of a research strategy for integrated technology-based toxicological and chemical evaluation of complex mixtures of drinking water disinfection byproducts / J.E. Simmons [et al.] // Environ. Health. Perspect. – 2002. – Vol. 110, suppl. 6. – P. 1013–1024.

456. Dewhurst F., Arkhipova M.B. Setting effective regulatory standards // Материалы межд. симп. «Здоровье и химическая безопасность на пороге XXI века» / под ред. М.И. Михеева. – СПб., 2000. – С. 14–15.

457. Diagnostic performance characteristics of the standard Phadebas RAST, me fied RAST, and Pharmacia CAP system versus skin testing / J.M. Kelso [et al.] // Ann. Allergy. – 1991. – Vol. 67. – P. 511.

458. Dickey L.D. Clinical Ecology. – Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1976.

459. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D. Cytokine profile in industrial workers // In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drub Research: Abstracts of the 4 th international congress of molecular medicine (Istanbul, Turkey, 27–30 June, 2011). – 2011. – Vol. 25. – № 3. – P. 523.

460. Dröge W., Breitkreutz R. Glutathione and immune function // Proc. Nutr. Soc. – 2000. – Vol. 59 (4). – P. 595–600.

461. Edinger A.L., Thompson C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy // Curr. Opin. Cell Biol. – 2004. – № 6. – P. 663–669.

462. Effect of chloroform on dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced hypomethylation and expression of the c-myc gene and on their promotion of liver and kidney tumors in mice / M.A. Pereira, P.M. Kramer, P.B. Conran, L. Tao // Carcinogenesis. – 2001. – Vol. 22 (9). – P. 1511–1519.

463. Effects of benzo[a]pyrene, 2-bromopropane, phenol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on proinflammatory cytokines gene expression by mice spleen cells / K. Ho-Jun [et. al.] // Journal of veterinary science – 2002. – Vol. 3, № 4. – P. 247–254.

464. Effects of benzo[a]pyrene, 2-bromopropane, phenol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on IL-6 production in mice after single or repeated exposure / H.J. Kim [et. al.] // In vivo. – 2003. – Vol. 17, № 3. – P. 269–275.

465. Effects of resveratrol on human immune cell function / R. Falchetti [et. al.] // Life Sci. – 2001. – Vol. 70, № 1. – P. 81–96.

466. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release / P. Boscolo [et. al.] // Annals of Clinical and Laboratory Science. – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 226–230.

467. Ekshyyan O., Aw T.Y. Decreased susceptibility of differentiated pc12 cells to oxidative challenge: Relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1 // Cell. Death. Differ. – 2005. – Vol. 12. – P. 1066–1077.

468. Ekström T.J., Högberg J. Chloroform-induced glutathione depletion and toxicity in freshly isolated hepatocytes // Biochem. Pharmacol. – 1980. – Vol. 29 (22). – P. 3059–3065.

469. Electrostatic association of glutathione transferase to the nuclear membrane. Evidence of an enzyme defense barrier at the nuclear envelope / L. Stella, V. Pallottini, S. Moreno [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 6372–6379.

470. Enhancing effect of chlorinated organic solvents on histamine release and inflammatory mediator production / Макото Сео, Коджи Икеда, Tetsunori Окамура // Токсикология. – 2007. – Т. 243 (14). – С. 75–83.

471. Environment and T regulatory cells in allergy / M. Braga [et. al.] // Science of The Total Environment. – 2012. – Vol. 423. – P. 193–201.

472. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005–2007 / R.W. Clapp [et. al.] // Reviews on environmental health. – 2008. – Vol. 23 (1). – P. 1–37.

473. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma / G. D'Amato [et. al.] // Clin. Exp. Allergy. – 2005. – Vol. 35 (9). – P. 1113–1124.

474. Ethier C., Davoine F. A gap in cell death knowledge: is necroptosis of eosinophils involved in allergic airway inflammation? // OA Inflammation. – 2013. – № 1 (1). – P. 9.

475. Fadeel B., Orrenius S., Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases // Leukemia. – 2000. – Vol. 14. – P. 1514–152.

476. Fiers W., Beyaert R., Declercq W. More than one way to die: Apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage // Vandenabeele Oncogene. – 1999. – № 18. – P. 7719–7730.

477. Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.R. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway // FASEB J. – 2003. – Vol. 17 (1). – P. 64–66.

478. Finney O.C., Riley E.M., Walther M. Phenotypic analysis of human peripheral blood regulatory T cells (CD4 + FOXP3 + CD127 lo/–) ex vivo and after in vitro restimulation with malaria antigens // European Journal of Immunol. – 2010. – Vol. 40, iss. 1. – P. 47–60.

479. Flanagan R.J. Guidelines for the interpretation of analytical toxicology results and unit or measurement conversion factors // Annals of Clinical Biochemestry. – 1998. – Vol. 35. – P. 261–267.

480. Forman H.J., Davies J.A., Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and parahormesis versus free radical scavenging in vivo // Free. Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol. 66. – P. 24–35.

481. Fowler B.A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – Vol. 238 (3). – P. 294–300.

482. Friesen C., Kiess Y., Debatin K.M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells // Cell. Death. Differ. – 2004. – Vol. 11, suppl. 1. – P. 73–85.

483. Fu D., Jennifer J. Jordan, Samson L.D. Human ALKBH7 is required for alkylation and oxidation-induced programmed necrosis // Genes Dev. – 2013. – № 27. – P. 1640–1649.

484. GeneCard for gene TNF [Электронное издание]. – URL: http: //bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp&TNF (дата обращения: 15.05.2014).

485. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by upregulating glutathione and Bcl-2 levels / W.K. Chang, K.D. Yang, H. Chuang, J.T. Jan, M.F. Shaio // Clin. Immunol. – 2002. – Vol. 104 (2). – P. 151–60.

486. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria / A.K. Zimmermann, F.A. Loucks, E.K. Schroeder, R.J. Bouchard, K.L. Tyler, D.A. Linseman // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 29296–29304.

487. Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex / H. Hentze, I. Schmitz, M. Latta, A. Krueger, P.H. Krammer, A. Wendel // Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277 (7). – P. 5588–5595.

488. Glutathione in cerebral microvascular endothelial biology and pathobiology: implications for brain homeostasis / W. Li, C. Busu, M.L. Circu, T.Y. Aw // Int J. Cell. Biol. – 2012. – Vol. 14. – ArticleID 434971. – URL: http: //dx.doi.org/10.1155/2012/434971 (accessed: 07.07.2015).

489. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation / J. Markovic, C. Borras, A. Ortega, J. Sastre, J. Vina, F.V. Pallardo // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 20416–20424.

490. Glutathione mediated detoxification of halobenzoquinone drinking water disinfection byproducts in T24 cells / J. Li, W. Wang, H. Zhang, X.C. Le, X.-F. Li // Toxicol. Sci. – 2014. – Vol. 141 (2). – P. 335–343.

491. Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria / H. Liang, Q. Ran, Y.C. Jang [et al.] // Free. Radical. Biol. Med. – 2009. – Vol. 47. – P. 312–320.

492. Glutathione peroxidase 4 has amajor role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells / P. Cole-Ezea, D. Swan, D. Shanley, J. Hesketh // Free. Radical. Biol. Med. – 2012. – Vol. 53. – P. 488–497.

493. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production / D. Shen, T.P. Dalton, D.W. Nebert, H.G. Shertzer // JBC. – 2005. – Vol. 280. – P. 25305–312.

494. Glutathione-S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease / T. Ishii, T. Matsuse, S. Teramoto [et al.] // Thorax. – 1999. – Vol. 54. – P. 693–696.

495. Goldman L.R., Koduru S. Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: a public health and policy perspective // Environ Health Perspect. – 2000. – Vol. 108, suppl. 3. – P. 443–448.

496. Greenlee K.J., Werb Z., Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung multiple, multifarious, and multifaceted // Physiol. Rev.– 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 69–98.

497. Hall A.G. Glutathione role in regulation of apoptosis // EJCI. – 1999. – Vol. 29. – P. 238–245.

498. Hamada T., Sasaguri T., Tanimoto A. Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein // Biophysical Research Communications. – 1996. – Vol. 219, № 3. – P. 829–834.

499. Hampton M.B., Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 414. – P. 552–556.

500. Health effects from swimming training in chlorinated pools and the corresponding metabolic stress pathways / J.-H. Li, Z.-H. Wang, X.-J. Zhu [et al.] // PLoS One. – 2015. – № 10 (3). – P. e0119241. doi: 10.1371/journal.pone. 0119241.

501. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate / L. Järup [et. al.] // Scand. J. Work Environ. Health. – 1998. – Vol. 24, suppl 1. – P. 1–51.

502. Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers / J. Beard [et. al.] // Environ Health Perspect. – 2003. – Vol. 111 (5). – P. 724–730.

503. Heck H., Casanova M., Starr T.B. Formaldehyde toxicity-new understanding // Crit. Rev. Toxicol. – 1990. – Vol. 20. – P. 397–426.

504. Ho Y.F., Guenthner T.M. Uptake and biosynthesis of glutathione by isolated hepatic nuclei // Toxicologist. – 1994. – Vol. 14. – P. 178.

505. HOCl-modified phosphatidylcholines induce apoptosis and redox imbalance in HUVEC-ST cells / A. Robaszkiewicz, G. Bartosz, A.R. Pitt, A. Thakker, R.A. Armstrong, C.M. Spickett, M. Soszyński // Arch. Biochem. Biophys. – 2014. – Vol. 15 (548). – P. 1–10.

506. Human purified protein derivative-specific CD4+ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms / D.M. Lewinsohn [et. al.] // Journal of Immunology. – 1998. – Vol. 1, № 160 (5). – P. 2374–2379.

507. Identification of immunotoxic effects of chemicals and assessment of their relevance to man / D. Trizio [et. al.] // Food. Chem. Toxicol. – 1988. – Vol. 26 (6). – P. 527–539.

508. Ikeda H., Nishi S., Sakai M. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis // Biochem. J. – 2004. – Vol. 380. – 515–521.

509. Immunological alterations in sera of persons living in areas with different air pollution / W. Hadnagy [et. al.] // Toxicol Lett. – 1996. – Vol. 88 (1–3). – P. 147–153.

510. Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of T-cells and NK-cells / P. Moszczyński [et. al.] // Analyst. – 1998. – Vol. 123 (1). – P. 99–103.

511. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production / X. Gao [et. al.] // Biochem Pharmacol. – 2001. – Vol. 62 (9). – P. 1299–1308.

512. Immunotoxicology and its application in risk assessment / A.A. Rooney [et. al.] // EXS. – 2012. – Vol. 101. – P. 251–287.

513. In vitro diagnosis of atopic allergy. 1. A comparison between provocation tests and the RAST test / T. Berg [et al.] // Int. Arch. Allergy. – 1971. – Vol. 40. – P. 770.

514. In vitro study on apoptosis induced by strontium-89 in human breast carcinoma cell line / C. Wang, J. Wang, H. Jiang, M. Zhu, B. Chen, W. Bao / J. Biomed Biotechnol. – 2011. – Jun 9; doi: 10.1155/2011/541487.

515. Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation / Z. Huang, J.T. Pinto, H. Deng, J.P.Jr. Richie // Biochem Pharmacol. – 2008. – Vol. 75 (11). – P. 2234–2244.

516. Josephy P.D. Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Signifi-cance for Pharmacology and Toxicology // Hum. Genomics Proteomics. – 2010. – №. 2. – P. 1–14.

517. Kasakura S. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases // Rinsho. Byori. – 1998. – Vol. 46 (9). – P. 915–921.

518. Kevorkov N.N., Dolgikh O.V. Diagnostics of specific sensibilization to low-molecular compounds (by the example of formaldehyde) // Rashes Journal of Immunology. – 2002. – Vol. 7, № 3. – P. 268–270.

519. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease // Alternative Medicine Review. – 2003. – Vol. 8, № 3. – P. 223–246.

520. Kim B.J., Hong S.J. Ambient air pollution and allergic diseases in children // Korean. J. Pediatr. – 2012. – Vol. 55 (6). – P. 185–192.

521. Kim E.H., Surh Y.J. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors // Biochem Pharmacol. – 2006. – Vol. 72. – P. 1516–1528.

522. Kretz-Remy C., Arrigo A.P. Gene expression and thiol redox state // Methods Enzymol. – 2002. – Vol. 348. – P. 200–215.

523. Landrigan P.J. Risk assessment for children and other sensitive populations // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1999. – № 895. – P. 1–9.

524. Linking stress-signaling, glutathione metabolism, signaling pathways and xenobiotic transporters / S. Yadav, E. Zajac, S.S. Singhal, S. Awasthi // Cancer Metastasis Rev. – 2007. – Vol. 26. – P. 59–69.

525. Lymphocyte subpopulations in human exposure to metals / M. Schwenk [et. al.] // Pure Appl. Chem. – 2008. – Vol. 80, № 6. – P. 1349–1364.

526. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2013. – Vol. 53. – P. 401–426.

527. Ma Q., Kinner K. Chemoprotection by phenolic antioxidants // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, № 4. – P. 2477–2484.

528. Madani Y., Barlow A., Taher F. Severe asthma with fungal sensitization: a case report and review of literature // J. Asthma. – 2010. – Vol. 47. – № 1. – P. 2–6.

529. Mechanisms underlying Children's susceptibility to environmental toxicants / E.M. Faustman [et. al.] // Environ Health Perspect. – 2000. – Vol. 108, suppl. 1. – P. 13–21.

530. Miles E.A., Zoubouli P. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production // Clinical Nutrition. – 2005. – Vol. 24 (5). – P. 780–784.

531. Mitochondrial glutathione: importance and transport / J.C. Fernandez-Checa, N. Kaplowitz, C. Garcia-Ruiz, A. Colell // Semin Liver Dis. – 1998. – Vol. 18. – P. 389–401.

532. Molecular markers of apoptosis in industrial workers / O. Dolgikh, N. Zaitseva, D. Dianova, A. Krivtsov // In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drub Research: Abstracts of the 4 th international congress of molecular medicine (Istanbul, Turkey, 27–30 June, 2011). – 2011. – Vol. 25. – № 3. – P. 523–524.

533. Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: an update / L.E. Pinkerton [et. al.] // Occup. Environ. Med. – 2004. – Vol. 61 (3). – P. 193–200.

534. Multidisciplinary, Iterative Examination of the Mechanism of Formaldehyde Carcinogenicity: The Basis for Better Risk Assessment / Rory B. Conolly, Dragana A. Anjelkovich, Mercedes Casanova, Henry d'A. Heck, Derek B. Janszen, Julia S. Kimbell, Kevin T. Morgan, Leslie Recio // Chemical. Industry. Institute of Toxicology. – 1995. – Vol. 15, № 12.

535. Murugan Anandhi, Prys-Picard Curig, William J. Calhoun // Current Opinion in Pulmonary Medicine. – 2009. – Vol. 15 (1). – P. 12–18.

536. Nakajima H., Takatsu K. Role of Cytokines in Allergic Airway Inflammation // Int. Arch. Allergy. Immunol. – 2007. – Vol. 142, № 4. – P. 265–273.

537. Neighbour P.A., Huberman H.S. Sr++-induced inhibition of human natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity // J. Immunol. – 1982. – Vol. 128. – P. 1236.

538. Nezabudkin S.N, Antonova T.I., Kartashova N.K. Allergy tests in diagnostics and prognosis of treatment efficiency // Annual Congress of the European Respiratory Society, Sept. 20–24. – Berlin, Germany. – 1997. – Ref. 431.

539. Nezabudkin S.N, Antonova T.I., Kartashova N.K. Epidemiology of allergologic diseases their rehobilitation among infants and juvenils of indastry district in St-Petersburg // Annual Congress of the European Respiratory Society, October 9–13, Madrid, Netherlands. – 1999. – Ref 120.

540. Nezabudkin S.N, Antonova T.I., Kartashova N.K. Immunological tests and endonasal provoked tests in diagnosis prognosis of treatment efficacy respiratory allergy // Annual Congress of the European Respiratory Society, Sept. 19–23, Geneva, Switzerland, 1998. – Ref 1059.

541. Nicolai T. Pollution, environmental factors and childhood respiratory allergic disease // Toxicology. – 2002. – Vol. 181–182. – P. 317–321.

542. Nilsson N., Ingvarsson S., Borrebaeck C.A.K. Immature B cells in bone marrow express Fas/FasL // Scand. J. Immunol. – 2000. – № 51. – P. 279–284.

543. Norman P. RAST // Advances in the Diagnosis of Allergy / Ed. R. Evans. – Miami: Symposia Specialists, 1970. – P. 45.

544. Nuclear glutathione / J.L. Garcia-Gimenez, J. Markovic, F. Dasi, G. Queval, D. Schnaubelt, C.H. Foyer, F.V. Pallardo // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1830. – P. 3304–3316.

545. O'Byrne P.M., Israel E., Drazen J.M. Antileukotrienes in the treatment of asthma // Ann. Intern. Med. – 1997. – Vol. 127. – P. 472–480.

546. Occupational asthma and the chemical properties of low molecular weight organic substances / R.M. Aguis [et al.] // Occup. Med. – 1994. – Vol. 44. – P. 34.

547. Occupational exposures and risks of liver cancer among Shanghai female textile workers--a case-cohort study / C.K. Chang [et. al.] // International Journal of Epidemiology. – 2006. – Vol. 35 (2). – P. 361–369.

548. Original article. Relationship between chemical structure and the occupational asthma hazard of low molecular weight organic compounds / J. Jarvis, M.J. Seed, R.A. Elton, L. Sawyer, R.M. Agius // Occup. Environ. Med. – 2005. – Vol. 62. – P. 243–250. doi: 10.1136/oem. 2004.016402

549. Original Research Article Bour-Jr Wang, Hamm-Ming Sheu, Yue-Liang Guo, Yu-Hsuan Lee, Ching-Shu Lai, Min-Hsiung Pan, Ying-Jan Wang // Toxicology. Letters. – 2010. – P. 216–224.

550. Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. Glutathione in cancer cell death // Cancers (Basel). – 2011. – Vol. 3 (1). – P. 1285–1310.

551. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells / A. Morales, M. Miranda, A. Sanchez-Reyes, A. Biete, J.C. Fernandez-Checa // J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1998. – Vol. 42. – P. 191–203.

552. Persoz C., Achard S., Leleu C. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells // Toxicology letters. – 2010. – Vol. 195, № 2–3. – P. 99–105.

553. Platts-Mills Thomas A.E. Asthma among Inner City children // Pediat. Pulmonol. – 1997. – Vol. 24, № 4. – P. 231–233.

554. Protective effects of Orostachys japonicus A. Berger (Crassulaceae) on H2O2-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line / Y. Yoon, K.-S. Kim, S.-G. Hong, B.-J. Kang, M.-Y. Lee // J. Ethnopharmacol. – 2000. – Vol. 69 (1). – P. 73–78.

555. Public drinking water contamination and birth outcomes / F.J. Bove, M.C. Fulcomer, J.B. Klotz, J. Esmart, E.M. Dufficy // Am. J. Epidemio. – 1995. – № 141 (9) 6. – P. 850–862.

556. Randomized controlled trial of oral glutathione supplementation on body stores of glutathione / J.P.Jr. Richie, S. Nichenametla, W. Neidig, A. Calcagnotto, J.S. Haley, T.D. Schell, J.E. Muscat // Eur. J. Nutr. – 2015. – Vol. 54 (2). – P. 251–263.

557. Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exacerbation of COPD / M.W. Plets, M. Ioanas, A. de Roux [et al.] // Eur. Respir. J. – 2004. – Vol. 23, suppl. 4. – P. 532–537.

558. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture / L. Musallam, C. Ethier, P.S. Haddad, F. Denizeau, M. Bilodeau // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2002. – Vol. 283 (3). – P. G709-718.

559. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human b lymphoma cell line / J.S. Armstrong, K.K. Steinauer, B. Hornung [et al.] // Cell. Death. Differ. – 2002. – № 9. – P. 252–263.

560. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance / N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2013. – Vol. 10. – Article ID 972913. 10. – URL: http: //dx.doi.org/10.1155/2013/972913 (accessed 06.06.2015).

561. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma / S.S. Deo [et. al.] // Lung. India. – 2010. – Vol. 27. – P. 66–71.

562. Romagnani S. Type 1 T helper and 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease // Int. J. Clin. Lab. – 1991. – № 21. – P. 152–158.

563. Salnikow K., Zhitkovich A. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – Vol. 21. – P. 28–44.

564. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free. Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30. – P. 1191–1212.

565. Schwartz J. Air pollution and children's health // Pediatrics. – 2004. – Vol. 113, suppl. 4. – P. 1037–1043.

566. Selective protection of nuclear thioredoxin-1 and glutathione redox systems against oxidation during glucose and glutamine deficiency in human colonic epithelial cells / Y.-M. Go, T.Z. Ziegler, J.M. Johnson, Li Gu, J.M. Hansen, D.P. Joned // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 42. – P. 363–370.

567. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA / J.P. Noonan, G. Coop, S. Kudaravalli, D. Smith, J. Krause, J. Alessi, F. Chen, D. Platt, S. Pääbo, J.K. Pritchard, E.M. Rubin // Science. – 2006. – Vol. 314. – P. 1113–1118.

568. Serum IgE and IgG to formaldehyde-human serum albumin: lack of relan to gaseous formaldehyde exposure and symptoms / M.S. Dykewicz [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 1991. –Vol. 87. – P. 48.

569. Shah D., Sah S., Nath S.K. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus // Autoimmun. Rev. – 2013. – Vol. 12 (7). – P. 741–751.

570. Shambaugh George E. Clinical-ecology approach to asthma // Lancet. – 1998. – Vol. 351, № 9101. – P. 529–530.

571. Snedeker S.M. Chemical exposures in the workplace: effect on breast cancer risk among women // AAOHN Journal. – 2006. – Vol. 54 (6). – P. 270–279.

572. SNP-особенности у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, Я.И. Вайсман // Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т. 19, № 4. – С. 1185–1188.

573. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells / M. Kleinewietfeld [et. al.] // Nature. – 2013. – Vol. 10. – P. 1038.

574. State of cell regulation in children exposed to phenols / O.V. Dolgikh, R.A. Kharakhorina, D.G. Dianova, A.M. Gugovich // Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies». – St. Louis, USA, Publishing House «Science & Innovation Center», 2013. – P. 149–152.

575. Sykes M.C., Mowbray A.L., Jo H. Reversible glutathiolation of caspase-3 by glutaredoxin as a novel redox signaling mechanism in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death // Circ. Res. – 2007. – Vol. 100. – P. 152–154.

576. Synthesis and structure elucidation of estrogen quinones conjugated with cysteine, N-acetylcysteine, and glutathione / K. Cao, D.E. Stack, R. Ramanathan, M.L. Gross, E.G. Rogan, E.L. Cavalieri // Chem. Res. Toxicol. – 1998. – Vol. 11. – P. 908–916.

577. Takizawa H. Impact of air pollution on allergic diseases // Korean J. Intern. Med. – 2011. – Vol. 26 (3). – P. 262–273.

578. Templeton D.M. Mechanisms of immunosensitization to metals // Pure and Applied Chemistry. – 2004. – № 76. – P. 1255–1268.

579. Tew K.D. Redox in redux: emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation // Biochem Pharmacol. – 2007. – Vol. 73. – P. 1257–1269.

580. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways / A.S. Hurtel-Lemaire, R. Mentaverri, A. Caudrillier, F. Cournarie,

A. Wattel, S. Kamel, E.F. Terwilliger, E.M. Brown, M. Brazier // J. Biol. Chem. – 2009. – № 284 (1). – P. 575–84.

581. The potential impacts of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States / S.M. Bernard [et al.] // Environ. Health. Perspect. – 2001. – Vol. 109, suppl. 2. – P. 199–209.

582. Thioredoxin 1 as a subcellular biomarker of redox imbalance in human prostate cancer progression / W. Shan, W. Zhong, R. Zhao, T.D. Oberley // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol. 15, № 49 (12). – P. 2078–2087.

583. Thiosemicarbazone p-substituted acetophenone derivatives promote the loss of mitochondrial, GSH depletion, and death in K562 cells / F.S. Pessoto, C.H. Yokomizo, T. Prieto [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2015. – Vol. 15. – Article ID 394367. – URL: http: //dx.doi.org/10.1155/2015/394367 (accessed 16.05.2015).

584. Tilson N.A. Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs // Environmental Health Perspect. – 1998. – Vol. 106, suppl. 3. – P. 807–811.

585. Tin Win D. Chemical allergies / Chemical sensitivities // AU J. T. – 2009. – Vol. 12 (4). – P. 245–250.

586. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2003. – Vol. 57. – P. 145–155.

587. Toxicological profile for chloroform. U.S. department of health and human services public health service // Agency for toxic substances and disease registry. – 1997. – № 320.

588. Urinary methanol and formic acid as indicators of occupational exposure to methyl formate / M. Berode, T. Sethre, T. Laubli, H. Savolainen // Int. Arch. Occup. Environ. Heaith. – 2000. – Vol. 73 (6). – P. 410–414.

589. Usatyuk P.V., Parinandi N.L., Natarajan V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 35554–35566.

590. Watson W.P., Mutti A. Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects // Biomarkers. – 2004. – Vol. 9 (3). – P. 211–242.

591. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa / P.G. Gervasi, V. Longo, F. Naldi, G. Panattoni, F. Ursino // Biochem. Pharmacol. – 1991. – Vol. 41. – P. 177–184.

592. Yunginger J.W., Gleich G.J. The impact of the discovery of IgE on the practice of allergy Pediatr // Clin. North. Am. – 1975. – Vol. 22. – P. 3.

593. Zaitseva N.V., Dianova D.G., Dolgykh O.V. Effects of cellular immunity in conditions of surplus supply of strontium with consumed water // European journal of natural history. – 2014. – № 1. – C. 7–8.

594. Zhao G., Wang X. Advance in antitumor agents targeting glutathione-S-transferase // Curr. Med. Chem. – 2006. – Vol. 13. – P. 1461–1471.

595. Zhu B.T., Conney A.H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives // Carcinogenesis. – 1998. – Vol. 19. – P. 1–27.

ТЕЗАУРУС

ТХФ – техногенный химический фактор.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды.

DEF – дефензин.

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа.

CD – кластеры дифференцировки лимфоцитов.

кДНК – комплементарная ДНК.

мРНК – матричная (информационная) РНК.

ПДК – предельно допустимая концентрация.

BMC (Benchmark concentration) – реперная (пороговая) концентрация.

bcl-2 (apoptosis regulator bcl-2) – внутриклеточный белковый фактор, основной представитель семейства BCL-2.

CD (cluster differentiation) – кластер дифференцировки для идентификации поверхностных мембранных белков лейкоцитов.

IL (interleukin) – группа гормоноподобных белков и пептидов – синтезируются и секретируются клетками иммунной системы и другими типами клеток.

THFRI (tumor necrosis factor receptor I) – рецептор 1-го фактора некроза опухоли, рецепторы смерти принадлежат суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей.

p53 (белок p53) – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл.

$AnV^+/7ADD^-$ (Annexin V-$FITC^+7ADD^-$) – клетки, вступившие в стадию апоптоза в аннексиновом тесте (аннексиновая метка).

IgE – иммуноглобулин E.

IgG – иммуноглобулин G.

IL-6 – интерлейкин 6.

IL-10 – интерлейкин 10.

IL-12 – интерлейкин 12.

IL-17 – интерлейкин 17.

TNF-α – фактор некроза опухоли.

RANKL – рецептор активации ядерного фактора каппа B.

OPG – остеопротегерин.

LTC4/LTD4/LTE4 – лейкотриены C4, D4, E4.

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный фактор роста.

Ген GSTA4 – ген глутатион S-трансферазы.

Ген ZMPSTE24 – ген цинксодержащей металлопептидазы.

Ген MMP9 – ген матриксной металлопротеиназы.

Ген SOD2 – ген супероксиддисмутазы 2.

Ген MTHFR – ген метилентетрагидрофолатредуктазы.

Ген SULT1A1 – ген сульфотрансферазы.

Ген eNOS3 – ген эндотелиальной синтетазы оксида азота 3.

Ген CYP1A2 – ген фермента цитохрома P450.

Ген CYP17A1 – ген фермента цитохрома P450.

Ген CYP1A1 – ген фермента цитохрома P450.

Ген CPOX – ген копропорфириногеноксидаза.

Ген BRCA1 – ген breast cancer 1, early onset.

Ген BRCA2 – ген breast cancer 2, early onset.

Ген TERT – ген теломеразы обратная транскриптаза.

Ген ESR1 – ген рецептора эстрогена 1.

Ген GCCR – ген глюкокортикоидного рецептора.

Ген APOE – ген аполипопротеина E.

Ген DRD2 – ген рецептора дофамина.

Ген ANKK1 – ген рецептора дофамина DRD2.

Ген SIRT1 – ген белка сиртуина.

Ген HTR2A – ген рецептора серотонина.

Ген PPARA – ген рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом.

Ген TP53 – ген супрессор опухолевого роста.

Ген TNF – ген фактора некроза опухоли.

Ген HLA DR – ген главного комплекса гистосовместимости.

Ген VEGFA – ген фактора роста сосудистого эндотелия.

Ген TLR4 – ген толл-подобного рецептора 4.

Ген FAS – ген рецептора TNF – fatty acid synthase.

Ген FOXP3 – ген белка forkhead box P3.

Научное издание

Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Редактор *М.Н. Афанасьева*

Подписано в печать 05.07.2016. Формат 90/60.
Усл. печ. л. 18,75. Тираж 500 экз. Заказ № 40/2016.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии издательства «Книжный формат»
Адрес: 614000, г. Пермь, ул. Пушкина, 80.