

**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления
рисками здоровью населения»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека**

На правах рукописи

ДИАНОВА Дина Гумяровна

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ГИГИЕНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВЛИЯНИЯ ГАПТЕНОВ, ПОСТУПАЮЩИХ
С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ, НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ У ДЕТЕЙ**

14.02.01 – Гигиена

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор, заслуженный деятель науки РФ

Зайцева Нина Владимировна;

доктор медицинских наук, доцент

Долгих Олег Владимирович

Пермь 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ И ОСОБЕННОСТЯХ ВЛИЯНИЯ ГАПТЕНОВ, ПОСТУПАЮЩИХ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ, НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	19
1.1. Актуальные проблемы иммунологического здоровья населения в условиях потенциально негативного воздействия внешнесредовых факторов.....	19
1.2. Щелочно–земельные металлы (на примере стронция) и клеточная гибель .	37
1.3. Галогенорганические соединения (на примере хлороформа) и клеточная гибель.....	57
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	75
ГЛАВА 3. ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ВОДНОЙ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ, КСЕНОБИАЛЬНОГО И МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД ДЕТЕЙ, ПОТРЕБЛЯЮЩИХ ПИТЬЕВУЮ ВОДУ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ	96
3.1. Анализ особенностей водной гаптенной нагрузки природного и техногенного происхождения на территориях риска возникновения патологии костно-мышечной системы и гепатобилиарной системы в Российской Федерации	96
3.2. Оценка качества водной среды стронциевой геохимической провинции (на примере Пермского края)	103
3.3. Оценка качества водной среды территорий с повышенным содержанием в питьевой воде остаточного хлора (на примере Пермского края).....	106
3.4. Особенности формирования микрокомпонентного состава биосред у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием химических веществ природного происхождения.....	110
3.5. Особенности формирования микрокомпонентного состава биосред у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием химических веществ техногенного происхождения	112
ГЛАВА 4. ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ПОСТУПЛЕНИЯ ГАПТЕНОВ	

С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ С ОЦЕНКОЙ РИСКА РАЗВИТИЯ У ДЕТЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОСТНО-МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА.....	117
4.1. Актуальные проблемы и современные тенденции динамики заболеваемости костно-мышечной системы и пищеварительной системы у детского населения, проживающего в Российской Федерации на территориях с негативными текущими и предполагаемыми тенденциями	117
4.2. Эпидемиологический анализ уровня, структуры и динамики заболеваемости детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции	134
4.3. Оценка риска формирования у детей заболеваний костно-мышечной системы, ассоциированных с иммунной системой	140
4.4. Эпидемиологический анализ уровня, структуры и динамики заболеваемости детей, проживающих на территории, где используется гиперхлорированная питьевая вода.....	142
4.5. Оценка риска формирования у детей заболеваний гепатобилиарного тракта, ассоциированных с иммунной системой	146
ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ У ДЕТЕЙ С УЧЕТОМ ТЕРРИТОРИАЛЬНОЙ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ	149
5.1. Клинические особенности иммуноассоциированных нарушений у детей, проживающих в условиях экспозиции щелочно–земельных металлов (на примере стронция), поступающих с питьевой водой.....	149
5.2. Иммунологические, биохимические индикаторные показатели у детей, проживающих в условиях экспозиции щелочно–земельных металлов (на примере стронция)	153
5.3. Клинические особенности иммуноассоциированных нарушений у детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа), поступающих с питьевой водой.....	169
5.4. Иммунологические, биохимические индикаторные показатели у детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа)	172
ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЩЕЛОЧНО–ЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ И ГАЛОГЕНОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ	190
6.1. Оценка генетического статуса детей, проживающих в условиях экспозиции щелочно–земельных металлов (на примере стронция).....	190

6.2. Оценка генетического статуса детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа)	195
ГЛАВА 7. ВЕРИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ И ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НАРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННЫХ СВЯЗЕЙ	204
7.1. Оценка причинно-следственных связей формирования нарушений клеточной гибели, обусловленных щелочно-земельными металлами (на примере стронция)	204
7.2. Оценка причинно-следственных связей формирования нарушений клеточной гибели, обусловленных галогенорганическими соединениями (на примере хлороформа)	214
ГЛАВА 8. МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ХИМИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА	225
8.1. Экспериментальные модели в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция)	225
8.2. Экспериментальные модели в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа)	228
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	234
ВЫВОДЫ	263
РЕКОМЕНДАЦИИ	269
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	271
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	272
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	275
ПРИЛОЖЕНИЕ А. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ	318
ПРИЛОЖЕНИЕ В. ПАРАМЕТРЫ МОДЕЛЕЙ ЗАВИСИМОСТИ «ХИМИЧЕСКОЕ ВЕЩЕСТВО В КРОВИ – ВЕРОЯТНОСТЬ ОТКЛОНЕНИЯ ИНДИКАТОРНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ»	320

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Постоянное чрезмерно продолжающееся загрязнение окружающей среды химическими примесями природного и техногенного происхождения в сочетании с нестабильной социально-экономической ситуацией приводит к ухудшению здоровья населения [40, 45, 49, 57, 61, 72, 79, 81, 92, 99, 111]. Воздействие химических факторов окружающей среды существенно влияет на внутреннюю среду организма, оказывая негативное влияние на многие системы и адаптационные возможности организма, что ведет к снижению защитных сил, иммунитета, сопротивляемости организма к инфекционным заболеваниям и повышению чувствительности к развитию неинфекционной патологии [56, 107, 116, 171].

В мире около 80 % заболеваний в определенной степени обусловлены потреблением некачественной питьевой воды [232]. В целом от болезней, связанных с качеством питьевой водой, страдает более 2 млрд человек, существенную часть среди которых составляют дети [26, 311]. Загрязнение питьевой воды гаптенами природного или техногенного происхождения (в пределах 1,2-1,5 ПДК) сопровождается достоверными изменениями иммунологических показателей организма [14]. Риски для здоровья могут возникать из-за потребления воды, загрязненной различными металлами и органическими соединениями различного происхождения [16, 80, 110]. По результатам ранее проведенных исследований о влиянии факторов среды обитания на здоровье детского населения показано, что «вклад» водного фактора в формирование иммуноассоциированных заболеваний у детей, проживающих в различных субъектах РФ, составляет 10-50 % [43, 63].

Иммунная дисфункция, связанная с изменениями в клеточном ответе организма, при которых наблюдается либо активация, либо торможение клеточной гибели, в итоге обуславливает развитие иммуноассоциированных

заболеваний [27, 270, 273, 279, 294, 360], включающих отдельные заболевания костно-мышечной системы [391], некоторые болезни гепатобилиарного тракта [211]. Частота этих заболеваний с иммунологическим компонентом в патогенезе в общей популяции детей составляет 60-80 % [24, 84, 280]. Распространение иммуноассоциированных заболеваний у детей различных возрастных категорий в ряде регионах России достигает 15-50 % [4, 17, 23, 102].

Реакции адаптации к средовым факторам проявляются на уровне различных, и в первую очередь, регуляторных, систем (нервной, эндокринной, иммунной, системы неспецифической резистентности) [106]. Действие на клетку повреждающих средовых факторов различного характера сопровождается активацией или ингибированием апоптоза [21, 192]. При этом наиболее чувствительным к негативным воздействиям факторов среды обитания является детский организм, что определяется особенностями строения, развития и функционирования иммунной системы, наследственным предрасположением к неадекватным реакциям организма на внешнее раздражение в детском возрасте [44]. Гигиеническими исследованиями доказано модифицирующее влияние на апоптоз различных металлов [74, 237, 331], ряда органических соединений [235, 258]. Вместе с тем, анализ и обобщение литературных данных выявил и ряд противоречий о влиянии факторов различной химической природы на процесс клеточной гибели.

Потребление некачественной питьевой воды приводит к нарушениям здоровья детей разных возрастных групп, что свидетельствует о необходимости установления ранних, как правило, ассоциированных с иммунной системой изменений, а также общих закономерностей и особенностей влияния гаптенных, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему детского организма. Для задач раннего выявления и профилактики заболеваний с иммунологическим компонентом существует необходимость совершенствования ранней идентификации иммунопатологических процессов с применением высокотехнологичных и высокоинформативных лабораторных методов анализа. Иммунологические и генетические индикаторные показатели, включающие

показатели апоптотической гибели клетки, в силу их чувствительности позволяют достаточно четко и корректно дать оценку степени влияния факторов водной среды на организм с их перспективным использованием для профилактики нарушений состояния иммунологического здоровья.

Степень разработанности темы исследования. Многочисленные гигиенические исследования в России и за рубежом, изучающие степень распространенности иммуноассоциированной патологии, обусловленной низкоуровневым поступлением гаптенной различной химической природы с питьевой водой, объективно отражают ее неуклонный рост, особенно у детей [53, 232]. Проблема нарушения естественной клеточной гибели и особенности ее реализации представляет для детей, проживающих в условиях экспозиции гаптенами [272, 419]. Изучение особенностей регуляции апоптоза внешними воздействиями (прежде всего химическими факторами техногенного и природного происхождения) является новейшей тенденцией в аспекте теоретических и практических исследований [180, 231, 404]. Однако, систематизированной информации по гигиенической оценке, патогенетических особенностях воздействия химических веществ природного и техногенного происхождения на состояние здоровья детского населения крайне недостаточно. Идентификация в крови детей, потребляющих некачественную питьевую воду, широкого спектра чужеродных для организма веществ или химических примесей в концентрациях, превышающих референтные уровни, является доказательством того, что в ряде случаев заболевания связаны с негативным влиянием факторов окружающей среды: свинца, ванадия, хрома, никеля, щелочно-земельных металлов, бензола, фенолов, галогенорганических соединений [18, 57]. Вместе с тем, в полной мере не раскрыты механизмы формирования причинно-следственных связей между воздействием химического фактора и негативными эффектами со стороны иммунной системы, что позволило бы аргументировано разработать подходы к выявлению лиц с риском формирования дисфункции иммунной системы, ассоциированной с повышенной контаминантной нагрузкой биосред; способствовало бы разработке перспективных подходов к раннему

выявлению донозологических состояний у населения, потребляющего питьевую воду, ненормированную по содержанию химических веществ природного и техногенного происхождения.

На сегодняшний день накоплен значительный материал о механизмах апоптотической гибели клеток в экспериментальных моделях, между тем практически все работы в системе *in vitro* выполнены на культурах опухолевых клеток [179, 282, 425]. Для понимания патогенеза иммуноассоциированных заболевания и раннего их выявления необходимо определение молекулярных механизмов и моделирования апоптотического процесса с его верификацией *in vitro* на здоровых иммунокомпетентных клетках. Однако, в свете последних достижений в области такого общебиологического феномена, как апоптоз, в настоящее время существуют ограниченные сведения о механизмах взаимодействия молекул или групп молекул, которые играют ключевую роль при различных способах инициализации апоптоза, определяют его динамику и конкретные пути развития в условиях гаптенного окружения.

На современном этапе развития гигиенической науки нет достаточно точного объяснения влияния химических и других, потенциально модифицирующих факторов, относящихся к гаптенам, на клеточный апоптоз и некроз. Остаются малоизученными закономерности развития апоптоза, индуцированного воздействием щелочно-земельных металлов и галогенорганических соединений у экспонированного населения различных возрастных групп; отсутствует достаточный перечень индикаторных показателей и их критериальных уровней в условиях средовой гаптенной нагрузки.

Таким образом, отсутствие научно-методического обоснования влияния специфических факторов водной среды на иммунную систему, комплекса иммунологических и генетических индикаторных показателей ранних нарушений, а также необходимость совершенствования комплекса профилактических мероприятий, обеспечивающих возможность контроля клеточной гибели в условиях поступления гаптенов с питьевой водой, обусловили актуальность, определили цель и задачи исследования.

Цель исследования – научно-методическое обоснование комплексного подхода к гигиеническому анализу закономерностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей (на примере Пермского края).

В соответствии с поставленной целью **задачи** работы включали:

1. Разработка концептуальной модели научного обоснования комплексного подхода к гигиеническому анализу закономерностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей.

2. Проведение научно-методического анализа особенностей формирования территориальной внешнесредовой гаптенной нагрузки, ксенобиального и микроэлементного состава биологических сред. Выполнение комплексной углубленной гигиенической оценки заболеваемости детского населения с оценкой риска развития у детей иммуноассоциированных заболеваний костно-мышечной системы и пищеварительного тракта в условиях поступления гаптенов с питьевой водой.

3. Гигиеническая оценка закономерностей и особенностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей на основе углубленного исследования.

4. Научное обоснование и оценка причинно-следственных связей между диапазонами показателей клеточной гибели и содержанием химических соединений в крови с обоснованием их критических уровней для апоптоза, ассоциированных с воздействием изучаемых гаптенов с верификацией в эксперименте *in vitro* особенностей нарушений клеточной гибели (на примере стронция и хлороформа).

5. Научно-методическое обоснование системы индикаторных показателей и критериев ранней индикации клеточной гибели, а также особенностей механизма вступления иммунокомпетентных клеток в апоптоз в условиях экспозиции химических веществ природного и техногенного происхождения.

6. Разработка и научное обоснование гигиенических рекомендаций для задач раннего выявления и предотвращения нарушений клеточной гибели, связанной с воздействием гаптенных, поступающих в организм с питьевой водой.

Научная новизна работы.

Предложена и научно обоснована методология исследования, включающая концептуальную модель и основные принципы системного гигиенического анализа закономерностей влияния гаптенных, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему.

Впервые предложены методические подходы к выделению территорий, приоритетных по критериям риска нарушения иммунной системы у детского населения, включающего в себя комплекс санитарно-гигиенических и эпидемиологических показателей.

Научно обоснованы алгоритм, методы установления закономерностей и особенностей реализации клеточной гибели при поступлении гаптенных природного и техногенного происхождения с питьевой водой.

Впервые предложены методические подходы к выявлению закономерностей реализации клеточной гибели в условиях поступления щелочно-земельных металлов и галогенорганических соединений с питьевой водой, которые проявлялись: ослаблением процессов регистрации и редукции антигенного сигнала с мембраны в клетку и способностью Т-лимфоцитов отвечать на апоптогенный стимул; ареактивностью процессов ранней активации на стимуляцию гаптенном; напряженностью окислительно-восстановительных процессов; ингибированием аннексинассоциированного апоптоза и переключением на альтернативный механизм клеточной гибели – некроз.

Научно обоснованы особенности изменений иммунологических и генетических индикаторных показателей при экспозиции *стронцием*: снижение активности реакций антиокислительной защиты, дефицит количества эффекторных клеток с цитотоксической активностью и регуляторных лимфоцитов, Th1-смещение цитокинового профиля, замедление экспрессии внутриклеточных антиапоптотических сигнальных белков, ослабление p53-

зависимого контроля, как фено-, так и генотипического (полиморфизм *TP53 rs1788415*); угнетение рецепторопосредованного механизма реализации клеточной гибели, а также дисбаланс факторов, отражающий замедление процессов формирования костной ткани.

Научно обоснованы особенности изменений иммунологических, биохимических и генетических индикаторных показателей в условиях экспозиции *хлороформом*: интенсификация активности реакций антиокислительной защиты, снижение уровня эффекторных клеток с хелперной активностью, активация гуморального звена иммунитета, гиперпродукция цитокинов Th2, повышение экспрессии антиапоптотических внутриклеточных белков семейства BCL-2, ингибирование митохондриального механизма реализации клеточной гибели, снижение синтетической функции печени, явления холестаза, нарушение целостности гепатоцитов и наличие полиморфно измененных генов, ассоциированных с процессами детоксикации (*CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg*).

Доказана вероятностная зависимость нарушений процессов метаболизма костной ткани и иммунорегуляции от контаминации крови стронцием, а также развития негативных эффектов со стороны гепатобилиарного тракта и иммунной системы от содержания в биосредах экспонированных детей галогенорганических соединений.

Предложен реперный уровень стронция в крови 0,017 мг/дм³ по критерию снижения содержания регуляторных Т-лимфоцитов, обеспечивающих иммунологическую толерантность. Предложен реперный уровень содержания хлороформа в крови, который составил 0,002 мг/дм³ по критерию индукции TNF α , как фактор, характеризующий повреждение паренхимы печени.

Установлено, что в системе *in vitro* стронций в концентрации 7 мг/дм³, соответствующей ПДК для питьевой воды, замедляет апоптоз, реализуемый с участием FAS-молекулы и белка p53, и повышает интенсивность некротической гибели клетки. Верифицировано антиапоптотическое действие хлороформа *in vitro* в концентрации 0,06 мг/дм³, характеризующиеся ингибированием

программированной гибели Т-лимфоцитов с одновременной гиперпродукцией противоапоптозного белка bcl-2 и стимуляцией некроза Т-лимфоцитов.

Научно обоснованы, на примере транскрипционного фактора, критерии оценки показателей клеточной гибели, ассоциированной с контаминацией стронцием: диапазону содержания стронция в крови 0,034-0,055 мг/дм³ соответствует диапазон транскрипционного фактора p53 1,50-1,88 % (малый риск), диапазону стронция в крови 0,056-0,09 мг/дм³ – диапазон p53 1,87-1,04 % (средний риск), диапазону стронция в крови 0,095-0,15 мг/дм³ – диапазон p53 0,99-0,55 % (высокий риск), диапазону стронция в крови 0,155-0,197 мг/дм³ – диапазон p53 0,52-0,33 % (очень высокий риск).

Предложена научно обоснованная, подтвержденная достоверными математическими моделями, система индикаторных показателей ранней индикации клеточной гибели в условиях избыточного поступления гаптеннов с питьевой водой, включающая: для щелочно–земельных металлов (на примере стронция) перечень из 20 показателей, для галогенорганических соединений (на примере хлороформа) – 25 показателей.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые научные результаты, углубляющие представления о фундаментальных механизмах реализации процесса программированной клеточной гибели, а также ее особенностей в условиях экспозиции химическими факторами водной гаптенной нагрузки, заключающиеся: в ингибировании рецепторопосредованного и p53-зависимого апоптоза (экспозиция щелочно–земельных металлов); в ингибировании митохондриального пути апоптоза (экспозиция галогенорганических соединений), с переключением на некроз (альтернативный механизм клеточной гибели) – независимо от специфичности гаптенной нагрузки. Теоретическую значимость представляют новые знания о механизмах реализации клеточной гибели в условиях химического гаптенного окружения, установленные в условиях *in vitro* с их верификацией на экспериментальных моделях *in vivo*. Полученные результаты существенно расширяют представление о характере и особенностях процессов естественной гибели клетки в условиях средовой

гаптенной нагрузки (на примере щелочно-земельных металлов и галогенорганических соединений).

По результатам настоящего исследования на основе изучения причинно-следственных связей и экспериментальных моделей рекомендована система индикаторных показателей и критериев нарушения клеточной гибели для раннего выявления дисфункции иммунореактивности, обусловленной водной гаптенной нагрузкой щелочно-земельными металлами и галогенорганическими соединениями.

Материалы использованы при выполнении отраслевой научно-исследовательской программы «Гигиеническое обоснование минимизации рисков для здоровья населения России» (на 2011-2015 гг.) (утв. руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека Российской Федерации 21.12.2010 г.).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения».

Методология и методы исследования. Методология данного исследования основана на оценке патогенетической связи формирования у детского населения иммунорегуляторных нарушений с экспозицией химическими веществами (на примере экспозиции щелочно-земельных металлов и галогенорганических соединений), обладающими высокой тропностью к иммунной системе, и создание на её основе усовершенствованных высококачественных методов индикации, таких как проточная цитометрия и полимеразная цепная реакция (ПЦР). В работе для достижения поставленной цели использован комплекс высокоинформативных санитарно-гигиенических, статистических и общенаучных методов исследования, методология оценки риска, клиничко-анамнестических, химико-аналитических и клиничко-лабораторных методов исследования, которые позволили расширить и получить новые научные сведения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Научно-методическая концептуальная модель гигиенического анализа индикации нарушений клеточной гибели как результат поступления гаптенів с питьевой водой, является основой гигиенической оценки закономерностей их влияния на иммунную систему у детей.

2. Загрязнение питьевой воды щелочноземельными металлами и галогенорганическими соединениями и связанный с ним дисбаланс микрокомпонентного состава крови обуславливают дополнительную заболеваемость детского населения болезнями костно-мышечной системы и гепатобилиарного тракта.

3. Общей закономерностью клеточной гибели у детей в условиях поступления с питьевой водой гаптенів природного и техногенного происхождения (на примере щелочноземельных металлов и галогенорганических соединений) является переключение механизма клеточной гибели на путь некроза, а к специфическим особенностям клеточной гибели следует отнести ингибирование внешнего пути апоптоза в условиях воздействия щелочноземельных металлов (на примере стронция), а также торможение внутреннего механизма апоптоза в условиях воздействия галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

4. Нарушения процессов клеточной гибели в условиях экспозиций натуральных и эксперимента *in vivo* характеризуются достоверным дисбалансом иммунологических и генетических индикаторных показателей, что позволяет их рекомендовать для ранней индикации изменений в системе регуляции апоптоза в условиях специфической гаптенной нагрузки.

5. Ранняя индикация нарушений активности иммунной системы, характеризующаяся дисрегуляцией апоптотической гибели, ассоциированной с водной экспозицией на примере галогенорганических соединений и щелочноземельных металлов, является приоритетным звеном в системе мер по профилактике формирования дисбаланса иммунного ответа в условиях средовой

гаптенной нагрузки и позволяет обосновать практические рекомендации для проведения гигиенических экспертиз и оценок.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокий уровень достоверности результатов диссертационной работы, а также обоснованность выводов определяются использованным методическим и методологическим дизайном исследования, масштабностью исследования (гигиенической оценкой и эпидемиологическим анализом охвачено 85 субъектов Российской Федерации, 2 территории – углубленно), продолжительным периодом мониторинга (1992–2017 гг.), воспроизводимостью результатов (обобщено более 700 тыс. ед. информации); достаточным числом наблюдений, использованием современных адекватных методов исследования – санитарно-гигиенических (исследования по 15 компонентам в питьевой воде и по 12 компонентам в атмосферном воздухе), химико-аналитических (более 20 000 элементоопределений), клинико-анамнестических (более 10 000 карт углубленного медицинского обследования, социологическое анкетирование 400 семей), иммунологических (более 25 000 цитофлюориметрических исследований), иммуноферментных (21 210 исследований), иммуногенетических (12 020 исследований), биохимических (12 120 исследований) исследований, позволяющих решить поставленные задачи, а также адекватных методов статистического анализа с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, USA).

Материалы диссертационного исследования представлены на Международной научно-практической конференции «Экология и медицина: современное состояние, проблемы и перспективы» (Москва, 2010); VI Всемирном конгрессе по иммунопатологии и респираторной аллергии, VIII Съезде аллергологов и иммунологов СНГ, V Съезде иммунологов России (Москва, 2011); XVI Научно-практической конференции «Высокие технологии и модернизация в лабораторной медицине» (Москва, 2011); XV International scientific conference «Family health in the XXI century» (Torremolinos (Spain) – Perm (Russia), 2011); 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Гигиенические и медико-профилактические технологии управления рисками

здоровью населению» (Пермь, 2011); Всероссийской научно-практической интернет-конференции «Актуальные проблемы и инновационные технологии в гигиене» (Пермь, 2014); II Международной научно-практической конференции «Чистая капля воды» (Чита, 2012); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014); XI–VIX Конференциях иммунологов Урала (Екатеринбург, 2014; Пермь, 2015; Калининград, 2016; Челябинск, 2017; Сочи 2018); XII Всероссийском съезде гигиенистов и санитарных врачей «Российская гигиена – развивая традиции, устремляемся в будущее» (Москва, 2017); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011; 2015; 2017); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы безопасности и оценки риска здоровью населения при воздействии факторов среды обитания» (Пермь, 2015; 2016); Межрегиональной научно-практической интернет-конференции «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения на уровне субъекта Федерации» (Пермь, 2017); VII Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» и «Спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения (Баку, (Азербайджан), 2018).

Диссертационная работа апробирована и обсуждена на расширенном заседании отдела иммунобиологических методов диагностики с отделом социально-гигиенического мониторинга и отделом анализа риска для здоровья ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (протокол № 1 от 24.01.2019 г.).

Внедрение результатов исследования. Внедрение материалов диссертационного исследования осуществлено в виде изобретений: «Способ диагностики вторичных иммунодефицитных состояний человека, связанных с химическим контаминантом» (патент РФ на изобретение № 2452963 от 10.06.2012 г.); «Способ количественной оценки апоптоза, модифицированного органическими низкомолекулярными соединениями» (патент РФ на изобретение

№ 2471190 от 27.12.2012 г.); «Способ диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием» (Патент РФ на изобретение № 2577705 от 20.03.2016 г.); «Способ оценки у детей влияния стронция на апоптоз, ассоциированный с аллельным вариантом гена FAS» (патент РФ на изобретение № 2621155 от 19.07.2016 г.); «Способ выявления нарушений у детей иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием» (патент РФ на изобретение № 2651038 от 21.07.2017 г.).

Результаты исследований использованы при подготовке методических рекомендаций «Критерии регуляции жизненного цикла клетки в условиях влияния техногенных химических факторов на население» (утв. Приказом зам. руководителя Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Пермскому краю № 56 от 14.03.2014 г.), «Внутриклеточные маркеры апоптоза и цитокиновой регуляции как маркеры воздействия металлов на иммунитет» (утв. Приказом зам. руководителя Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по ПК № 5 от 19.01.2015 г.).

Материалы исследований используются в учебном процессе при проведении лекций и практических работ в системе высшего образования на кафедре охраны окружающей среды ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет» (акт внедрения от 17.01.2019 г.). Результаты исследований внедрены в практическую деятельность ЧУЗ «Клиническая больница "РЖД-Медицина"» города Пермь» (акт внедрения от 27.12.2018 г.) и используются в ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора в научно-исследовательской деятельности при разработке информационно-методической документации, в работе органа инспекции при выполнении санитарно-эпидемиологических исследований, гигиенических оценок и экспертиз (акт внедрения от 23.01.2019 г.).

Личный вклад автора. Доля личного участия в процессе планирования, организации и проведении исследований по всем разделам работы составила

80 %. Формирование целей, задач, научной новизны, теоретической и практической значимости исследования, анализ фактического материала и обобщение результатов полностью проведены автором работы.

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 44 работы, в том числе 1 монография в соавторстве (18,75 условных печатных листов), 14 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертации, 5 патентов на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертационная работа включает: «Введение», «Обзор литературы», «Методология, материалы и методы исследования» и 6 глав собственных исследований, «Заключение», «Выводы», «Список литературы», «Рекомендации». Диссертация изложена на 322 страницах, иллюстрирована 43 рисунками и 74 таблицами. Библиографический указатель содержит 431 источника, из них 110 отечественных и 321 зарубежных публикаций.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ И ОСОБЕННОСТЯХ ВЛИЯНИЯ ГАПТЕНОВ, ПОСТУПАЮЩИХ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ, НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Актуальные проблемы иммунологического здоровья населения в условиях потенциально негативного воздействия внешнесредовых факторов

Роль средовых факторов в формировании иммунологического здоровья. Загрязнение окружающей среды является одним из основных факторов, оказывающих неблагоприятное воздействие на иммунологическое здоровье человека [18, 21, 22, 78, 81, 105, 106, 108, 284, 343]. Недооценка связи здоровья человека и здоровья среды во многом определяет неприоритетность экологической проблематики в обществе [92]. Загрязнение окружающей среды дорого обходится обществу. Прежде всего, загрязненная среда воздействует на здоровье человека, что нашло отражение в очень простой фразе: нельзя быть здоровым в больной среде [6, 108]. В последние пятнадцать лет на территории РФ отмечается тенденция роста уровня заболеваемости населения болезнями, иммунные механизмы, в развитии которых имеют доминирующее значение на 10-25 % [85].

Уровень здоровья населения ставится в прямую зависимость от интенсивности, продолжительности влияния загрязнения и степени адаптации индивида к среде обитания [18, 78, 92]. Система иммунитета относится к ключевым системам, обеспечивающим стратегию адаптации макроорганизма к постоянно меняющимся условиям внутренней и внешней среды [105, 106, 108, 145, 285, 319].

Очевидно, проблема ухудшения здоровья нации неотрывно связана с воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды [83, 92, 99, 111].

Обеспечение здоровья среды необходимо для решения задач здравоохранения [1, 5]. Без учета этого фактора любые меры по обеспечению качества медицинского обслуживания не дадут в полной мере ожидаемого результата [1]. Между тем вывод о негативном воздействии факторов окружающей среды на здоровье детского и взрослого организма должен основываться на строго научной достоверной информации, отражающей реальную ситуацию в конкретных условиях [63, 92, 88, 251, 399]. В то же время требуется предполагать и доказывать этиопатогенетические механизмы воздействия факторов окружающей среды на те или иные параметры здоровья, имея полное представление о природе формирования используемых статистических показателей [63, 92].

Сохраняется озабоченность относительно того влияния, которое небезопасное и нездоровое внешнесредовое воздействие причиняет детскому здоровью, и этот вред существенный [49, 108]. Сравнительно с взрослыми, дети, организм которых находится в процессе становления и дальнейшего формирования, максимально в первые годы после рождения, нередко значительно чувствительнее к неблагоприятным влияниям разнообразных факторов окружающей среды, таких как загрязненный атмосферный воздух, питьевая вода, почва [232].

Окружающая среда относится к одному из значимых факторов, каждый год приводящему к гибели около десяти миллионов детей разных возрастов, и является ключевым элементом, оказывающим влияние на уровень здоровья и благополучие их матерей [55]. Иммуноопосредованные заболевания, в развитии которых значимая роль принадлежит химическим веществам различного генеза, относятся к числу десяти ведущих причин смертности в мире [116, 311, 380] и являются одной из причин детской смертности в возрастной категории от 5 до 14 лет [172]. Согласно данным, полученным в исследовании «Определение бремени экологически обусловленных заболеваний среди детей», показано, что в Европе практически 30 % всех заболеваний, возникающих у детского населения в возрасте от 0 до 18 лет, обусловлены небезопасными и нездоровыми условиями жизни как в семье, так и в рамках общества в целом, приводя к существенному

социальному и экономическому урону [108]. Неблагоприятное влияние на детский организм негативных внешнесредовых факторов различного генеза может вызвать болезни органов пищеварения, заболевания бронхолегочной системы, врожденные дефекты, заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани, патологию нервной системы, удельный вес которых в общей структуре заболеваемости составляет одну шестую [108]. Также существует обеспокоенность относительно того, что в отдаленном будущем реализуются токсические эффекты (канцерогенные, нейротоксические, иммунотоксические, генотоксические, аллергические, эффекты, формирующие нарушения в работе эндокринной системы) химических соединений природного и техногенного происхождения, обнаруживаемых в окружающей среде [232]. Именно различия экологической ситуации, обусловленные, в том числе и качеством воды, могут определять иммунологические различия, которые не только отражают адаптивные изменения у детей, но и могут привести к более серьезным последствиям на популяционном уровне [27, 102].

На территории Российской Федерации несколько десятков миллионов человек живут в регионах, где уровень загрязнения атмосферного воздуха обусловлен значительными выбросами вредных веществ от автотранспорта и промышленных предприятий, больше десяти миллионов человек потребляют питьевую воду, не отвечающую гигиеническим нормативам по санитарно-химическим показателям [58, 65]. В течение десятилетий остается в крайне неудовлетворительном состоянии и характеризуется как «грязная» или «экстремально грязная» вода рек в Приволжском Федеральном округе, Центральном Федеральном округе и некоторых других [63]. В 2016 г. в водные объекты страны было сброшено 14,7 млрд м³ загрязненных сточных вод, что на 2,1 % больше, чем в предыдущем году [63]. Наиболее выражены санитарно-гигиенические проблемы в крупных промышленных городах России, в том числе городах Пермского края. На территории Пермского края находится 1145 источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, из которых 27 являются поверхностными.

Риски для здоровья могут возникать из-за потребления воды, загрязненной химическими веществами техногенного и природного происхождения [16]. На территории Приволжского федерального округа высокий уровень несоответствия воды поверхностных водоисточников гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям отмечается в Краснокамском (42,8 %) и Чайковском (24,0 %) районах, по санитарно-химическим показателям наиболее высокий удельный вес нестандартных проб зарегистрирован в г. Перми (55 %), г. Кунгуре (11,6 %), Краснокамском (93 %) и Чусовском (66,6 %) районах [59, 65]. Микробиологическое загрязнение воды требует обеззараживания воды хлором и его соединениями, обуславливая пагубное воздействие на здоровье человека. Побочными продуктами хлорирования будут выступать галогенорганические соединения [311]. Проблема качества подземных вод связана с достаточно сложной гидрохимической обстановкой, обусловленной природным несоответствием подземных вод нормативным требованиям по содержанию тяжелых, щелочных и щелочно-земельных металлов, показателям общей жесткости и минерализации [63]. Обычно выводят подземные воды из разряда кондиционных повышенные содержания таких элементов, как железо, марганец, стронций, фтор, литий, бром, бор. Наибольшее количество участков и водозаборов с загрязнением подземных вод расположено на территории Приволжского округа (24 %), значимая часть из которых эксплуатируется на территории Пермского края [63]. Даже незначительное загрязнение питьевой воды гаптенами природного или техногенного происхождения (в пределах 1,2–1,5 ПДК) сопровождается достоверными изменениями иммунологических показателей организма, причём вредное воздействие химических загрязнителей касается практически всех звеньев иммунной системы [14, 46, 216].

По результатам ранее проведенных исследований о влиянии факторов среды обитания на здоровье детского населения показано, что «вклад» водного фактора в формирование заболеваний печени, желчного пузыря и поджелудочной железы у детей может составлять 10–15 % [32]. Современные официальные и научные данные свидетельствуют о зависимости возникновения у детей

заболеваний иммунной системы и опорно-двигательного аппарата от некачественной воды до 10 % [58, 59]. Согласно проведенным исследованиям последних лет «вклад» водного фактора в формирование заболеваемости почек, мочевыводящих путей составляет 10–15 % [58, 81]. Выявлена зависимость возникновения у детей заболеваний эндокринной системы и органов кровообращения от некачественной воды [81].

Оценка заболеваемости населения неинфекционными заболеваниями в результате негативного влияния факторов среды обитания показала, что неудовлетворительное качество питьевой воды формирует дополнительные случаи заболеваний органов пищеварения в 8 регионах Российской Федерации. К приоритетным территориям относятся Московская область, Пермский край, Удмуртская Республика, Кемеровская, Оренбургская области, Красноярский край. По количеству дополнительных случаев заболеваний костно-мышечной системы и соединительной ткани всего населения, ассоциированных с качеством питьевой воды, к приоритетным территориям относятся отдельные территории Приволжского федерального округа [58, 59].

Очевидно, в ряде городов РФ сложилась опасная и чрезвычайно опасная ситуация, связанная с потреблением некондиционной питьевой воды. Вместе с тем некоторые вопросы о последствиях этого загрязнения остаются открытыми. До настоящего времени недостаточно изучена роль иммунологических механизмов контроля процессов апоптоза при развитии различных нарушений гепатобилиарного тракта и костной системы в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, в частности на территории Приволжского округа. На данный момент нет полного представления о характере и масштабах воздействия факторов окружающей среды на развивающийся организм детей – от внутриутробного периода до подросткового возраста. Однако, уже имеющиеся фактические данные о значимости ряда химических факторов как причин заболеваемости среди детей, а также об их вкладе в развитие патологий, которые могут проявиться только во взрослой жизни, убеждают в необходимости уже сейчас предпринимать скоординированные и устойчивые

действия с целью охраны здоровья детей и сегодня, и с перспективой на будущее [108]. Сегодня существует необходимость более детального изучения связи загрязнителей окружающей среды с изменением в иммунной системе, начиная уже с детского возраста [80]. Состояние здоровья детей как категории населения наиболее чувствительного к воздействию негативных внешнесредовых факторов говорит о снижении показателей физического и психического развития, иммунологической реактивности и, как результат, о повышении острой и хронической заболеваемости, пороков развития и характеризуется рядом авторов как критическое [27, 47, 82, 104, 112]. Особую актуальность проблема представляет для детей, проживающих на территориях с высоким уровнем химического воздействия. Дестабилизация иммунной системы экспозицией химическими веществами может привести к увеличению риска развития ряда заболеваний, в механизме которых ключевая роль принадлежит нарушению клеточной регуляции.

Очевидно, угроза здоровью населения, связанная с воздействием окружающей среды, является одной из наиболее актуальных проблем современного общества, а вопрос сохранения здоровья населения занимает важное место в системе социальных ценностей и приоритетов общества [12, 14, 17, 199]. Многообразие и интенсивность неблагоприятной химической нагрузки на индустриальных территориях способствуют изменению иммунной системы [81, 110, 404]. Индуцирующее влияние неблагоприятных химических факторов (техногенного и природного происхождения) на организм диктует необходимость углубленного изучения состояния иммунологического здоровья населения с целью научного обоснования своевременного выявления иммуноассоциированной патологии. В перспективе необходим постепенный переход от фиксации тех или иных вариантов, вызванных химическими факторами иммунодефицитных состояний, к раннему выявлению, профилактическому предотвращению их развития и иммунотерапии установленных отклонений [105–107].

Химический фактор и иммунная система. Предполагают, что фактически любая интоксикация в той или иной мере может стать причиной нарушения иммунного статуса организма [318, 319, 321], что в итоге может вызвать срыв физиологической адаптационной реакции организма. Свойство различных химических веществ формировать нарушения функций организма, выражающиеся неадекватными иммунными реакциями, позволяет говорить об иммунотоксичности ксенобиотиков [26, 41]. В условиях интоксикации организма ксенобиотиком возникает ответная реакция на сам поллютант и на его метаболиты. Химическое вещество может оказывать иммуносупрессивное влияние на иммунную систему, т.е. собственно повреждающее действие. Также возможно участие системы иммунитета в осуществлении механизмов токсического влияния иммунотоксикантов (аутоиммунные реакции, реакции гиперчувствительности) [41]. Основным принципом иммунотоксичности любого химического агента – это зависимость качественных и количественных характеристик действующего вещества [26, 319].

Нарушение работы иммунной системы может выражаться гиперфункцией иммунитета или супрессией иммунных функций организма, либо вообще не обнаруживаться клинически [49, 66, 112, 181, 217, 236, 320, 376]. Любой неадекватный ответ иммунной системы на чужеродный агент (химический фактор) способствует возникновению патологического состояния. Снижение защитной функции организма (подавление иммунитета) способствует учащению инфекционных заболеваний, ослаблению механизмов противоопухолевой защиты организма. К развитию аллергии организма, патологической гиперчувствительности или аутоиммунным процессам приводит активация иммунного ответа на антиген [164].

На сегодняшний день негативное влияние на организм металлов и органических соединений природного и техногенного происхождения постоянно растет [249, 348, 407, 412], что является одной из причин активного изучения роли этих химических веществ в срыве адаптационных возможностей организма и индукции иммунопатологии у человека [6, 19]. Иммунные нарушения часто

ассоциированы с нарушением апоптоза, изменениями в клеточном ответе организма, при которых наблюдается либо активация, либо торможение клеточной гибели. При изучении влияния экзогенных факторов на возникновение дисбаланса иммунной системы, что часто проявляется в нарушении регуляции клеточной гибели, особую значимость представляет оценка уровня генетически детерминированной клеточной гибели у детей с территориями с высоким уровнем химического воздействия.

Таким образом, для раннего выявления нарушений здоровья при различных путях поступления, в том числе и с питьевой водой, химических веществ в организм актуально выявление индикаторных показателей иммунного статуса с применением новейших методов инструментального лабораторного анализа. Выполнение многоуровневого исследования иммунного статуса позволит провести стандартную экспресс-индикацию, а при необходимости – расширенное изучение нарушений иммунитета. Раннее обнаружение нарушений состояния иммунитета с использованием методов цитофлюориметрического фенотипирования клеток и регистрация ранних признаков апоптоза на лазерном проточном цитометре, а также использование метода ПЦР в режиме реального времени позволят установить нарушения клеточной функции и возможное развитие патологических процессов на самых ранних этапах заболевания.

Современный научный взгляд на механизм и классификацию клеточной гибели. В начале 70-х гг. XX в. предложена классификация клеточной смерти, включающая три типа клеточной смерти: I тип – это расщепление чужеродного агента в фаголизосомах; II тип – расщепление в аутосомах собственных макромолекул или органелл, утративших функциональную активность, III тип – необратимое прекращение жизненной активности клеток, тканей или органов в живом организме. В настоящее время описанные типы клеточной смерти соответствуют апоптозу, аутофагии и некрозу. Ранее принято было считать, что апоптоз является единственным программируемым типом клеточной смерти, а некроз – насильственной формой клеточной гибели. Однако, на сегодняшний день данная классификация утратила свою значимость.

В 2005 г. на основании морфологических и биохимических критериев международный Номенклатурный комитет по клеточной смерти (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) предложил выделять три основных типа (за) программированной клеточной смерти (ПКС): апоптоз (ПКС I типа), аутофагия (ПКС II типа) и некроз (ПКС III типа). ПКС типов I и II имеют определенные генетически механизмы реализации, поэтому называются активными. ПКС III типа (первичный некроз в результате внешнего повреждения) является неуправляемым, поэтому называется пассивным [71]. Помимо апоптоза, некроза и аутофагии было рекомендовано выделять и другие виды клеточной смерти, в том числе вторичный некроз как конечный результат апоптоза [79]. Новейшие исследования феномена программируемой клеточной смерти обнаружили особый тип апоптотической гибели – иммуногенную клеточную гибель (immunogenic cell death, ICD) [394]. В отличие от апоптоза, ICD в отдельных случаях не формирует иммунный ответ, а также иногда при ICD не наблюдается иммунологической толерантности. В процессе иммуногенного апоптоза раковых клеток происходит активация дендритных клеток, последующее усиление клеточного ответа и формирование эффективного противоопухолевого иммунного ответа [169, 255]. На современном этапе медико-биологических наук обсуждаются морфологические и биохимические признаки IV типа программированной клеточной смерти – энтоза [299]. Впервые энтоз был описан в 2007 г. Майклом Оверхольтцером с соавторами как «клеточный каннибализм» [338]. Энтоз включает вторжение одной живой клетки в другую и впервые описан у лимфобластов, которые были выделены от больных с болезнью Хантингтона. Однако на сегодняшний день не идентифицирован фармакологический фактор, индуцирующий энтоз, и до сих пор неясно, может ли этот процесс использоваться для применения в терапевтических целях ряда иммунопатологических состояний.

В 2012 г. Номенклатурным комитетом по клеточной смерти принято решение о внесении изменений в классификацию программ клеточной гибели в соответствии с биохимическими и молекулярными признаками клеточной гибели [195]. Также NCCD определил фармакологические и генетические вмешательства,

использование которых подтвердит тип летальной программы клетки в условиях эксперимента. В настоящее время идентифицировано более 10 различных форм клеточной гибели. Среди них апоптоз, аутофагия, митоптоз, некроз, некроптоз, нетоз, онкоз, пироптоз, аноиксис и паранекроз [213]. Между тем остается дискуссионным вопрос о том, что все эти формы гибели клетки являются лишь особенностями физиологического механизма одного и того же биологического феномена [3].

Согласно рекомендациям Номенклатурного Комитета по клеточной смерти 2015 г. все случаи гибели клеток могут быть разделены на две категории: «случайная гибель клеток» (accidental cell death, ACD) и «регулируемая гибель клеток», генетически запрограммированная (regulated cell death, RCD) [188]. Сравнительная характеристика механизмов клеточной гибели (RCD и ACD) представлена в приложении А [190, 195, 255, 287, 371, 430].

Регулируемая гибель клеток включает в себе генетически зашифрованный молекулярный механизм и регулируется посредством фармакологических и / или генетических вмешательств. RCD может быть активирована после того, как адаптивные ответы на внеклеточные или внутриклеточные влияния на клетку окажутся неэффективными [195; 382]. Также регулируемая смерть может быть инициирована различными химическими факторами окружающей среды [343]. Следует подчеркнуть, что химические воздействия и генетические вмешательства не только изменяют кинетические, биохимические и морфологические характеристики клеточной деградации, но могут активировать альтернативные клеточные механизмы [213]. В понятие RCD входит апоптоз, аутофагия, аноиксис, некроптоз [300, 371]. Однако необходимо отметить, что полное подтверждение подтипа RCD до сих пор осложняется вследствие расхождения биохимических и морфологических явлений, наблюдаемых при гибели клеток [34].

Апоптоз – это основной вариант ПКС, эволюционно консервативный процесс, необходим для развития и сохранения клеточного гомеостаза в многоклеточном организме [213]. Апоптоз определяется как каспазозависимый вариант RCD. В результате аутофагии происходит переработка клеточных

структур, а ее биохимическим маркером является активация фосфоинозитид-3 киназы. Некроптоз определяется как форма гибели клеток, которая зависит от белка, взаимодействующего с серин-треонин-киназой 1 (*RIP1*) и определяется как каспазозависимый подтип RCD [194, 195]. Апоптоз вид клеточной смерти, возникающий при отделении клетки от субстрата, пусковым механизмом является активация киназы *JNK*. Инициация данной таногенной программы в итоге приводит к активации каспаз и фрагментации ДНК [93]. Важно отметить, что различные формы клеточной гибели могут иметь общие черты, а механизм инициации апоптоза не исключает альтернативных путей гибели клетки [343].

Установлены индикаторные показатели, рекомендуемые для описания регулируемой клеточной гибели: caspase-8, caspase-3, GPx4, COD, FAS, FASL, bcl-2, bax, p53, Annexin V и др. [127, 195, 300, 303, 411]. В данное время идентифицированы диагностические и прогностические биомаркеры RCD [371]. На сегодняшний день FASL (клетки Риды–Штернберга лимфомы Ходжкина (узловой склероз и смешанная клеточность)), p53 (карцинома *in situ* мочевого пузыря, инвазивная карцинома молочной железы), bcl-2 (отличает фолликулярную гиперплазию лимфатического узла от фолликулярной лимфомы) [160], COD и GPX (для стратификации поражения печени при хроническом вирусном гепатите и неалкогольной жировой дистрофии печени) определены как маркеры, определяющие нарушения иммунной системы [98, 371]. Установлены прогностические биомаркеры RCD (Таблица 1.1.1) [125, 138, 371].

Прогностические биомаркеры связаны с опухолевой клеточной пролиферацией, дифференцировкой, ангиогенезом, инвазией или метастазированием. Данные биомаркеры дают возможность спрогнозировать возможное протекание патологического процесса, но в то же время никак не взаимосвязаны с проводимым противоопухолевым лечением [90]. Между тем одни и те же биомаркеры, например p53 (биомаркер рака пищевода, уровень SCC: неблагоприятный прогноз) или bcl-2 (миелодиспластический синдром: повышенная экспрессия связана с прогрессированием заболевания) [137], могут обладать как идентифицирующими, так и прогностическими свойствами [371].

Таблица 1.1.1 – Прогностические биомаркеры RCD

Маркер	Тип	Использование
bcl-2	Прогностический	Возможный неблагоприятный прогностический фактор при крупноклеточной лимфоме [138]
p53	Прогностический	Возможная прогностическая ценность при новообразованиях тимуса [125]
FAS	Прогностический	Уменьшение экспрессии FAS является плохим прогностическим фактором для карциномы молочной железы, колоректальной карциномы, ретинобластомы и уротелиальной карциномы мочевого пузыря. Уменьшение экспрессии FAS является благоприятным прогностическим фактором при первичной узловой диффузной большой В-клеточной лимфоме [371]

«Случайная гибель клеток» возникает в результате серьезных повреждений клетки под воздействием физических факторов, таких как высокая температура, давление, механических стимулов, например порез, высоких концентраций химических веществ различной природы, в частности лекарственных средств, металлов, органических соединений, токсинов [203, 300]. Обычно некроз рассматривается как случайное и нерегулируемое клеточное событие [343, 371]. Зачастую лиганды (например, TNF α , FasL и TRAIL), активирующие рецепторы смерти, инициируют некроз или некроптоз [194, 195].

Действие на клетку повреждающих факторов различного характера сопровождается активацией или ингибированием апоптоза [69]. Установлено модифицирующее влияние на апоптоз лимфоцитов тяжелых [331], платиновых [270], щелочных металлов [237], лантаноидов [356], ряда органических соединений [74, 235, 258]. Показано влияние на реализацию апоптоза низких температур, воздействие электромагнитного поля [192, 345, 389]. Однако, модификация реализации клеточной гибели зависит не только от внешних апоптогенных сигналов, получаемых клеткой, но и от генетического статуса человека, гендерных, возрастных и других особенностей организма.

В человеческой популяции наиболее чувствительными к воздействию факторов среды обитания являются дети, имеющие несовершенство развития жизненно важных органов и систем. Подобно другим системам, организация и развитие иммунной системы претерпевают возрастные изменения.

По результатам наблюдений установлено, что у детей в возрасте от 8 до 14 лет количество клеток, гибнущих по механизму апоптоза, составляет порядка миллиона в день и повышается с возрастом [112, 123]. Предполагается, что с возрастом иммунный ответ теряет характер Th2-типа и приобретает характер Th1-типа, а физиологические медиаторы Th2-типа (IL4, IL6) проявляют противоапоптотическую активность [285]. Отмечают активацию апоптоза при наличии детской вирусной инфекции (корь, оспа), что способствует развитию вторичного иммунодефицита и анергии иммунного ответа на воздействие [123], а также при обострении хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта [191]. Установлено ингибирование апоптоза при сниженном питании у детского контингента [185]. Обнаружено, что Т-лимфоциты женщин более чувствительны к апоптозиндуцирующим факторам [250].

Вследствие постоянного поступления и накопления новых сведений о механизмах клеточной смерти, в том числе и в условиях негативного воздействия факторов среды обитания, усложняется понимание роли летальной программы клетки в поддержании гомеостаза организма.

На современном этапе науки выделяют больше десятка вариантов программированной клеточной гибели, среди которых апоптоз является наиболее распространенным и изученным. Между тем, несмотря на значительные успехи в расшифровке механизмов клеточной смерти и идентификации ключевых факторов программы включения / выключения апоптоза, на сегодняшний день показателей, имеющих раннюю диагностическую значимость, установлено в ограниченном количестве [127, 371]. В области медицинских наук и практического здравоохранения раннее обнаружение дисрегуляции иммунной системы позволит провести рациональное лечение своевременно выявленных заболеваний, а также позволит предупредить хронизацию патологического процесса и значительное число осложнений [75, 200, 245].

Очевидно, выявление механизмов реализации апоптоза, их закономерностей и особенностей под воздействием различных факторов позволит получить новые сведения о процессе клеточной гибели и патогенезе заболеваний,

ассоциированных с нарушением апоптотического сценария. Установленные новые сведения предоставят возможность совершенствовать иммунологические, биохимические и генетические методы ранней диагностики заболеваний с иммунологическим компонентом, что в итоге будет способствовать снижению иммуноассоциированной патологии у населения различных возрастных групп и в первую очередь у детей.

Апоптоз и его роль в иммунном ответе. Апоптоз – активная, генетически запрограммированная форма клеточной гибели, определяемая на основе специфичных морфологических превращений умирающих клеток [122, 124, 126, 133, 273, 297, 392, 413]. Являясь одним из значимых явлений, апоптоз отвечает за формирование антигенспецифической составляющей иммунной системы и в значительной степени реализацию ее эффекторных функций. Апоптоз – достаточно сложный механизм, в воспроизведении которого принимают участие множество различных факторов.

Годом признания апоптоза как физиологического явления считается 1972 г, когда английские исследователи Kerr, Wyllie, Currie продемонстрировали неопровержимые морфологические свидетельства наличия вновь открытого явления [122]. Этот закономерный клеточный феномен, наблюдаемый во всех ядродержащих клетках организма человека и животных, J.Kerr и соавторы назвали апоптозом (от греческого – «осеннее опадание листьев с деревьев»). Клеточное постоянство регулируется генетическими программами организма, одна из которых определяет интенсивность клеточного деления, другая – клеточную гибель [401].

Нарушение процесса апоптоза приводит к серьезным нарушениям в иммунной системе, что может проявляться в развитии различных аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний, вторичных иммунодефицитов [133, 171, 243, 270, 289, 294, 360, 363, 376, 408]. Первостепенное значение апоптоза и в реакциях отторжения чужеродных органов и тканей при их трансплантации [71]. Путем запрограммированной клеточной гибели происходит удаление клеток, выживание которых нежелательно для организма, например, мутантных клеток

или клеток, зараженных вирусом [340]. Известно, что апоптоз, являясь одним из основных регуляторов состояния иммунной системы, может определять течение и исход беременности [43, 392]. Нарушение программы апоптоза выявляется при инсульте, инфаркте миокарда, артериальной гипертензии [34, 89, 209, 359, 431], бронхиальной астме [251, 388], диабете, отдельных формах нефрита, шизофрении, нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона [122; 133], заболеваниях желудочно-кишечного тракта [324, 163], патологии гепатобилиарной системы [114, 3924 406] и мочевыводящей системы [122, 133].

При апоптозе происходит удаление отмирающих клеток посредством фагоцитоза без воспаления. Повышение при некрозе уровня ядерного белка HMGB1 (high-mobility group protein B1) в цитоплазме стимулирует аутофагию митохондрий и подавляет апоптоз. Аутофагия (внутриклеточная утилизация поврежденных органелл) возникает в результате избыточной деградации клеточной смерти. Непосредственные причины апоптотической гибели клеток окончательно не выявлены, однако некоторые исследователи полагают, что важную роль играет истощение энергетических ресурсов клетки [3; 8]. Изменение (падение или повышение) pH также не связано с регуляцией апоптоза, а представляет собой сопровождающее явление [368]. Согласно опубликованным данным, запрограммированная гибель клетки – результат баланса проапоптотических и антиапоптотических сигналов для клетки [339]. Преобладание проапоптотических или антиапоптотических влияний определяет выбор направления сигнализации в сторону гибели клетки по механизму апоптоза или ее выживания [378]. Апоптоз может возникнуть в результате воздействия различных повреждающих факторов, способных спровоцировать некроз, но действующих в незначительных дозах, например, под влиянием высокой температуры, ионизирующего излучения, противоопухолевых препаратов [3, 29, 68, 220, 370, 426]. Также современные данные говорят о кумулятивном повреждающем эффекте множества проапоптотических факторов (окислительный стресс, УФ-излучение, ионизирующая радиация, действие химических препаратов

и др.), действующих на клетки организма [25, 93]. В случае нарушения баланса факторов, регулирующих жизненный цикл клетки, возможен некроз.

Некроз и его роль в иммунном ответе. Апоптоз и некроз клетки являются неотъемлемой частью многих биологических процессов у многоклеточных организмов. Существуют доказательства, что апоптоз и некроз могут ингибировать друг друга. Некроз клеток всегда сопровождается воспалением и ведет к выраженному иммунному ответу и последующей репарации тканей [71]. Некроз может служить резервным путем программируемой клеточной гибели в случае ингибирования апоптоза [89, 188, 259]. Повреждение ДНК, вызванное химическими агентами или ионизирующим излучением, вызывает активацию некроза при ингибировании апоптоза. Существует негативная связь между апоптозом и программированным некрозом [46, 231]. В такой ситуации в неопухолевых клетках открываются пункты проверки, действующие во всех фазах интерфазы клеточного цикла и предупреждающие вхождение в митоз клеток с модифицированным геномом [89]. Считается, что одной из причин иммунологической толерантности при злокачественных опухолях является именно активация гибели клеток по программе апоптоза [42]. Также некроз может происходить как итог апоптоза в результате энергодифицита клетки [42] или в случае нарушений фагоцитоза [19]. «Сильные» стимулы обычно приводят клетку к некрозу из-за необратимого митохондриального повреждения и энергетической катастрофы. «Умеренные» смертельные стимулы способствуют прохождению запрограммированной клеточной смерти по механизму апоптоза, если уровень АТФ достаточен для активации апоптосомы [298]. Скорее всего, в отличие от апоптоза некроз не играет важной роли в развитии организма, но участвует в его защите от патогенных микроорганизмов и, по-видимому, в развитии воспалительного процесса [52]. Первичный некроз развивается независимо от действия каспаз, а в результате внешнего травматического повреждения; воздействием на рецепторы смерти; повреждением ДНК [71]. Оксидативный стресс, активные формы кислорода являются индукторами (управляемого) первичного некроза. Установлено, что некроз может осуществляться как

самостоятельная летальная программа, ключевую роль в которой играют белок PARP (поли (АДФ-рибоза) полимеразы-1, poly [ADP-ribose] polymerase), индукторы митохондриального окислительного стресса, некоторые каспазы а также ряд других ферментов [51, 141, 288, 320].

На сегодняшний день известно, что некроз может быть инициирован, так же, как и апоптоз, «внешним стимулом», таким как TNF и FASL, или «внутренним стимулом», таким как повреждение ДНК, в зависимости от типа клетки [130, 131, 196, 398]. Недавно обнаружена протеинкиназа 3 (рецептор протеинкиназы 3, receptor-interacting protein kinase 3, RIPK3), которая взаимодействует с рецептором и является ключевой эффекторной молекулой в процессе некроптоза. Немного позднее был идентифицирован субстрат для RIPK3 – псевдокиназа MLKL. Между тем очередность происходящих процессов, ведущих к гибели клеток после RIPK3-опосредованного фосфорилирования MLKL, на данный момент остается недостаточно изученной. Так, показано, что некротомный комплекс RIPK1 / RIPK3 / MLKL активирует фосфоглицерат-мутаза 5 (phosphoglycerate mutasefamily member 5, PGAM5) и родственный динамину белок 1 (Drp1), индуцируя фрагментацию митохондрий и запрограммированную гибель клетки [118]. PARP1 – инициированный запрограммированный некроз опосредован митохондриальным перемещением *bax*, но не *bak*. *Bax*, в свою очередь, вызывает некроз посредством высвобождения AIF (фактор индукции апоптоза, apoptosis inducing factor) из митохондрий [130]. PARP, который гиперактивируется вслед за повреждением ДНК и выключает синтез клеткой двух молекул-переносчиков энергии – АТФ и NAD (никотинамидадениндинуклеотид, nicotinamide adenine dinucleotide). От уровня ядерного глутатиона (nGSH) во время клеточного цикла зависит экспрессия генов и активность белков семейства PARP [38].

CD95-индуцированные и TNFR1-индуцированные сигналы могут раздваиваться на уровне каспазы-8: один путь ведет к активации эффекторных каспаз, тогда как другой – к активации митохондриального пути [87, 231]. Если каспазная активность не заблокирована, то каспаза-8 запускает апоптоз,

активируя классический каспазный каскад, в то же время, расщепляя и инактивируя RIP1 (receptor-interacting protein 1, взаимодействующий с рецептором белок 1) и RIP3. Если же активность каспазы заблокирована фармакологически или генетически, то RIP1 и RIP3 фосфорилируются и участвуют в запуске альтернативного механизма клеточной смерти, некроза [415].

Высказана гипотеза, что перекрещивание CD95 / CD95L и митохондриального пути может оказаться причиной резистентности не только к FAS-индуцированному апоптозу, но и к различным противоопухолевым агентам [87]. В условиях дефицита каспазы-8, как и в случае ее ингибирования, DISC (комплекс, индуцирующий смерть, death-inducing signaling complex) теряет способность к запуску апоптоза, и стимуляция лигандом TNF α , активно продуцируемого в том числе и макрофагами, приводит к запуску альтернативного механизма клеточной смерти, некроптоза [414]. Высвобождение цитохрома C может не индуцировать зависимый от каспаз апоптоз, и вместо этого происходит нарушение цепи электронного транспорта, что приводит к повышению генерации активных форм кислорода, уменьшению производства АТФ и снижению мембранного потенциала. Недостаточность компенсаторных механизмов при высоком уровне ROS может формировать различные типы клеточной гибели: апоптоз и некроз. Содержание ROS и скорость повышения активных форм кислорода определяют механизм клеточной гибели. Наряду с этим первоначальный источник ROS не играет никакой роли, поскольку существуют перекрестные связи между образованием ROS различными источниками [33]. Активация TNFR также может приводить к образованию ROS различными источниками, но в основном митохондриями [33]. Митохондриальные ROS повышают экспрессию специфического белка *FOXO1*, последний, в свою очередь, влияет на экспрессию ряда маркеров, в частности повышает экспрессию CD62L на мембране иммунокомпетентной клетки [355]. Гены семейства *FOXO* (*FOXO 1*, *FOXO 3*, *FOXO 4*, *FOXO 6*) также участвуют в регуляции клеточного цикла, выживания и дифференцировки [146]. Вклад в антиоксидантную защиту *FOXO3* вносит главным образом за счет повышения экспрессии генов Mn-

супероксиддисмутазы, металлотионеинов, митохондриального разобщающего белка UCP2, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы μ (GST μ) [31]. Необходимо подчеркнуть ключевое положение митохондрий не только в контроле программируемой смерти клетки, но также их участие в регуляции эффекторных механизмов.

Установлено, что в случае ингибирования апоптоза инициация некроза является дополнительным механизмом в регуляции иммунного ответа. Следует отметить, что при определенных условиях процесс реализации одной программы гибели на каких-то этапах может сменяться другой.

1.2. Щелочно–земельные металлы (на примере стронция) и клеточная гибель

Стронций как фактор загрязнения питьевой воды. Систематический мониторинг загрязнения воды водных объектов в местах водопользования населения, проводимый Федеральной службой по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, подтверждает неизменное присутствие стабильного стронция (Sr^{2+}) в воде на уровнях, соответствующих или превышающих установленные гигиенические нормативы (ПДК). В последние десять лет обозначилась проблема неблагоприятного влияния стабильного стронция на здоровье в связи с вовлечением в питьевое водоснабжение больших объемов артезианской воды водоносных горизонтов, где содержание стабильного стронция в 5–20 раз превышает предельно допустимое значение – 7 мг / л.

На формирование химического состава воды оказывают влияние множество факторов. Воздействие почвы на воды проявляется в изменении химического состава грунтовых и поверхностных вод, в формировании речного стока и водного баланса. Источниками некоторых металлов, в том числе и стронция, являются горные породы, на продуктах выветривания которых сформировались почвы. Насыщенность горных пород разного происхождения стронцием значительно отличаются (Таблица 1.2.1).

Таблица 1.2.1 – Содержание стронция в кислых и основных породах, мг / кг

Элемент	Средний гранит	Средний базальт
Sr	285	465

В литературе приводятся различные оценки средних содержаний (кларков) стронция, что является следствием различий в объеме и составе выборок [5]. Граниты по сравнению с базальтами обеднены стронцием (Таблица 1.2.2).

Таблица 1.2.2 – Оценки средних содержаний (кларки) стронция, мг / кг

Элемент	В гранитном слое (Беус и др., 1976)	В земной коре в целом	
		По А.П. Виноградову (1962)	По Тэйлору (1964)
Sr	230	340	375

Необходимо отметить, что стронций не принадлежит к числу токсичных S-элементов. Между тем накопление в организме стронция приводит к поражению всего организма (общетоксическое действие) [5]. Поступление стронция в организм даже в незначительных количествах оказывает различные эффекты на системы, органы и клетки, обладающие различными морфологическими и функциональными характеристиками, связанные с процессами клеточной активации [21, 78, 120, 154, 310, 318, 319].

Причинами различной чувствительностью населения к воздействию стронция являются генетический статус, возраст, состояние здоровья и питания, воздействие других токсичных веществ (например, сигаретный дым), а также высокая экспозиция Sr^{2+} [401]. Эти факторы приводят к снижению дезинтоксикационных процессов или экскреции стронция в организме. Люди с хронической почечной недостаточностью также более восприимчивы к избыточному поступлению стронция в организм вследствие сниженной способности экскретировать стронций из организма. Дефицит белка в организме в сочетании с употреблением этанола увеличивает включение стронция в костную ткань и снижает выведение стронция из организма через желудочно-кишечный тракт и мочевыводящую систему. Дети и взрослые, проживающие в районах с высокими уровнями стронция в питьевой воде, подвергаются более высокому

воздействию, чем население в целом. Эпидемиологические исследования продемонстрировали, что у детей, потребляющих продукты на основе зерновых культур, выращенных на почве с высоким содержанием стронция, регистрируется более высокая частота возникновения рахита [401]. В условиях экспозиции в митохондриях и лизосомах концентрация стронция определяется примерно в 5 раз выше, чем в цитозоле. Стронций вызывает деполяризацию мембран митохондрий, но не вызывает лизис органелл. Это один из возможных механизмов влияния стронция на регуляцию внутреннего апоптоза, в том числе и клеток костной ткани [268]. Дети и взрослые могут отличаться по своей способности адаптироваться к повышенной химической нагрузке. Дети имеют более высокие адаптационные возможности на негативное воздействие химических веществ, в частности, в отношении дебюта онкозаболеваний [318]. Однако из-за более высокого потребления кальция в период роста костей, в результате значительного поглощения и удержания стронция в организме, повышенного всасывания из желудочно-кишечного тракта дети в большей степени, чем взрослые, особенно в первые месяцы и годы жизни, подвержены влиянию стронция.

Исследования на животных показали, что, с одной стороны, стабильный стронций не токсичен при низких дозах [401]. С другой стороны, высокие пероральные дозы стабильного стронция могут серьезно угнетают сывороточные уровни 1,25-дигидроксивитамина D у крыс, что оказывает негативное воздействие на абсорбцию кальция. Примерно 20 % (диапазон 11–28 %) стронция, попадающего в организм пероральным путем, всасывается из желудочно-кишечного тракта. Точный участок абсорбции стронция в желудочно-кишечном тракте не установлен. Однако исследования, проведенные в системе *in vivo*, предполагают поглощение стронция в желудке и тонком отделе кишечника. Допускается повышенное поглощение стронция в неонатальном периоде у детей. В период беременности и лактации требуется повышенное поступление кальция в организм. Исследования, проведенные на животных, позволяют предположить, что поглощение стронция в эти периоды также будет повышено [119, 372].

Большая часть стронция, поступившая в организм, распределяется в костной ткани. Информация о распределении стронция в мягких тканях чрезвычайно ограничена. У крыс, которым в течение 3 месяцев вместе с питьевой водой вводили SrCl_2 в концентрации 3,4 мг / л, стабильный стронций определяли в сыворотке, печени, сердце, надпочечниках, головном мозге, костях [401]. Предполагают, что основная часть стронций в тканях на 50–80 % связана с белками. Однако полный спектр специфических белков, связывающих стронций, не идентифицирован. В селезенке обнаружены клетки с фенотипом клеток-предшественников остеокластов, циркулирующих в костном мозге. Выдвинута гипотеза, что микросреда селезенки не содержит критических сигнальных молекул или существуют ингибирующие сигналы для дальнейшего остеогенеза [422].

Определение биомаркер эффекта включает в себя биохимические или клеточные сигналы дисфункции ткани, а также физиологические признаки дисфункции. Биомаркер воздействия это, как правило, само вещество или конкретный метаболит вещества, идентифицированные в биосредах организма [358]. Так как первичный биомаркер эффекта в условиях воздействия стронция (Sr^{2+}), патологическое развитие костей, является поздней стадии негативного влияния стронция, необходимо определить перечень биомаркеров, определяющих предболезнь. К таким маркерам можно отнести сывороточные уровни витамина D, кальция, фосфора и щелочной фосфатазы, а также содержания стронция в биосредах (кровь) [401].

На современном этапе медико-биологических наук доказано, что между клетками костной и иммунной системы существует взаимодействие и взаимозависимые механизмы, направленные на поддержание гомеостаза. В костной ткани все составляющие компоненты не только находятся в определенном количественном соотношении между собой, но также специфически связаны. Клетки двух дифферонов участвуют в формировании и последующем поддержании (восстановлении) структуры костной ткани. Клетки одного дифферона (остеобласты, остециты и др.) – идентифицируются в костной

ткани. Следующий клеточный дифферон – дифферон мононуклеарных моноцитов (моноциты, макрофаги / остеокласты и др.) – также имеет отношение к костной системе [246]. Костный мозг – основной орган лимфо- и гемопоэза. Вместе с тем костный мозг является местом скопления эффекторных клеток адаптивного иммунитета (например, плазмочитов) [112]. Иммунитет осуществляет различные клеточные программы: клеточный цикл, апоптоз, дифференцировка, обновления тканей отвечают гормон паращитовидной железы (паратгормон), щитовидной железы (кальцитриол), цитокины и другие физиологические регуляторы, которые участвуют в контроле превращения прекурсоров миелоидно-лейкоцитарного ряда в остеокласты, что подтверждает совместную деятельность костной и иммунной систем.

Система RANKL / RANK / OPG является ключевым регулятором гомеостаза костной ткани и в то же время система RANKL / RANK / OPG принимает активное участие в иммунорегуляции [387]. Доказано участие RANKL-RANK-OPG–сигнализации в развитии эффекторных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [67]. Система FASL / FAS играет одну из ключевых ролей в поддержании иммунологического гомеостаза, а также является важным участником костного гомеостаза [97, 387, 397]. Система RANKL / RANK / OPG участвует в регуляции функционирования предшественников остеокластов, тогда как FASL / FAS регулирует активность зрелых остеокластов [269, 387, 326]. RANKL продуцируется остеобластами, активирующими Т-лимфоцитами, а также Th1-лимфоцитами и Th17 [409, 417]. Многие из RANKL-позитивных клеток относятся к подмножеству CD3⁺-клеток и CD4⁺-клеток [327]. Высокий уровень CD4⁺ крови связан с низкой резорбцией костной ткани. CD4⁺, но не CD8⁺ Т-лимфоциты, являются клетками, ответственными за синтез цитокинов, ингибирующих остеокластогенез (IFN γ и GM-CSF) [313]. RANKL подавляет транскрипционную активность FOXO (антиоксидантная активность которого реализуется через регуляцию высвобождения SOD, каталазы, GPx) и повышает дифференциацию и выживаемость остеокластов [206, 390]. Доказано участие RANKL в регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток посредством

активации антиапоптозной АКТ / PKB киназы через комплекс Src-киназы и фактора TRAF6 [317]. Наличие RANKL необходимо для индуцирования иммунной толерантности, способствуя дифференциации Treg-клеток для предотвращения развития ряда аутоиммунных заболеваний [417]. Высокий уровень RANKL дозозависимо повышает экспрессию FAS у предшественников остеокластов и может отрицательно регулировать численность их пула, тогда как на зрелых остеокластах и некоторых клетках RANKL других уменьшает экспрессию FAS и продлевает их выживание [381, 387, 422]. FASL и RANKL являются членами суперсемейства TNF, поэтому их внутриклеточные сигнальные пути перекрещиваются друг с другом на нескольких уровнях, создавая множество взаимодействий, что приводит к модуляции передачи сигналов посредством FAS и RANK [381]. Очевидно, существует взаимосвязь между RANKL и иммунокомпетентной клеткой. Вместе с тем, какая клетка является продуцентом RANKL, имеет решающее значение для организма: на клетки иммунной или костной системы будет оказан эффект.

Анализ и обобщение современных литературных данных выявил ряд противоречий о роли системы FAS / FASL в регуляции костного метаболизма. Ряд исследователей выявили экспрессию FAS как на остеобластах, так и остеокластах [422], другие – только на остеобластах [202]. Одни авторы утверждают наличие FASL на остеокластах [261], между тем другие отрицают данный факт [381, 387].

На сегодняшний день большинство исследователей придерживаются мнения, что FASL и FAS экспрессируются как на остеокластах, так и на остеобластах под воздействием цитокинов. При этом уровни FASL и FAS на остеокластах и остеобластах зависят от стадии их дифференцировки и микроокружения [269]. Дефицит FASL, по одним данным, увеличивает костную массу, по другим – показано, что у FASL-дефицитных мышей костная масса уменьшена [269]. Вопрос о клетках-продуцентах FAS-лиганда, оказывающего влияние на клетки костной ткани, до сих пор остается дискуссионным, однако наиболее вероятными кандидатами являются активированные Т-лимфоциты, моноциты / макрофаги, NK-клетки, а также зрелые остеокласты [381].

Апоптоз остеокластов, вызванный клетками остеобластного ряда с помощью системы FAS / FASL, играет важную роль в поддержании костной массы, как в физиологических условиях, так и при ряде заболеваний костно-мышечной системы [326]. Существуют экспериментальные подтверждения, что *in vitro* и *in vivo* эстроген, индуцируя экспрессию FASL на остеобластах, вызывает апоптоз предшественников остеокластов [197]. Между тем в настоящее время предполагают неапоптотическую роль FAS в регуляции дифференцировки и созревания остеобластов [381, 387]. На мышах линии C57BL показано, что для ингибирующего влияния FAS на остеобластную дифференцировку необходима активация каспазы-8 [197]. Также активация FAS возможна при участии фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3Ks) (активность которой повышается при увеличении уровня ионов кальция), и этот путь является каспаз-8 – независимым [381]. Ингибирование FAS может иметь остеозащитные эффекты при развитии некоторых заболеваний костной системы [381].

Доказано участие системы TNFRI / TNF в костном метаболизме. TNFRI способствует остеокластогенезу, тогда как TNFRII – ингибирует данный процесс [164, 409]. Однако доказано участие TNFRI в выживании остеобластов, посредством чего регулируется дифференцировка остеокластов [393]. Связывание TNFRI с TNF запускает апоптоз или активацию транскрипционных факторов NF-κB и AP-1. Экспериментально подтверждена роль транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 в дифференцировке и активации остеокластов. TNFRI передает сигналы, которые регулируют экспрессию RANK, и поддерживает остеокластогенез. Перекрывающиеся сигнальные механизмы RANKL и TNF приводят к выраженному остеокластогенезу и опосредуют резорбцию кости [409]. Также активированные NF-κB, AP – запускают транскрипцию генов, кодирующих провоспалительные цитокины, такие как TNFα, IL2, IL1β и др. Активация TNFRI на остеобластах приводит к высвобождению IL6, который активирует остеокласты.

Накопленные современные данные продемонстрировали, что Treg не только центральные регуляторы иммунного ответа, но также являются ключевыми

регуляторами гомеостаза костной ткани. При некоторых заболеваниях костной ткани снижается количество и активность Treg [176]. Показана способность T-регуляторных клеток подавлять дифференцировку остеокластов в системах *in vitro* и *in vivo* [143]. Treg могут ингибировать образование остеокластов путем прямого контакта через цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген (CTLA-4) или путем секреции противовоспалительных цитокинов, таких как IL4, IL10 и TGF- β . Напротив, клетки Th17 способны стимулировать образование остеокластов и резорбцию кости путем образования высоких уровней IL17, RANKL и TNF α [176, 263]. Между тем генетическим картированием определено, что Th17, индуцирующие RANKL на синовиальных фибробластах, ранее являлись Treg, экспрессирующими Foxp3, но под действием IL6 приобрели фенотип Th17 [417].

Реципрокные взаимоотношения между субпопуляциями Treg и Th17 предполагают, что они могут иметь определяющее влияние на характер ответа иммунной системы – толерантность или активацию – в ответ на действие антигена (гаптена). Изучение механизмов взаимодействия между Th17 и Treg показало, что транскрипционные факторы – ROR γ t / ROR α и FOXP3 – подавляют функции друг друга. Арил-углеводородный рецептор (AhR), экспрессирующийся как в Treg, так и в Th17, может оказывать разное действие на дифференцировку этих клеток в зависимости от лиганда [391]. С одной стороны связывание AhR с одним из естественных лигандов FICZ (6 formylindolo [3, 2b] carbazole) способствует дифференцировке Th17. С другой стороны – связывание AhR с некоторыми синтетическими лигандами, в первую очередь увеличивает экспансию Treg за счет повышения экспрессии FOXP3 [254]. IL17 повышает активацию каспазы-3 и каспазы-9, повышает соотношение bax / bcl-2 [346], индуцирует синтез TNF α [64] и металлопротеиназ. IL17 подавляет экспрессию p53 [254], p53 усиливает транскрипцию Foxp3 [410]. Изменение экспрессии bcl-2 в клетках может быть либо первичным, либо вторичным. Церамид, накопление которого происходит при избытке ROS, способствует дефосфорилированию антиапоптотического белка bcl-2, что приводит к индукции апоптоза по

митохондриальному пути. Дефицит p53 усугубляет аутоиммунный процесс, вызывая дисбаланс Th17 / Treg [346]. Одна из функций регуляторных Т-клеток – координация событий, ведущих к иммунному ответу – снижение активности антигенпрезентирующих клеток, подавление провоспалительных цитокинов, апоптозу. Дисбаланс в системе Th17 / Treg является признаком дисрегуляции в иммунной системе в условиях повышенной антигенной (гаптенной) нагрузки. Несмотря на противоположные функции у Th17 и у Treg, эти две субпопуляции тесно связаны в своем развитии и биологической активности и являются единой системой регуляции иммунного ответа.

Установлена значимая роль цитокинов в механизмах ремоделирования костной ткани. Цитокин Th2 ингибирует образование и функцию остеокластов *in vitro* и *in vivo*. Это торможение предполагает прямое воздействие IL4 на остеокласты, IL10 – за счет уменьшения дифференциации только предшественников, без какого-либо влияния на зрелые остеокласты [313].

TNF способствует остеокластогенезу, стимулируя созревание остеокластов и вызывая продукцию RANKL [173, 263, 352, 381], а также ингибируя продукцию остеопротегерина [164]. TNF, подавляя Wnt-сигнал, снижает созревание остеобластов [164]. Фактор некроза опухоли ответственен за снижение синтеза коллагена I типа, активности щелочной фосфатазы и экспрессии остеокальцина *in vitro*. Длительное воздействие TNF приводит к снижению экспрессии FASL в остеобластах посредством активации NF-κB [326]. Ряд исследователей выдвинули гипотезу, согласно которой CD4⁺ Т-клетки (включая клетки Th17) и провоспалительный цитокин TNF-α являются первичными факторами, ответственными за потерю костной массы [263].

Остеобласты, экспрессируя VEGF, вызывают типичные изменения костной ткани при ревматоидном артрите. Витамин D₃ значительно усиливал экспрессию VEGF в нормальных и патологических остеобластах [164]. VEGF повышает дифференцировку предшественников остеокластов и последующую миграцию зрелых остеокластов в будущую зону резорбции, а также вызывает продукцию RANKL в синовиальных фибробластах при ревматоидном артрите [275, 362].

Показано участие ряда внутриклеточных белков, обладающих антиапоптотическим и проапоптотическим действием, в костном ремоделировании. На фоне изменения уровней экспрессии белков семейства BCL-2 остеопротегерин индуцирует апоптоз предшественников остеокластов и зрелых остеокластов частично через активацию FAS / FASL, а также через апоптоз, опосредованный митохондриями [328].

Показано, что повышение экспрессии bax и снижение экспрессии bcl-2 приводит к гибели остеобластов, что также создает предпосылки к формированию серьезных заболеваний опорно-двигательного аппарата [257]. ROS способен изменить баланс bcl-2 / bax [376]. Избыточный уровень ROS, нарушая работу митохондрий, способствует потере костной ткани [390].

Доказано участие протеина p53 в костном метаболизме: p53 регулирует дифференцировку остеобластов, дефицит p53 приводит к усиленному остеобластогенезу [248, 269], p53 подавляет остеогенез [114].

Очевидно, дисбаланс в работе FASL / FAS, TNFRI / TNF, Treg / Th17, RANKL / RANK / OPG, цитокиновый дисбаланс, нарушение внутриклеточных проапоптотических и антиапоптотических сигналов могут спровоцировать развитие заболеваний костно-мышечной системы, ассоциированной с иммунной системой [227, 238].

Следовательно, стронций, поступающий в организм в избыточном количестве, может вызвать целый ряд изменений, в том числе и негативных, в различных органах и системах, что сопровождается напряжением регуляторных систем, к которым относится иммунная система, связанная с костной системой. Доказанные причинно-следственные связи негативных ответных реакций организма на воздействие факторов внешней среды (стронций) являются необходимыми для описания патогенетических механизмов заболеваний, обусловленных гаптенами различного происхождения.

Регуляция стронцием апоптотического сигнала в лимфоцитах. Стронций, будучи изоформен кальцию (Ca^{2+}) и обладая высокой подвижностью, способен блокировать ионные каналы для последнего, воздействовать на

кальцийзависимые рецепторы и конкурировать за активные участки белков, не выполняя физиологической функции, что формирует модифицирующее влияние стронция на иммунную реакцию [78]. На изменение концентрации кальция реагируют каналы, помпы, экспрессия генов, защитных молекул, NO и др. Стронций (Sr^{2+}) может заменить Ca^{2+} и стимулировать множество функций многочисленных типов клеток [154]. Важнейшей функцией кальция является его участие во множестве сигнальных путей клетки. Sr^{2+} оказывает свое влияние посредством взаимодействия с кальцийзависимым рецептором на клетке, однако в дальнейшем, в отличие от ионов кальция, использует различные пути трансдукции внутриклеточных сигналов. Эта разница в соответствующих сигнальных каскадах позволяет Sr^{2+} усиливать Ca^{2+} -индуцированный ответ клетки, и наоборот [386]. Между тем, есть сообщения, что стронций оказывает пролиферативный и антиапоптозный эффект на клетки организма (например костной ткани), не используя Ca-зависимые рецепторы [147]. Однако часто трудно выявить различия между эффектами различных сигнальных путей, интенсивностью передачи сигналов, продолжительностью сигнала и потенциалом неблагоприятной синергии среди параллельных путей, если один из них классифицирует данный стимул как адаптивный или неблагоприятный. Учитывая биологическую активность Ca^{2+} , поддержание определенных концентраций ионов во внеклеточном пространстве и его распределение между отдельными компартментами является объектом строгой регуляции со стороны специальных физиологических и биохимических систем организма и определенных клеточных элементов. Данный контроль реализуется наличием высокочувствительных к Ca^{2+} белковых систем, способных реагировать на следовые, микромолярные концентрации этого катиона. В связи с тем что кальций выполняет ключевую роль мессенджера, а также Ca^{2+} является важным регулятором многих жизненно важных метаболических и генетических процессов клетки, нарушение транспорта и внутриклеточного распределения этого иона играет важную роль в молекулярных механизмах развития многих патологических процессов, в основе

которых может быть нарушение клеточной гибели по пути апоптоза и/или некроза.

Предполагают существование во внеклеточном домене Ca-чувствительного рецептора (CaR) различных по биохимическому составу сайтов (та) для Sr^{2+} и Ca^{2+} , что приводит к активации отличных сигнальных путей при связывании соответствующих ионов с рецептором [144, 148, 368, 375]. Комплекс CaR с агонистом может активировать несколько комплексов G-белков с эффекторами и инициировать различные сигнальные пути. Так, фосфатидилинозитол-3-киназу (phosphoinositide 3-kinases, PI3K) стимулируют G α i и рецепторные тирозинкиназы, вызывая PI3K / Akt сигналинг [378, 308]. Белок G α q активирует фосфолипазу C (phospholipase C, PLC), катализирующую распад мембранных фосфолипидов, в частности – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (phosphatidylinositol biphosphate, PIP₂) до инозитол-1,4,5-трисфосфата (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP₃) и диацилглицерол (diacylglycerol, DAG). IP₃ способствует выбросу двухвалентных ионов кальция из внутриклеточного депо (эндоплазматического ретикулума), и при этом повышается внутриклеточная концентрация ионов кальция. DAG под действием PLC остается связанным с мембраной и стимулирует протеинкиназу C (protein kinase C, PKC), запуская последовательный каскад митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK): RAS, RAF-1, MEK (киназа киназы MAP, MAP kinase kinase), ERK-1 / 2 (киназы, регулируемые внеклеточными сигналами, extracellular signalregulated kinases) [242]. Каскад MAP-киназы также вовлекается в ответ при активации Ras. Экспериментально установлено, что Sr^{2+} повышает транслокацию NF- κ B с участием именно изофермент PKC β II, для активации которого требуются мембранные фосфолипиды, кальций и сложные эфиры диацилглицеринфорбола (Рис. 1.2.1) [386]. Сложность устройства и особенности ядерной транслокации NF- κ B позволяют клетке различным образом реагировать на всевозможные стимулы, что ведет к неодинаковым последствиям.

Стронций обладает способностью модифицировать компоненты клеточных сигнальных путей независимо от CaR [147]. Предполагается прямое воздействие

Sr^{2+} на FGFRs (fibroblast growth factor receptor, факторы роста фибробластов), которые являются трансмембранными тирозинкиназными рецепторами (receptor tyrosine kinases, RTK). Активация стронцием FGF / FGFR – системы приводит к повышению Akt, ERK1,2, p38 и PLC γ -опосредованной сигнализации [151].

Возбуждение RTK, в частности VEGFR-2, активируя компоненты сигнальных внутриклеточных путей p38 MAPK, обуславливает регуляцию апоптоза [219]. Возбуждение VEGFR-2 также приводит к активации факторов транскрипции STAT1 и STAT3 (трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции, signal transducer and activator of transcription), усилению продукции простагландинов (PG) и повышению экспрессии eNOS. В свою очередь STAT3 усиливает транскрипцию генов VEGF. Наличие положительной обратной связи между процессами активации STAT3 и продукции VEGF обуславливает их пролонгированную гиперэкспрессию. Длительная активность STAT3 сопровождается постоянной продукцией антиапоптотических протеинов, в частности Bcl-2, что обуславливает формирование апоптозрезистентности клеток.

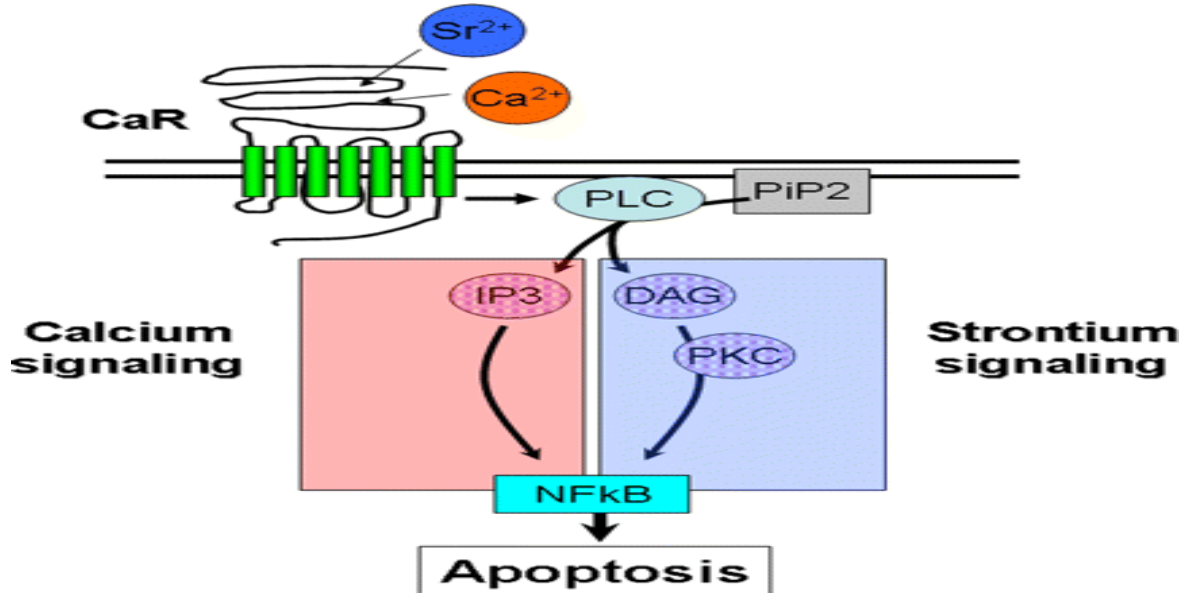


Рисунок 1.2.1 – Схема, суммирующая роль, которую выполняет CaR в Sr^{2+} - и Ca^{2+} - индуцированном апоптозе (Hurtel-Lemaire A.S. et al., 2009)

Основной функцией киназного каскада PI3K–Akt является предотвращение клеточной гибели [68, 337]. Активность PI3K повышается при увеличении уровня ионов Ca^{2+} . PI3-киназа вовлечена в передачу сигнала от рецепторов рецептор

фактора роста с тирозинкиназной активностью в активированных В- и Т-клетках [149]. В итоге конформационной перестройки каталитический домен p110 PI3K приобретает ферментативную активность и катализирует превращение PIP2 в PIP3, необходимый для последующих реакций фосфорилирования Akt. Akt осуществляет свое действие путем фосфорилирования mTOR (мишень рапамицина, mammalian target of rapamycin), активирующий bcl-2 [167] и транскрипционного фактора NF-κB [312]. В результате Akt-опосредованного фосфорилирования ингибируется активность GSK3 (киназа 3 гликогенсинтазы, glycogen synthase kinase-3), а ингибирование GSK3 приводит к повышению уровня bcl-2 [383]. Также Akt-зависимое фосфорилирование белка MDM2 способствует убиквитинзависимому протеолизу белка p53 [407]. Помимо этого киназа Akt может напрямую подавлять апоптоз, фосфорилируя (ингибируя) белок Bad и каспазу-9 [267]. Белок PTEN – липидная фосфатаза (гомолог фосфатазы и тензин, phosphatase and tensin homolog) – является негативным регулятором PI3K / Akt сигнального пути. Активация PI3K, находящейся на пересечении сигнальных путей от многих рецепторов, ведет к повышению активности MAP-киназ – ключевых регуляторов клеточного цикла (Рис. 1.2.2). Активация Akt-пути ингибирует активацию прокаспазы-8, которой принадлежит одна из ключевых ролей в регулировании MAPK-каскада. Дисфункцию митохондрий инициирует каспаза-8. Взаимодействие Akt с прокаспазой-9 осуществляется напрямую. Однако на сегодняшний день не установлен механизм инактивации Akt. Возможно прямое ингибирование каталитической активности каспазы-9. Установлено, что различные регуляторы апоптоза зависят от активности Akt на уровнях транскрипции или посттрансляционных изменений [378].

Главное свойство Wnt / β-катенин (beta-catenin) – сигналинга состоит в способствовании пролиферации клеток, что провоцирует развитие новообразований [101, 420]. Wnt-сигнал начинается с образования комплекса Wnt с LRP5/6 и рецептором Фрайзлед (Frizzled, Fz), что приводит к активации белка Дишевеллд (Dishevelled, DSH). Это ингибирует «деградационный комплекс» и «выключает» убиквитилирование β-катенина [339]. Киназа гликогенсинтаза-3

(GSK3) негативный регулятор сигнального Wnt-пути. Накопленный β -катенин транслоцируется в ядро, где он формирует активный транскрипционный комплекс с TCF/LEF (Т-клеточный фактор и лимфоидный усиливающий фактор, T cell factor/lymphoid-enhancer factor) и инициатором транскрипции p300 [281]. Успешная сборка транскрипционного комплекса ведет к целенаправленной активации генов [420]. Sr^{2+} может увеличить экспрессию β -катенина, рецептора Frizzled и вдобавок тормозить экспрессию Wnt-ингибиторов, предотвращая деградацию β -катенина [374]. Передача сигнала от лигандов Wnt может также осуществляться с помощью рецепторов тирозиновых киназ [229], RTK рассматривают как ко-рецепторы неканонического сигнального пути Wnt, где активируется PLC и осуществляется соответствующий каскад событий. Не исключается взаимодействие между стронцийиндуцированной активацией Wnt-пути и митоген активируемым протеинкиназным каскадом (MAPK) [374]. С одной стороны, сигнальный путь MAPK может регулировать канонический Wnt / β -катенинзависимый путь в результате инактивации киназа 3 гликогенсинтазы (GSK3), с другой стороны, Wnt3a может активировать протеинкиназу p38 [374]. Обнаружена возможность стронция осуществлять активацию Wnt-сигнального пути при участии CaR [9].

Показано, что белок p53 может оказывать воздействие как на внешний, так и на внутренний путь индукции апоптоза [109]. 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. На транскрипционном уровне протеин p53 реализует одномоментно и активацию гена *bax*, и репрессию гена *bcl2*, а также может трансаktivировать некоторые киллерные рецепторы, в частности FAS и KILLER / DR5 [50]. Действуя самостоятельно от своей транскрипционной функции, p53 может вызывать апоптоз за счет прямого взаимодействия с белками BAX [144], Bcl-XL [174]. Установлено, что транскрипционный фактор NF κ B оказывает влияние на регуляцию апоптоза по нескольким механизмам, причем

обычно он вызывает антиапоптозный эффект. Ингибиторная субъединица I κ B α транскрипционного фактора NF κ B может связывать и удерживать в цитоплазме p53, ингибируя функцию p53 включения задержки клеточного цикла и апоптоза [429]. Но, парадоксальным образом, активность NF κ B оказывается необходимой для полноценной индукции клеточной смерти под действием p53 [109]. Предполагают, что NF κ B, объединяясь с p53, может участвовать в регуляции ряда генов, участвующих в индукции апоптоза, например, рецептор клеточной смерти KILLER / DR5 [402].

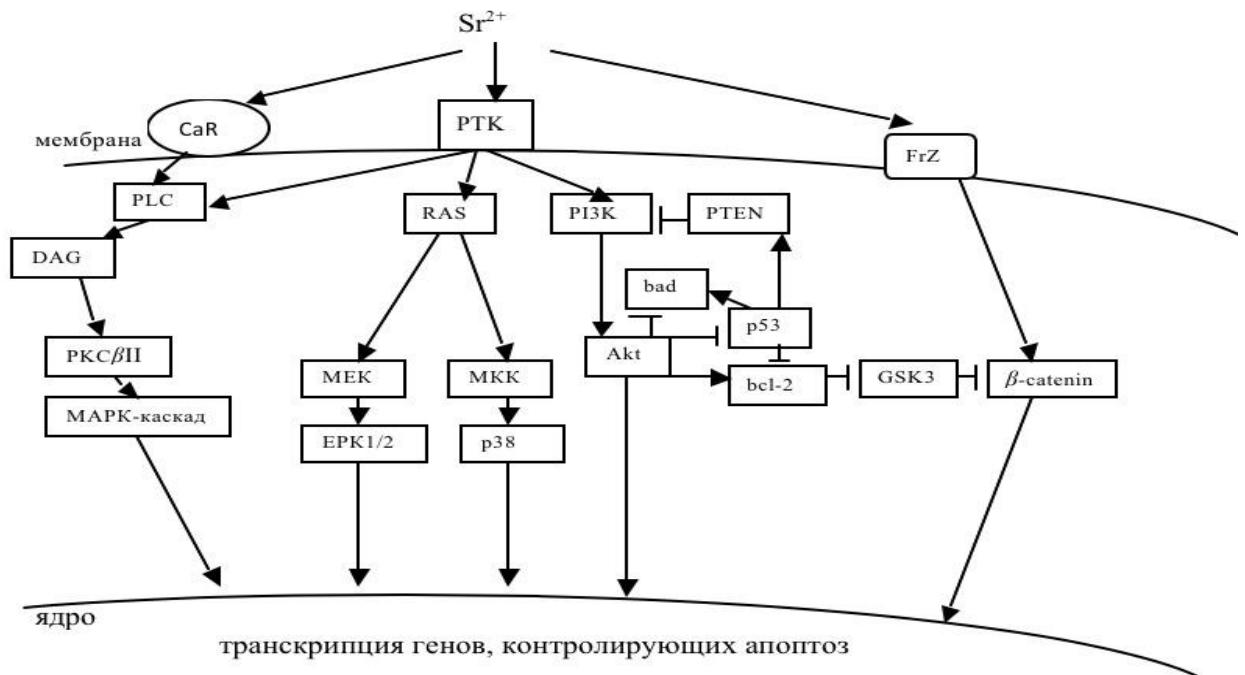


Рисунок 1.2.2 – Гипотетическая схема регуляции стронцием апоптоза в иммунокомпетентной клетке; CaR – Ca-чувствительный рецептор; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PLC – фосфолипаза C; DAG – диацилглицерол; MAPK – митогенактивируемый протеинкиназный каскад; FrZ – рецептором Фрайззлед; GSK3 – киназа гликогенсинтаза-3; PTEN – липидная фосфатаза; RTK – тирозинкиназный рецептор; ERK-1 / 2 – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; MEK – киназа киназы MAP, MKK – митогенактивируемая киназа киназ

Белок p53 транскрипционно регулирует протеинфосфатазу PTEN [212], последний является негативным регулятором PI3K / Akt – сигнального пути. При активации p53 происходит подавление активности mTOR, сбережение энергии, увеличение активности FOXO [109].

Необходимо отметить, что вне стрессов белок p53 делает возможным поддержание низкого уровня кислородных радикалов внутри клетки, тем самым выполняет важную антиоксидантную функцию. Наряду с p53-индуцируемыми генами, проявление которых сопровождается повышением уровня кислородных радикалов, p53 повышает экспрессию также ряда антиоксидантных белков, таких как глутатионпероксидазы Gpx1, Gpx2 [423], супероксиддисмутаза SOD2 [109]. Гипотетическая схема регуляции стронцием апоптоза в иммунокомпетентной клетке представлена на рисунке 1.2.2.

Апоптоз включается разнообразными иницирующими факторами, при этом используются различные сигнальные пути, которые, перекрещиваясь друг с другом, формируют согласованный ответ в виде различной стадийности жизненного цикла клетки. Из-за сложностей внутриклеточной сигнализации и внутренних различий между клетками различных типов можно предположить, что Sr^{2+} может проявлять некоторые различия в сигналинге. Часто с прохождением проапоптотического сигнала возбуждается антиапоптотический сигнал, пытающийся спасти клетку от стресса.

Стронций и активация иммунокомпетентной клетки. L-селектину (CD62L, Lu-22, LAM-1, LECAM, MEL-14) принадлежит ключевая функция в регуляции кинетики пула иммунокомпетентных клеток [283], также CD62L может выполнять функцию рецептора сигнализации, изменяя транслокацию ряда генов [198]. Падение уровня L-селектина и, как следствие, увеличение концентрации растворимых форм молекул клеточной адгезии описано в патогенезе многих заболеваний и является маркером клеточной активации [306, 312, 350]. Снижение уровня CD62L на уровне вторичных лимфоидных органов является необходимым условием для реализации первичного иммунного ответа [168].

Шеддинг (индуцированная потеря рецепторов клеточной мембраной) чаще всего является следствием процессов активации, затрагивающих всевозможные популяции клеток. Двухвалентные катионы Ca и Sr действуют как негативные

аллостерические модуляторы, снижая сродство АТФ к ряду пуринорецепторов, в частности к P2X7R [367, 374], и изменяют экспрессию активационных молекул.

Шеддинг CD62L связан с активацией пуринорецепторов АТФ. Во время клеточного стресса (например: гипоксия, карциногенез, оксидативный стресс, воспаление) из внутриклеточного пространства во внеклеточное происходит освобождение АТФ. АТФ может выделяться в неконтролируемой манере, например, при некрозе, когда клеточная мембрана теряет свою целостность и всё что было внутри неё (включая АТФ), пассивным путём выходит наружу. Погибшими клетками усиленно экспрессируется АТФ, давая сигнал «найди меня», и иммунокомпетентные клетки, несущие P2Y2-рецептор, могут активизироваться для участия в фагоцитозе.

Передача сигналов для участия в шеддинге происходит через P2X ионотропные рецепторы и P2Y – метаботропные рецепторы. Повышение содержания свободного кальция происходит за счет экзогенного Ca^{2+} и за счет высвобождения его из кальцийсвязывающего белка. Увеличение уровня цитоплазматического содержания Ca^{2+} , активация Ca-K каналов и Ca-Cl – каналов происходит в результате взаимодействия АТФ с пуринорецепторами P2Y на поверхности клеточной мембраны [314, 315]. Увеличение цитозольного уровня Ca^{2+} способствует шеддингу CD62L [306]. Первоначальный Ca^{2+} – сигнал, инициируемый внеклеточным АТФ и другими агонистами P2Y-рецепторов, стимулирует масштабный выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что и продуцирует вторичный Ca^{2+} – ответ, не зависящий от концентрации агониста [76]. При связывании АТФ с P2X рецепторами происходит приток Na^+ , Ca^{2+} и отток K^+ из внутриклеточного пространства. Сигнальные процессы, индуцированные внеклеточным АТФ, помимо увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках, включают производство активных форм кислорода и окись азота (NO). Увеличение кальция внутри клетки ведёт к активации многочисленных кальцийзависимых сигнальных путей. Можно говорить о ключевой роли пуринорецепторов, которые сопряжены с фосфоинозитидным каскадом, в пуринергической трансдукции [76; 128].

Шеддинг CD62L возможен в результате внеклеточного накопленного АТФ [208], повышения ядерной транслокации NF-κB и уровнем IL6 [312; 342]. Доказано участие различных металлопротеиназ в шеддинге CD6L [198]. АТФ, стимулируя пуринергические рецепторы P2Y, модулирует активность фосфолипазы C, мобилизует внутриклеточный Ca²⁺, повышает активность NF-κB [128]. Экспрессия CD62L контролируется уровнем активных форм кислорода [355]. Активация P2X7R может привести к образованию внутриклеточного ROS, что приводит к ряду биохимических процессов в клетке [306], в том числе запускает «внутренний» путь апоптоза в Т-клетке [353]. До 80 % Ca²⁺, поступающего в цитозоль, захватывают митохондрии. От уровня Ca²⁺ в митохондриях и потенциала мембраны зависит синтез АТФ. Увеличение концентрации ионов Ca²⁺ в матриксе митохондрий приводит к увеличению генерации кислородных радикалов. Установлено, что активация P2X7R на мышинных CD4⁺ Т – лимфоцитах связана с экстернализацией фосфатидилсерина (PS) [353]. Однако экстернализация PS возможна в том случае, когда в клетке повышен уровень митохондриальных ROS. То есть реализация апоптоза возможна в случае функциональной активности P2X7R, так как данные рецепторы участвуют в образовании крупных пор, запуская апоптоз [300]. ROS потенцируют активность ряда P2X – рецепторов через внутриклеточный остаток Cys430 [353] и активируют рецептор CD62L [314, 315]. Стронций по свойствам близок к кальцию, поэтому может заменять влияние экстрацеллюлярного Ca²⁺ на клетку и изменять его внутриклеточную концентрацию, тем самым участвуя в регуляции иммунного ответа.

Активация клеток изменяет экспрессию различных молекул, в итоге отражая происходящие внутриклеточные активационные процессы и степень созревания клетки. По результатам экспериментальных исследовательских моделей установлено, что стимуляция различными антигенами при их разном дозовом варианте повышает на иммунокомпетентных клетках экспрессию поверхностных маркеров CD95, тогда как экспрессия CD62L снижается [413].

Методом проточной цитометрии установлено, что в условиях различной антигенной стимуляции на иммунокомпетентных клетках (спленоцитах), полученных из трансгенных мышей линии *C57BL/6*, при активационных процессах возрастает экспрессия поверхностных маркеров CD25, CD44, CD69, CD86, CD95, тогда как экспрессия CD62L снижается [168, 198, 413]. В опухолевых клетках линии *Jurkat* и Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров показано, что при обработке культур ингибитором каспаз ZVAD.fmk (N-бензоилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-трифторметилкетон) и антителами anti-CD95 отсутствовало сбрасывание CD62L с мембран клеток, а также был ингибирован FAS-зависимый апоптоз [198; 413]. Оценка поверхностного фенотипа (активационного профиля) внутрипеченочных лимфоцитов, выделенных от живых доноров, а также лимфоцитов периферической крови доноров показала повышенное количество CD95-рецептора при одновременном снижении экспрессии CD62L-рецептора на анализируемых иммунокомпетентных клетках [168]. Во вторичных лимфоидных органах и печени преобладают активированные лимфоциты, в то время как в периферической крови – преимущественно наивные лимфоциты высокоэкспрессирующие CD62L [168].

В иммунной системе сигнальный путь MAPK-киназ вовлечен в регуляцию иммунного ответа, в частности в активацию Т-лимфоцитов [96, 355]. Показано, что в различных клеточных системах митогенактивируемым протеинкиназным (MAPK) подавляется CD95-опосредованный апоптоз на уровне активации каспазы-8, при этом, не оказывая влияния на формирование DISC [295]. CD62L, являясь маркером клеточной активации [283; 306], также может функционировать как рецептор сигнализации в силу своей связи с тирозинкиназой, лигирование L-селектина приводит к увеличению фосфорилирования тирозина и способствует повышению активности MAPK [198]. Таким образом, вышесказанное позволяет полагать, что уровень экспрессии CD62L на иммунокомпетентных клетках будет сопряжен с изменением на их мембране экспрессии CD95, будет отражать изменения, происходящие в ответ на антиген (гаптен), в частности,

характеризовать степень активационных процессов в лимфоцитах и участие клетки в FAS-зависимом апоптозе.

На основании детального изучения апоптотической активности иммуноцитов в условиях воздействия стронцием необходимо отметить, что эффекты стронция будут зависеть от дозы, времени воздействия, типа клетки и активационного статуса клетки [375].

1.3. Галогенорганические соединения (на примере хлороформа) и клеточная гибель

Хлороформ как фактор загрязнения питьевой воды. Зачительный уровень микробиологического загрязнения предписывает необходимость, в случае использования поверхностных вод в качестве источника хозяйственно-питьевого водоснабжения, усиленного обеззараживания воды, что приводит к повышенному содержанию хлора и его производных в питьевых водах. Процедура хлорирования водопроводной воды на станции водоподготовки при подаче в систему хозяйственно-питьевого водоснабжения населения является источником опасности загрязнения воды системы хозяйственно-питьевого водоснабжения не только хлором, но и при существующем уровне санитарно-химического загрязнения воды источника водоснабжения побочными продуктами – галогенсодержащими соединениями, большую часть которых составляют тригалометаны: хлороформ (CHCl_3), дихлорбромметан (CH_2BrCl_2), дибромхлорметан ($\text{CH}_2\text{Br}_2\text{Cl}$). Необходимо отметить, что в исходной воде, поступающей на водоподготовку, содержание хлороформа (рассматриваемое как индикатор содержания в ней продуктов хлорирования) [28] может быть незначительным и увеличивается только на этапах обработки воды после хлорирования.

В хлорированной воде отмечается присутствие нескольких десятков различных галогенорганических соединений, а наиболее часто обнаруживаются хлороформ и четыреххлористый углерод (тетрахлорметан, CCl_4). В таких случаях

содержание хлороформа обычно на 1–3 порядка превосходит уровень других летучих галогенорганических соединений, и в большинстве случаев концентрация их в питьевой воде регистрируется выше установленного норматива в 2–8 раз [57].

Установлено, что при длительном употреблении питьевой воды ненормативного качества по содержанию продуктов гиперхлорирования возрастает риск развития эндокринной патологии, заболеваний органов кровообращения, заболеваний мочевыделительной системы и органов пищеварения [57, 271]. Наиболее часто воздействие галогенорганических соединений приводят к нарушениям функции репродуктивной и иммунной системы [399, 400]. По результатам эпидемиологических исследований установлено негативное воздействие галогенорганических соединений, типичным представителем которых является хлороформ, на репродуктивную функцию женщин. При концентрации галогенорганических соединений в питьевой воде более 80–100 мкг/дм³ регистрируется повышение частоты патологического протекания беременности, возникновения врожденных уродств, нарушения внутриутробного развития плода [35, 57, 182, 347]. Гепатотоксичность хлороформа была установлена еще в конце XIX века. Механизм поражения печени, скорее всего, является результатом изменений скорости метаболизма в печени. Глутатион и CYP450 играют важную роль в процессе детоксикации хлороформа. Доказано, что поражение печени, вызванное CHCl_3 , опосредовано образованием свободных радикалов в процессе биотрансформации тригалометана [214]. Клетки Купфера являются значимым источником свободных радикалов [112], а также способны уничтожать «чужое» за счет процессинга и представления антигенных детерминант Т-лимфоцитам. Клетки Ито являются основными продуцентами IL10. Тяжелые формы хронических гепатитов и трансформация их в цирроз происходит в процессе активации процесса фиброгенеза печени, реализуемого, в основном, за счет продукции клетками Купфера и Ито коллагена. Хлорамины, образующиеся во время респираторного взрыва, обладают иммуностимулирующим действием [296]. В условиях

выраженного окислительного стресса (например, в присутствии галогенорганических соединений в организме) при образовании ряда белковых аддуктов возникает неблагоприятное влияние нейтрофилов на клетки печени. При модификации нейтрофилами окислительного стресса возникает митохондриальная дисфункция в клетках печени, что дополнительно активирует развитие окислительных нарушений в органеллах. В итоге в клетке возникает энергетический коллапс, инициирующий гибель гепатоцита по пути некроза [266]. Синусоидальные клетки печени обладают способностью продуцировать цитокины с провоспалительной активностью в ответ на представление антигена [155]. Эндотелиальные клетки печени инициируют взаимодействие вирус-специфических CD8-клеток с инфицированными гепатоцитами [421]. Неумеренная активация перекисных процессов, дисбаланс в системе «окисление-антиокисление», дисфункция работы митохондрий, нарушение регуляции внутриклеточного ионного гомеостаза – возможные механизмы повреждения гепатоцитов в условиях экспозиции хлороформом. В каждом из этих механизмов активно участвуют клетки иммунной системы (лимфоциты, макрофаги, купферовские клетки, клетки Ито). Обнаружена нефротоксичность хлороформа, а в развитии данного патологического процесса ведущая роль принадлежит именно повышению активности почечных цитохром Р450-зависимых монооксигеназ, а не печеночных [399, 400]. Анализ литературных данных показал, что большинство научных работ посвящены изучению эффектов воздействия хлорсодержащих примесей на опухолевые клетки [140], а также изучению негативных последствий данных химических факторов техногенного происхождения на организм животных. К сожалению, на сегодняшний день проведено недостаточно исследований, чтобы в полной мере оценить негативное влияние галогенорганических соединений, образующихся в процессе хлорирования питьевой воды, на детский организм.

Хлороформ и иммунная система. Чувствительность организма к воздействию химических факторов во многом зависит от особенностей ассоциаций, детерминирующих: активность ферментов системы детоксикации

ксенобиотиков; активность факторов, участвующих в патогенезе нарушений в органах-мишенях; состояние белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям; активность состояния компонентов иммунного ответа [399, 400]. Знание механизмов реализации различных вариантов гибели клетки, при воздействии на нее хлорсодержащих примесей, дает возможность контроля и влияния на изменение апоптоза клетки в условиях негативного влияния химических факторов среды обитания. Галогенорганические соединения, поступающие в организм в результате интенсивного обеззараживания воды хозяйственно-питьевого назначения, рассматриваются как возможная причина изменения реализации клеточной гибели при поступлении тригалометанов в организм.

Иммунотоксический механизм хлороформа. Результаты многочисленных экспериментальных исследований и клинических наблюдений, убедительно аргументируют способность галогенорганических соединений вмешиваться в тонкие механизмы регуляции пролиферативной активности и апоптоза иммуноцитов, индуцировать развитие иммунодефицита, снижать противоопухолевую резистентность, способствовать развитию аутоиммунных заболеваний [217, 284]. В результате 6-месячного отравления крыс CHCl_4 у животных развивается экспериментальный цирроз [97]. Так, в системе *in vivo* продемонстрировано, что галогенорганические соединения снижают активационноиндуцированную гибель CD4^+ Т-клеток за счет уменьшения экспрессии CD178 (FASL), при этом, не изменяя количество FAS [140]. Соединения хлора, содержащиеся в питьевой воде, увеличивают активность металлопротеиназы-7, тем самым способствуя разрушению FASL и ингибированию апоптоза [140]. В эксперименте на культуре клеток нейронов гипоталамуса мыши *GT1* доказан супрессирующий эффект хлороформа на апоптотическую гибель клеток [344]. На культуре лимфоцитов, выделенных от здоровых доноров, установлено, что хлороформ, превышающий референтный уровень, блокирует апоптоз Т-лимфоцитов [140]. Между тем ряд исследователей отмечают отсутствие канцерогенной активности и выраженного эффекта на

иммунную систему отдельных хлорорганических соединений (бромдихлорметан, хлорамин), поступающих в организм с питьевой водой, у мышей линии *B6C3F1* и крыс линии *F344 / N* (концентрация 2–700 мг/л) [256, 309].

Необходимо отметить, что вероятность того, что какое-либо химическое вещество провоцирует дисбаланс гомеостаза в итоге зависит от ряда факторов, в том числе от степени влияния химического соединения на организм человека, его распространения и удержания по мере проникновения химического вещества во все органы и ткани, эффективности систем метаболической активации и/или детоксикации в тканях-мишенях и ряда других переменных.

Реакцию метаболитов хлороформа с глутатионом (GSH) следует рассматривать в качестве основного механизма детоксикации [385]. Активация системы глутатиона при обезвреживании хлорсодержащих соединений приводит к истощению запасов глутатиона [188], вследствие чего создаются условия для возникновения устойчивых предпосылок формирования нарушения адаптационных процессов. Одним из важнейших адаптационных механизмов, обеспечивающих поддержание постоянства внутренней среды в условиях техногенной химической нагрузки, является иммунная система. Дисфункция иммунной системы в условиях негативного влияния химических факторов среды обитания может привести к увеличению риска развития ряда заболеваний, причинами которых часто являются нарушения клеточной гибели. В здоровом организме клеточный гомеостаз определяется балансом между клеточной гибелью и пролиферацией. Внутриклеточное распределение GSH в компартментах клетки, соотношение «восстановленный GSH / окисленный GSH» (GSSG) в клетке будут являться важными факторами с позиции контроля клеточной активности.

Метаболизм хлороформа в организме. Существует два пути (окислительный и восстановительный) метаболизма хлороформа (CHCl_3) в печени человека с участием различных изоформ P-450. Соотношение между двумя путями метаболизма хлороформа зависит от многих факторов, среди которых парциальное давление кислорода, концентрация хлороформа, особенности

организма, пол. В эксперименте на животных показано, что именно в зависимости от концентрации хлороформа в метаболизм галогенорганического вещества вступают различные изоформы суперсемейства P-450 [214]. Уменьшение печеночного клиренса может привести к увеличению биодоступности токсиканта и, следовательно, повышению его токсичности.

Двуокись углерода является основным метаболитом хлороформа, который образуется путем окислительного метаболизма. В результате окислительного метаболизма хлороформа генерируется фосген (COCl_2). COCl_2 достаточно быстро реагирует с клеточными белками в гепатоцитах и вряд ли переносится из печени в другие органы. Превращение фосгена происходит по трем направлениям [214].

Высокоактивный COCl_2 может ковалентно связываться с нуклеофильными компонентами тканевых белков и в какой-то степени с «полярными» головками фосфолипида (PL), а также восстановленным глутатионом с образованием окисленной формы глутатиона [399, 400]. В качестве альтернативы фосген может быть гидролизован путем взаимодействия с водой и образованием двуокиси углерода и хлористоводородной кислоты. Восстановительный путь метаболизма хлороформа (в условиях гипоксии) генерирует свободный радикал $\cdot\text{CHCl}_2$, и далее происходит образование дихлорметана (CH_2Cl_2).

Баланс между двумя путями метаболизма хлороформа зависит от вида клетки, ткани, дозы и парциального давления кислорода. В условиях эксперимента доказано, что у грызунов при низкой концентрации хлороформ окисляется CYP2E1. При более высокой концентрации CHCl_3 в присутствии кислорода образование фосгена катализируется CYP2B1 / 2, в то время как в условиях гипоксии производство дихлорметильного радикала, по-видимому, опосредовано конститутивными P-450 [428]. Два пути метаболизма хлороформа представлено на Рисунке 1.3.1 [191].

При поступлении в организм биотрансформации подвергаются 30–50 % хлороформа. Галогенорганические соединения не только сами разрушаются при участии оксидазсмешанной функции в печени, легких, тонком кишечнике [7],

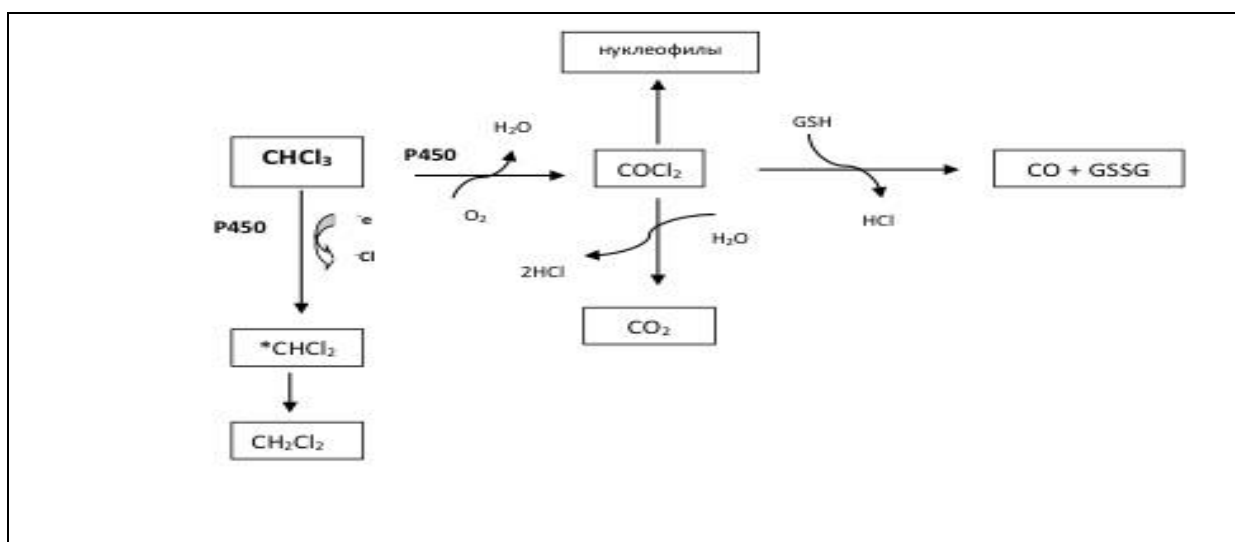


Рисунок 1.3.1 – Два пути метаболизма хлороформа в печени [191]

почках, головном мозге [427] и ядерных структурах [157, 228], но и значительно повышают биотрансформацию других поллютантов, причем феномен индукции реализуется на уровне транскрипции генетической информации клетки [7]. В результате активации процессов перекисного окисления и, в конечном счете, ингибирования механизмов антирадикальной защиты тригалометаны формируют условия для инициации свободнорадикальных процессов в клетке [36]. Представители галогенорганических соединений – хлороформ, дибромхлорметан (CHBr_2Cl), 1,2-дихлорэтан ($\text{ClCH}_2\text{-CH}_2\text{Cl}$), тетрахлорметан (CCl_4) и др. – в результате биотрансформации в организме инициируют процессы свободнорадикального окисления с генерацией активных форм кислорода (ROS). Хлороформ, являясь незначительным источником прооксидантных процессов из-за ничтожной способности к одноэлектронному восстановлению, между тем в процессе метаболизма образует токсичные метаболиты, негативно воздействующие на клетки [57]. Однако, возникновение антиномичной реакции, а именно угнетение процесса окисления липидов в тканях, возможно при попадании в организм ряда прооксидантов [228]. Тетрахлорметан, который достаточно легко метаболизирует в трихлорметильный радикал ($^*\text{CCl}_3$), способен забрать водородные атомы от ненасыщенных жирных кислот и генерировать перекисное окисление липидов (POL). Продукты метаболизма CCl_4 являются

более активными по сравнению с продуктами метаболизма CHCl_3 . Резерв глутатиона в организме имеет особое значение и необходим для обеспечения процесса детоксикации и антиоксидантной защиты.

Установлено, что при пероральном поступлении галогенорганических соединений основным местом образования свободнорадикальных метаболитов являются эндоплазматическая сеть и митохондрии клеток печени (Таблица 1.3.1) [228, 399, 400, 428].

Таблица 1.3.1 – Показатели, характеризующие вероятность поражения критических органов и систем при пероральном поступлении галогенорганических соединений

Химический фактор	Путь поступления	Критические органы и системы организма	Лабораторный индикаторный показатель
Хлороформ	Пероральный	Органы пищеварения (печень)	АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназа-3, γ -глутамилтрансфераза, цитохром P-450, щелочная фосфатаза в сыворотке крови; MDA, LPO; общая антиоксидантная активность, SOD, GPx
1,2-дихлорэтан	Пероральный	Органы пищеварения (печень)	АСТ, лактатдегидрогеназа-3, γ -глутамилтрансфераза, щелочная фосфатаза в сыворотке крови; MDA, LPO; общая антиоксидантная активность, SOD, GPx
Тетрахлорметана	Пероральный	Органы пищеварения (печень)	АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназа-3, γ -глутамилтрансфераза, цитохром P-450, щелочная фосфатаза в сыворотке крови; MDA, LPO; общая антиоксидантная активность, SOD, GPx

Возникающий оксидативный стресс, формируя значительные расстройства со стороны печени, снижает функциональную активность гепатобилиарного тракта. SOD существенно ускоряет дисмутации супероксид анион-радикала. Однако, несмотря на высокую специфичность фермента, при определенных условиях Cu-SOD может взаимодействовать с перекисью водорода и выступать в качестве прооксиданта [303].

В экспериментах на культуре клеток эндотелия человека HUVEC показано, что Cu / Zn-SOD и NO-синтазы блокируют активацию прокаспазы-3, тем самым ингибируется каспазный каскад в ответ на апоптозный стимул [411], а усиленная

экспрессия MnSOD, регулируемая miR-23a, подавляет апоптоз кардиоцитов [303]. Оксидативный стресс является известным индуктором транскрипции специфических генов, активатором важнейших ферментов, а также сигнальных путей, участвующих в клеточной гибели [117, 277], и в зависимости от продолжительности и степени окислительно-восстановительного дисбаланса может активировать или ингибировать апоптоз [187, 223, 321, 323].

Антиоксидантная защита GSH осуществляется посредством прямого взаимодействия с ROS или через работу ферментов детоксикации, таких как GSH-пероксидаза и GSH-S-трансфераза [113, 159]. Соединения, образующиеся в процессе окислительно-восстановительной реакции, могут регулировать экспрессию генов, контролирующих синтез GSH, тем самым включая защитный механизм против оксидативного стресса [329].

В нормальных условиях темп использования глутатиона обусловлен темпом его расходования физиологичными клеточными реакциями обезвреживания реактивных метаболитов кислорода [233]. Продукты оксидативного стресса могут спровоцировать краткосрочное падение внутриклеточного GSH, ассоциированное с более высоким уровнем окисленного глутатиона, что будет сопровождаться повышением уровня GSH и / или повышением активности γ -глутамат-цистеин лигазы, ключевого фермента синтеза GSH [412].

Очевидно, в условиях, когда потребление глутатиона увеличивается, как, например в ответ на воздействие поступающих извне окислителей или оказывающих токсическое воздействие на тиолы веществ, скорость потребления GSH может вырасти, что способствует снижению уровня последнего в организме [199, 412]. Существенное снижение содержания восстановленного GSH и дисбаланс ряда ферментов метаболизма глутатиона, являющиеся следствием событий, происходящих в период хронического поступления галогенорганических соединений в организм [7, 113], влияет на трансдукцию апоптотического сигнала, изменяя реализацию гибели клетки путем апоптоза [175] при этом летальная программа клетки может быть осуществлена по механизму запрограммированного некроза [396].

Система глутатиона и апоптоз. На сегодняшний день роль GSH в сложном и многоступенчатом процессе апоптоза остается до конца неясной и во многом будет завесить от типа клетки, специфики и характера проапоптотического фактора [159]. В ряде работ установлено, что повышенное содержание восстановленного GSH защищает клетку от стресс-индуцированного апоптоза [210], однако результаты других исследований доказали, что пониженный уровень глутатиона ингибирует клеточную гибель [220, 260].

Глутатион – тиольный трипептид-антиоксидант γ -Glu-Cys-Gly – может быть в окисленной или в восстановленной форме. Во всех клетках GSH присутствует в миллимолярных концентрациях и только в плазме крови – микромолярная. Основным, но не единственным, источником глутатиона в крови является печень. У некурящих мужчин пероральный прием GSH (250 или 1,0 мг/день) в течение 1, 3 и 6 месяцев дозозависимо повышает содержание глутатиона в плазме, эритроцитах и лимфоцитах на 35 % в максимальной дозе и на 19–29 % – в минимальной. Дополнительное поступление в организм GSH вызывает повышение последнего во всех компартментах тела [351]. Метаболизм глутатиона происходит только после его поступления в клетки. В системном кровотоке метаболизма глутатиона не происходит [37, 38]. Транспорт между органами GSH, его конъюгатов и GSSG осуществляется практически во всех клетках и органах организма. Один из белков-переносчиков глутатиона, мультифункциональный RLIP76, известен как сигнальный белок, участвующий в стрессе и антиапоптозе [330]. Гидрофильный восстановленный GSH локализован в водной фазе клетки и предохраняет вещества гиалоплазмы и матрикс митохондрий. Продукт окисления GSH – GSSG – является токсичным и быстро конвертируется обратно в GSH ферментом глутатионредуктазой. Приблизительно 90 % глутатиона находится в восстановленном состоянии и около 10 % в норме приходится на окисленную форму (дисульфид глутатиона) [238, 330]. Следует отметить, что GSSG извне не проникает через плазматическую мембрану. В клетке основная масса GSH находится в цитозоле, в митохондриях – 9–15 %. В

остальных частях клетки его значительно меньше. Потеря цитозольного GSH до 90 % для большинства клеток не является критической [238].

Глутатион выполняет значительное количество важных физиологических функций, являясь субстратом ферментативного восстановления пероксидов и конъюгата ксенобиотиков для облегчения их экспорта из клетки, а также принимая активное участие в транспорте аминокислот, тиолировании / дитиолировании белков и сохранении клеточного окислительно-восстановительного статуса [116, 330]. Особое значение GSH в редоксзависимых реакциях обуславливается его влиянием в формировании клеточной редокс-зависимой передачи сигнала и активности транскрипционных факторов [159].

В клетке апоптоз реализуется при соотношении GSH / GSSG 170 mV, а при пролиферации значительно превышает 200 mV [365]. Установлено, что баланс GSH / GSSG участвует в регулирование TNF α -индуцированного апоптоза посредством регулирования активности каспазы-3 [379]. Повышение уровня GSSG предшествует потере целостности митохондриальной мембраны, транслокации цитохрома C в цитозоль и активации каспазы-3. Однако GSSG в физиологических концентрациях может вызвать ингибирование активности каспазы-3 [260]. GSSG активирует не только программу реализации апоптоза, как это показано на клетках линии *U937*, активируя компоненты сигнальных внутриклеточных путей p38 MAPK [209], но и сигнальные пути, ведущие к повышению выживаемости, пролиферации или к дифференцировке клеток. Продемонстрирована активация MAP-киназ ERK 1,2 при действии GSSG на клетки линий *A431* (клетки эпидермоидной карциномы человека) и *HER14* (мышинные фибробласты NIH 3T3, трансфицированные геном рецептора EGF человека). Обнаружено, что этот процесс имеет волнообразный характер [54]. В части регуляции GSH-зависимых посттрансляционных модификаций остатков цистеина белков, принимающих участие в MAPK-сигналинге, следует указать, что при моделировании окислительного стресса *in vitro* на клетках карциномы предстательной железы человека линии *LNCaP* S-глутатионилирование Cys1238 в АТР-связывающем домене MEKK1 приводит к ингибированию активности

киназы [31, 166]. Между тем на сегодняшний день, полного понимания взаимоотношений между окислительным стрессом и S-глутатионилированием по отношению к активации / инактивации специфических MAPK-зависимых сигнальных путей и реализации апоптоза нет. В редокс-регуляции MAPK-зависимых путей сигнальной трансдукции GSH принадлежит одна из ключевых ролей. Однако погибнет клетка или выживет в определенных условиях, при активации различных сигнальных путей, регулируется не только клеточным уровнем GSH, но и типом клеток [208].

Кроме того, GSH оказывает влияние на транскрипцию генов, отвечающих за клеточную гибель [132]. В условиях резкого истощения внутриклеточного пула GSH снижается экспрессия ядерного фактора NF-κB в гепатоцитах [175]. NF-κB может быть задействован как в анти-, так и в проапоптотическом сигнале. Многие белки (> 62), включая факторы транскрипции (NF-κB, AP-1, p53, Fos, Jun и Nrf2), требуют восстановленной среды для связывания с ДНК и изменяют ядерное редокс-состояние [31, 38, 39, 162].

Хлороформ, вызывая дефицит GSH в печени, может снизить метаболизм других хлорсодержащих соединений, в частности дихлоруксусной кислоты (dichloroacetic acid, DCA) GSH-S-трансферазой (GST). Посредством нарушения метаболизма других галогенорганических веществ CHCl_3 может спровоцировать гиперэкспрессию гена *c-myc*. Изменение метаболизма DCA приводит к повышению концентрации последнего в почках и повышает риск возникновения опухолевого процесса в мочевыводящей системе, и хлороформ в данном случае будет выступать как «соучастник» онкопатологии [185]. При таких патологических состояниях, как ВИЧ, нейродегенеративные заболевания, онкологические заболевания, муковисцидоз, выявляется дисрегуляция в системе GSH [31, 361].

nGSH и апоптоз. Глутатион образуется в гиалоплазме, но затем он транспортируется во все компартменты клетки, в том числе и в ядро (nGSH). Установлено, что при повышенном содержании nGSH клетки будут менее чувствительны к апоптозу [193]. Бутионинсульфоксимин (BSO) в эмбриональных

фибробластах максимально снижает концентрацию GSH в цитоплазме, на порядок меньше в митохондриях, а в ядре меньше на 2 порядка, и только при огромных дозах (больше, чем на 2 порядка) [38]. Полученные результаты выявили максимальное накопление GSH в ядре в начале G1-фазы [222], что говорит о его значимой роли в поддержании редокс-статуса ядра во время клеточного цикла [241]. Установлено, что HOCI на клеточной линии *HUVEC-ST* (эндотелиальные клетки) дозозависимо вызывает арест клеточного цикла в фазе G₀ / G₁, повышение внутриклеточного ROS, активацию p38 MAPK и истощение GSH [241]. Можно полагать, что галогенорганические соединения могут вызывать апоптоз в зависимости от кинетики клеточного цикла [115]. Новые эксперименты доказали, что большая часть ядерного глутатиона отходит от родительского ядра к дочерним ядрам во время телофазы за счет сбережения значительного содержания GSH именно вблизи от делящегося генетического материала [31, 316]. Установлено существование АТФ-зависимого переноса GSH в ядро [240], а также диффузия через ядерные поры и возможность трансмембранного транспорта с участием антиапоптозного белка Bcl-2 [38, 222]. Необходимо указать, что домен BH-3 белка bcl-2, вероятно, обладает возможностью связаться с GSH.

На сегодняшний день существуют доказательства, что ядерные GST способствуют защите ядра от негативного влияния ROS [38, 189]. При оксидативном стрессе ядро, в отличие от цитозоля и митохондрий, сохраняет восстановленную среду, что свидетельствует об увеличенной антиоксидантной функции ядра и большей резистентности к ROS [366; 395]. Изменение редокс-статуса ядра является триггерным фактором для ряда компонентов, существенных для процесса транскрипции.

mtGSH и апоптоз. Хотя митохондрии как органеллы, где происходит аэробное дыхание и образование токсичных реактивных метаболитов кислорода, являются серьезно зависимы от GSH для предотвращения оксидативного повреждения, между тем они не синтезируют глутатион *de novo*. Происходит сохранение окисленного GSH реакцией с GPx (глутатионпероксидаза) и переносом глутатиона через наружную мембрану цитоплазмы [178]. Обратного

транспорта из митохондрии в цитозоль нет [304]. Физиологическое состояние клетки характеризуется равной концентрацией в митохондрии и окружающей цитоплазме. При возникновении оксидативного стресса уровень GSH в митохондриях сохраняется, однако его содержание в цитоплазме снижается, что говорит о наличии активного транспорта против концентрационного градиента. При снижении митохондриального уровня GSH (mtGSH) повышается чувствительность клеток к апоптозу [333]. Указывается на участие bcl-2 в сохранении уровня глутатиона в митохондриях [219]. Представленные результаты, а также тот факт, что антиапоптотический белок bcl-2 способен участвовать в формировании пор в мембране, подтверждает участие белков семейства bcl-2 в переносе GSH в ядро [222].

Показано, что 24-часовая инкубация В-клеточной лимфомы с BSO вызвала 95 %-ное уменьшение цитозольного GSH и частичное (25 %) сохранение митохондриального GSH [165]. Снижение GSH в митохондриях является важным пусковым моментом гибели клетки по типу апоптоза. Однако заслуживают внимания сведения о том, что в гепатоцитах небольшое падение mGSH, вызываемое незначительной гипоксией, не сопровождается апоптозом. Эти данные указывают на необходимость для активации апоптоза достижения определенного порога при снижении концентрации mGSH. Обращает на себя внимание тот факт, что в системе *in vivo* хроническое поступление галогенорганических соединений вызывает уменьшение цитозольного GSH относительно GSSG, в митохондриях, напротив, выявлено повышение митохондриального GSH по отношению GSSG. Отмечено, что изменение тиолового гомеостаза в цитозоле и митохондриях опосредовано через арилгидрокарбоновые рецепторы (aryl hydrocarbon receptor, AhR) [223]. В клетках линии K562 (человек, хроническая миелогенная лейкемия (плевральная жидкость)) галогенорганические соединения (в концентрациях 0,01 mM, 0,1 mM и 1 mM μ) вызывают снижение уровня mtGSH и дозозависимо изменяют вариант реализации клеточной гибели, при максимальной концентрации хлорсодержащих примесей некроз преобладает над апоптозом [396].

Ферменты системы GSH и апоптоз. Первичная функция GST – участие в метаболизме эндогенных веществ. Цитозольные GST детоксифицируют во всех клетках, но значительно в печени большинство электрофильных поллютантов почти всех классов. Глутатионтрансфераза обезвреживает и некоторые продукты I фазы детоксификации, в том числе галогенпроизводные (хлороформ и $\text{CCl}_4 \rightarrow$ фосген), содержащиеся в воде хозяйственно-питьевого назначения. Галогенорганические соединения, образующиеся в результате обеззараживания воды, приводят к дефициту клеточного содержания GSH в результате участия последнего в процессе детоксификации, однако значительного падения уровня ряда ферментов, например глутатионпероксидазы (GPx), выявлено не было [224]. Между тем есть сообщения, что галогенорганические соединения могут вызывать незначительное истощение GPx [307]. Хлорсодержащие примеси вызывают образование ROS и окислительное напряжение, что ведет к активации Nrf2 / ARE (антиоксидант-респонсивный элемент, antioxidant responsive element) и индукции GST [224]. Известно, что ген фактора транскрипции *Nrf2* широко экспрессируется в клетках различных типов [292], в том числе в лимфоцитах [209]. Транскрипционный фактор Nrf2 контролирует экспрессию большой группы генов, защищающих клетки от оксидантов, электрофилов и генотоксических соединений. Через метаболизм 15-дезоксид-12,14-ПГJ2 (15d-PGJ2) GST могут стимулировать экспрессию генов, связанных с NF-κB и AP1 (активирующий протеин-1, activator protein 1) [274], посредством указанного механизма возможно участие в развитии ряда заболеваний (панкреатита, атеросклероза, диабета) [120]. Доказано участие α-GST в возникновении таких болезней, как рак, астма, сердечно-сосудистая патология [161, 364]. π-GST принимают участие в глутатионировании белков, активно участвуют в формировании канцерогенеза и реализации резистентности к антираковым лекарствам, а также в процессах старения и нейродегенерации, регуляции сигнальных киназ [384]. μ-GST и π-GST подавляют активность протеинкиназ: регулируемую сигналом апоптоза (Ask 1) и Jun N-терминальную (JNK), тем самым оказывая ингибирующее влияние на передачу апоптогенного сигнала в [38, 427]. Показано, что GST отрицательно

регулирует шапероны, убиквитин-протеасомные компоненты, белки воспаления и апоптоза [252, 248.]. Одна десятая часть цитозольного пула α -GST электростатически связана с внешней мембраной ядра и столько же в ядре, что обеспечивает защитную функцию ядра [189]. Установлено, что GPx4 защищает клетки от активации апоптоза с участием белка AIF и поддерживает процесс окислительного фосфорилирования в кишечных [225]. Обладая способностью восстанавливать гидроперекиси кардиолипина, GPx4 принимает участие в регуляции выхода апоптогенных белков из митохондрий. У мышей, дефицитных по GPx, высокий уровень окислительного стресса показывает чрезмерную чувствительность к цитотоксичности нейтрофилов [400].

GSH: CD, каспазы и цитокины. Присутствие глутамин дозозависимо в T-клетках линии *Jurkat* увеличивает экспрессию bcl-2 и CD95, но одновременно снижает CD95L [218]. Экспериментально установлено ингибирующее влияние хлорорганических соединений на FAS-зависимый апоптоз [161]. В системе *in vivo* и *in vitro* установлено, что для реализации FAS-зависимого апоптоза необходим интактный уровень внутриклеточного GSH [152, 159]. Одним из возможных механизмов трансдукции сигнала в клетке являются реакции S-нитрозилирования / денитрозилирования протеинов. Таким механизмом может регулироваться запуск каскада сериновых протеаз (каспаз), участвующих в запрограммированной клеточной смерти [60]. Оксид азота может реагировать с GSH с образованием S-нитрозоглутатиона (GSNO), который в свою очередь может снова служить донором NO в клетке, а на уровне апоптосомы NO•, по-видимому, непосредственно препятствует взаимодействию Araf-1 (возбуждающий фактор апоптозной протеазы-1, apoptotic peptidase activating factor 1) и про-каспазы-9, тем самым предотвращая активацию каспазного каскада [159].

Одним из возможных механизмов запуска апоптоза является FAS-рецептор, а ключевым ферментом, определяющим начало протеолитического каскада, является каспаза 3. Однако вторичное S-нитрозилирование ингибирует каспазу 3 и останавливает апоптоз [60]. Экспериментально установлено, что GSH участвует в регуляции расщепления прокаспазы-3 [152, 175, 234, 260], прокаспазы-8 [220],

прокаспазы-9 [260]. Формирование сигнального комплекса DISC является GSH-независимым процессом, вследствие этого предполагают, что ингибирование FAS-зависимого апоптоза при снижении глутатиона зависит от изменения активности каспазного каскада.

Галогенорганические соединения, поступающие в организм с водой, способны спровоцировать нарушение баланса медиаторов Th1- и Th2-типа [140], что, возможно, объясняется возникающим дисбалансом системы глутатиона [152]. Следует отметить, что медиаторы Th1–лимфоцитов поддерживают развитие апоптоза. Экспериментально выявлено, что в макрофагальных клетках мыши (*RAW 264,7*) хлороформ дозозависимо снижает экспрессию основного проапоптотического цитокина TNF α , а также уменьшает образования IL1 β , NO, PGE $_2$ [121]. Существенное истощение уровня восстановленного GSH способствует снижению экспрессии IFN γ и TNF α Т-лимфоцитами [175].

Регуляция (активация или ингибирование) апоптоза является процессом, существенно зависимым от локализации и функциональной специфики GSH и ферментов его метаболизма в цитозоле, митохондриях и ядре клетки, изменяющихся при воздействии хлорсодержащих соединений. Снижение уровня GSH при значительном его использовании в процессе детоксификации и антиоксидантной протекции максимально выражено в цитозоле, слабее в митохондриях и минимально в ядре. nGSH присущ высокий уровень устойчивости к факторам, уменьшающим его концентрацию, по сравнению с теми изменениями, которые выявлены для общего уровня GSH клетки и глутатиона митохондрий под действием тиолсвязывающих агентов. Клетки с высоким уровнем пула ядерного глутатиона более устойчивы к апоптозу. Но в то же время значимость роли nGSH в условиях окислительного стресса требует дальнейшего изучения. Допускается предположение о том, что трансформация редокс-статуса ядра может действовать как триггерное звено для других компонентов, значимых для процесса транскрипции [31]. Существование системы антиоксидантной защиты в митохондрии делает возможным сохранение ее функций в целом. Дисбаланс в продукции цитокинов, модуляция запуска каспазного каскада,

уменьшение экспрессии рецепторов смерти и их лигандов, вызванные воздействием галогенорганическими соединениями, может существенно влиять на процесс развития клеточной гибели по типу апоптоз.

Очевидно, представленные данные указывают на участие галогенорганических соединений в переключении основных режимов функционирования клетки, тем самым принимая участие в регламентировании клеточной гибели.

Резюме по главе 1. Влияние внешнесредовых факторов, в том числе и химических веществ техногенного и природного происхождения, поступающих в организм с питьевой водой, обуславливают изменения в иммунной системе, которой принадлежит главная роль в обеспечении и поддержании гомеостаза организма, а также формировании гармоничного ответа его отдельных систем на воздействие. Детальное изучение механизмов реализации различных вариантов гибели иммунокомпетентной клетки (апоптоз и / или некроз) при экспозиции химических факторов обеспечивает возможность раннего выявления негативных последствий нарушения летальной программы клетки в условиях загрязнения окружающей среды.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология исследования

Методология настоящего исследования базируется на оценке патогенетической связи формирования у детей иммунорегуляторных нарушений с экспозицией химических веществ (на примере щелочно–земельных металлов и галогенорганических соединений), обладающих тропностью к костно-мышечной системе и печени, ассоциированных с иммунной системой, и на разработке с использованием современных высокоинформативных технологий научных исследований, системы для раннего выявления иммуноассоциированных заболеваний. В работе использован комплекс клинико-anamnestических, клинико-лабораторных, санитарно-гигиенических, химико-аналитических и статистических методов исследования.

Научно-исследовательская работа основывается на построенной и обоснованной концептуальной модели диагностики у детей нарушений клеточной гибели, детерминированной водной гаптенной нагрузкой, выполненной на примере деятельности ФБУН ФНЦ МПТ УРЗН Роспотребнадзора (Рис. 2.1).

Объект исследования – окружающая среда (пробы атмосферного воздуха, питьевой воды), базы данных по заболеваемости детского населения Российской Федерации и Пермского края, материалы по оценке риска, результаты клинико-лабораторного, функционального обследования, протоколы химико-аналитического анализа биосред детей.

Предмет исследования – особенности и общие закономерности развития нарушения клеточной гибели, обусловленные приоритетным химическим веществом, а также системные связи, характеризующие зависимость индикаторных показателей нарушения здоровья детей от влияния химических

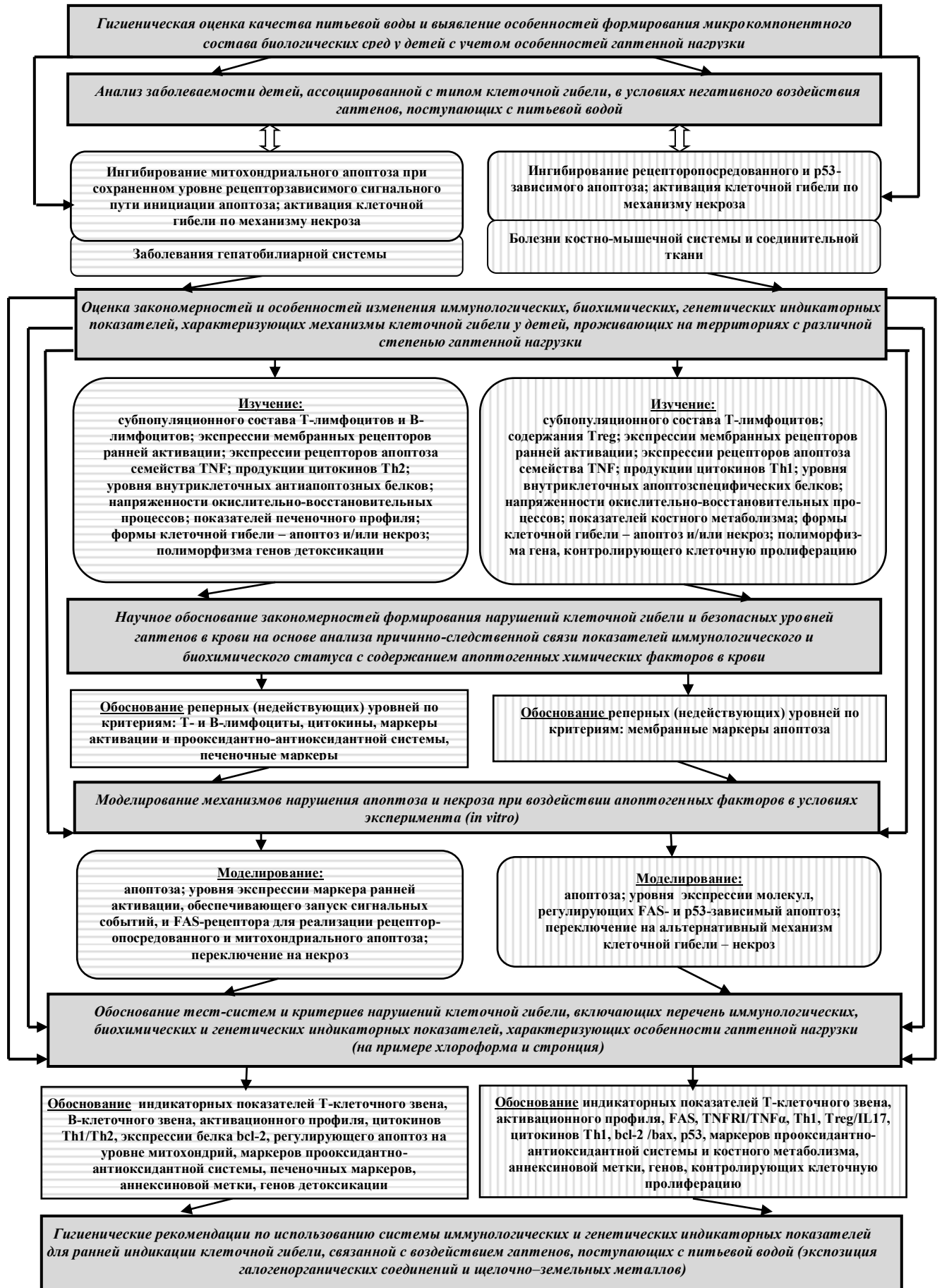


Рисунок 2.1 – Концептуальная модель научно-методического обоснования комплексного подхода к гигиеническому анализу закономерностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей; ▨ – при экспозиции щелочно-земельных металлов; ▩ – при экспозиции галогенорганических соединений

факторов природного и техногенного происхождения, поступающих в организм с питьевой водой, селитебных территорий.

Дизайн исследования

Дизайн настоящего исследования представлен на Рисунке 2.2.

1. Проведены гигиенический анализ качества окружающей среды субъектов РФ (2010–2017 гг.; вода питьевая, более 5000 ед. информации), Пермского края (2014–2017 гг.; вода питьевая, более 3000 ед. информации). Проведено изучение гаптенного окружения условий проживания детей приоритетных территорий: стронциевая геохимическая провинция и территория, где производится гиперхлорирование питьевой воды. Установление уровней концентраций примесей (органических соединений и металлов) в питьевой воде (по 15 компонентам) (более 10000 ед. информации) и атмосферном воздухе (по 12 компонентам). Изучение особенностей микрокомпонентного состава биосред обследуемых детей.

2. Оценка заболеваемости у детского населения регионов РФ с учетом особенностей формирования территориальной средовой гаптенной нагрузки (85 регионов РФ, 2006–2017 гг.; более 20 0000 ед. информации), статистический анализ структуры, динамики заболеваемости детского населения ПК (1992–2017 гг.; более 100 000 ед. информации), обоснован выбор территорий, приоритетных по заболеваниям костно-мышечной системы и пищеварительного тракта, ассоциированным с воздействием факторов окружающей среды. Проведена оценка заболеваемости 10 803 детей, экспонированных гаптенами. Используются базы данных по заболеваемости и обращаемости за медицинской помощью, карты специализированного клинического обследования (более 110 000 ед. информации). Использована методология оценки риска здоровью населения (по 14 веществам, более 7 000 ед. информации).

3. Для установления закономерностей и особенностей влияния гаптенов (на примере стронция и хлороформа), поступающих с питьевой водой, проведено: социологическое анкетирование (400 семей), углубленное клинико-

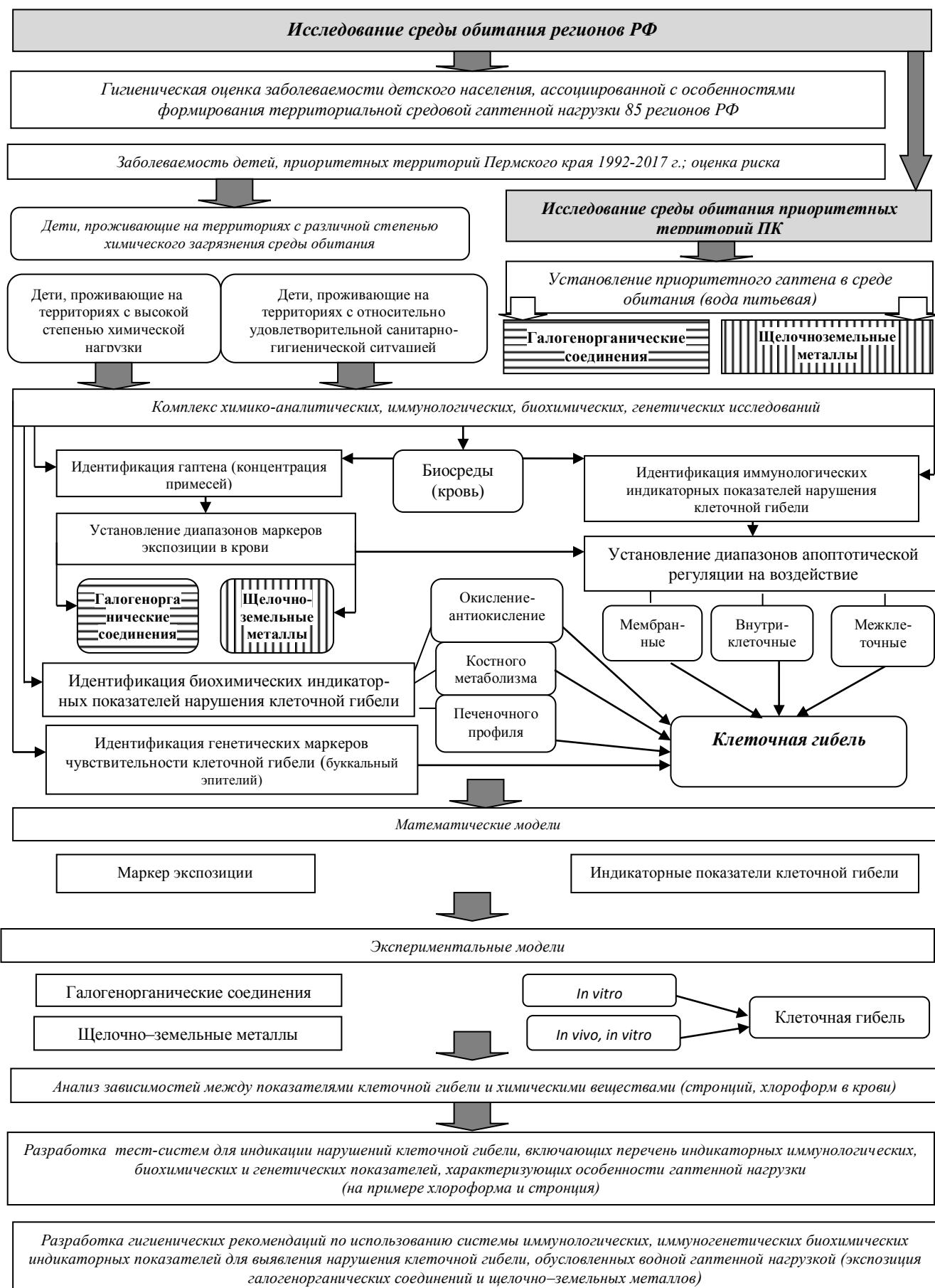


Рисунок 2.2 – Дизайн исследования

функциональное обследование 1002 детей дошкольного возраста, проживающих на территориях Пермского края (ПК) с различной гаптенной нагрузкой (более 70 000 ед. информации); проведен комплекс иммунологических (25 000 цитофлюориметрических исследований), иммуноферментных (более 21 210 исследований), биохимических (более 12 120 исследований), генетических (более 12 020 исследований) и химико-аналитических (более 20000 элементоопределений) исследований (более 200 000 ед. информации).

4. В ходе работы получено более 100 математических моделей «маркер экспозиции – индикаторный показатель», доказывающих причинно-следственные связи между показателями клеточной гибели и содержанием низкомолекулярных химических соединений в крови (на примере стронция, хлороформа) (более 52 000 ед. информации). Использование математического моделирования позволило установить реперные концентрации химических веществ техногенного и природного происхождения (на примере галогенорганических примесей и щелочно-земельных металлов).

5. Для доказательства влияния гаптенных (галогенорганических соединений и щелочно-земельных металлов) на летальную программу клетки, а также уточнения механизмов реализации клеточной гибели в условиях экспозиции выполнены экспериментальные модели в системе *in vitro* (суспензия лимфоцитов, выделенная у детей, проживающих в условиях экспозиции) и *in vivo* (белые мыши линии BALB/с, 24 особи) (230 проб крови, 6100 ед. информации).

6. Изучены механизмы негативных иммунных эффектов, обоснованы иммунологические, биохимические и генетические индикаторные показатели нарушений клеточной гибели, а также их критериальные уровни. Научно обоснованы и разработаны тест-системы для выявления ранних нарушений клеточной гибели в условиях гаптенной экспозиции на примере галогенорганических соединений и щелочно-земельных металлов.

Оценка качества среды обитания

Оценка состояния воды хозяйственно-питьевого назначения селитебных территорий Российской Федерации проведена по материалам ФИФ СГМ

(Федеральный информационный фонд данных социально-гигиенического мониторинга) за период 2010–2017 гг.

Гигиеническая оценка среды обитания селитебных территорий Пермского края проведена на основе анализа данных об объемах и составе выбросов от стационарных и передвижных источников, об объемах и составе сбросов сточных вод в водные объекты по статистическим параметрам Госкомстата (2 ТП – воздух, 2 ТП – водхоз). Оценка качества питьевой воды, атмосферного воздуха проведена по данным собственных исследований, мониторинговых и натуральных наблюдений: ФБУЦ ФНЦ МПТ УРЗН Роспотребнадзора, ГУ «Пермский ЦГМС», ФБУЗ «ЦГиЭ в Пермском крае», Территориального управления Роспотребнадзора по ПК.

Информация обобщена в соответствии с ГН 2.1.6.1338-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест»; СанПиН 2.1.6.1032-01 «Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест»; ГН 2.2.5.1315-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования»; СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения (ЦХПВ). Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения».

Натурные исследования качества атмосферного воздуха на содержание стронция, марганца, никеля, свинца, кадмия, хрома, мышьяка, железа, ксилола, бензола, этилбензола, толуола выполнены с использованием метода атомно-абсорбционного анализа и газовой хроматографии (РД 52.04.186-89 «Руководство по контролю загрязнения атмосферы»). Всего выполнено определение по 12 компонентам.

Натурные исследования содержания химических соединений в питьевой воде (вода из под крана в детском учреждении) по следующим соединениям: марганец, медь, никель, свинец, хром, мышьяк, стронций, фториды, хлороформ, тетрахлорметан, дихлорэтан, дихлорбромметан, дибромхлорметан,

тетрахлорметан, сульфаты (по SO_4), – выполнены с использованием методов атомно-абсорбционного анализа (металлы) (НСАМ № 480-Х, методика «Определения элементного состава природной и питьевой воды методом ICP MS»; МУК 4.1.646-4.1.660-96), газовой хроматографии (галогенорганические соединения) (ГОСТ Р 51392-99. «Вода питьевая. Определение содержания летучих галогенорганических соединений газожидкостной хроматографией»). Всего выполнено определение по 15 компонентам.

Оценка риска для здоровья

Оценка риска для здоровья детей в соответствии с многофакторным и многосредовым влиянием на критические органы и системы (печень, костно-мышечная система, патогенетически связанных с иммунной системой) выполнена в соответствии с Р 2.1.10.1920-04 «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду». Для оценки неканцерогенных рисков рассчитывались коэффициенты опасности (HQ) для каждого химического вещества и индексы опасности (HI) для группы веществ, поступающих в организм человека одним и тем же путем.

Эпидемиологический анализ структуры и динамики заболеваемости детского населения

На основании статистических материалов «Заболеваемость населения России» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России проведен ретроспективный анализ заболеваемости детей от 0 до 14 лет за период 2006–2016 гг. на уровне субъектов РФ.

Заболеваемость населения на территориальном уровне оценивали по данным государственной статистической отчетности лечебно-профилактических учреждений: «Отчет о числе заболеваний, зарегистрированных у больных, проживающих в районе обслуживания лечебно-профилактического учреждения» (форма 12-здрав.), данным реестров оплаченных случаев заболеваний

Территориального фонда ОМС за 2010–2014 гг. и первичных учетных форм (№ 112/у). Установленный уровень заболеваемости детей градуировался с учетом МКБ-10. Согласно данной классификации в класс III МКБ-10 «Болезни крови и кроветворных органов» включены некоторые нарушения иммунного механизма (D50-89). Однако учитывать нарушения функции иммунной системы необходимо при других заболеваниях: это весь класс X («Болезни органов дыхания» J00–J99), некоторые разделы класса IX («Болезни органов пищеварения» K00–K93), XVI («Отдельные состояния, возникающие в перинатальном периоде» P00–P96), XIII («Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани» M00–M99), XVIII («Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях, не классифицированные в других рубриках» R00–R99) и некоторые другие, так как иммунопатологические механизмы при этих заболеваниях занимают одно из доминирующих значений.

Использованы данные фонда обязательного медицинского страхования за 2014 год по заболеваемости 10 803 детей (экспонированная группа) в возрасте 0–14 лет за 2014 г. В качестве группы сравнения использовали аналогичные данные по заболеваемости 941 детей в возрасте 0–14 лет.

Выполнен ретроспективный анализ заболеваемости детей от 0 до 14 лет за период 1992–2017 гг. на территории Пермского края.

Анализ скорости изменения динамики заболеваемости детского населения выполнен по показателю темпа прироста (убыли). Для оценки тенденции многолетней динамики использовали выравнивание динамического ряда по уравнению прямой линии с определением коэффициента аппроксимации (R_I^2).

Общая характеристика обследуемого контингента

При планировании исследования выполнен расчет объема выборки, достаточного для проверки статистической значимости различий с учетом альфа-ошибки ($\alpha = 0,05$) и статистической мощности (80 %). Для решения поставленных задач обследованы дети, постоянно проживающие на территории Пермского края. Для сравнительного анализа выбраны селитебные территории Пермского края, различающиеся по степени воздействия природных и техногенных химических

факторов: стронциевая геохимическая провинция (г. Кунгур) (территория наблюдения № 1), территория ПК, где производится гиперхлорирование питьевой воды (г. Краснокамск) (территория наблюдения № 2), территории относительного санитарно-гигиенического благополучия ПК (с. Сива, пгт. Ильинский) (территория сравнения № 1, территория сравнения № 2).

Настоящее исследование выполнено с соблюдением этических требований Хельсинкской Декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Проведенные исследования одобрены Этическим комитетом Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения (протокол № 17 от 05.12.2011 г.).

Выполнено одномоментное (поперечное) эпидемиологическое исследование. Проведено углубленное обследование 1002 детей дошкольного возраста, из них мальчиков – 487 (49 %), девочек – 515 (51 %); группа сравнения – 450 детей, группа наблюдения – 552 ребенка. Все дети групп наблюдения постоянно проживают на территории Пермского края и посещают не менее года [77] детские дошкольные учреждения (ДДУ), расположенные на исследуемых территориях (территории наблюдения и территории сравнения). Воздействия, длительность которых превышает 10–12 % средней продолжительности жизни, рассматривали как хронические. Проведено динамически синхронизированное с уровнем экспозиционной нагрузки углубленное диагностическое клинко-лабораторное обследование детей, проживающих в г. Краснокамске, г. Кунгуре, пгт. Ильинском, с. Сиве ПК.

Критерии включения в исследование: возраст детей от 4 до 8 лет, принадлежность к европеоидной расе, наличие в анамнезе частых острых респираторных заболеваний (ОРЗ) – 4 раз и более в год (вторая группа здоровья (II б)), отсутствие приема иммунокорректоров и глюкокортикостероидов последние шесть месяцев, отсутствие в анамнезе аутоиммунных заболеваний, врожденной патологии, онкологических заболеваний, согласие родителей (опекунов) на участие в исследовании. *Критерии исключения:* обследуемые с

заболеваниями в стадии декомпенсации (органические и инфекционные поражения центральной нервной системы, заболевания сердечно-сосудистой системы, бронхолегочной и мочеполовой систем, заболевания желудочно-кишечного тракта); невозможность или нежелание родителей (опекунов) обследуемых детей подписать информационное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных; участие обследуемых детей в другом исследовании. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных. Выборка обследуемых была достаточна для достоверного определения межгрупповых различий (Таблица 2.1).

Все обследуемые дети относятся к группе длительно и часто болеющих детей в периоде ремиссии (возраст детей: 4–5 лет – частота эпизодов ОРЗ в год 5 и более; старше 5 лет – частота эпизодов ОРЗ в год 4 и более [2]). По классификации Института гигиены детей и подростков Министерства здравоохранения РФ, часто болеющие дети, относятся ко II группе здоровья (дети с отягощенным биологическим анамнезом, функциональными и морфологическими особенностями, то есть дети с риском развития у них хронического заболевания) [2, 47]. В группу длительно и часто болеющих детей принято относить детей, подверженных частым респираторным заболеваниям в основном из-за транзиторных отклонений и возрастных особенностей иммунной системы детского организма. В Международной классификации болезней (МКБ-10) в рубрику K82.8 включена «Дискинезия пузыря протока или желчного пузыря». Дети, имеющие данную патологию, относятся ко II группе здоровья. В группах наблюдения и сравнения все дети относятся ко II группе здоровья. Дети третьей, четвертой и пятой групп здоровья в обследуемой выборке не были выявлены.

По результатам медико-биологического анкетирования изучали: социальный статус семьи (образ жизни, социальный статус и образование родителей, доходы, наличие вредных привычек у родителей, жилищные условия),

наличие наследственных факторов (у родителей, родственников), перинатальный анамнез детей, частота и стаж перенесенных заболеваний и т.д.

Таблица 2.1 – Возрастная и гендерная характеристика обследуемых детей

Группа	Средний возраст, лет, <i>Me</i> [95% ДИ]	Мальчики		Девочки		Всего
		абс.	%	абс.	%	
Группа наблюдения № 1 (экспозиция стронцием)	5,99 [5,79; 6,19]	136	51	130	49	266
Группа сравнения № 1	5,39 [4,59; 6,19]	115	48	123	52	238
Группа наблюдения № 2 (экспозиция хлороформом)	5,06 [4,13; 5,99]	140	49	146	51	286
Группа сравнения № 2	5,23 [4,54 5,96]	96	45	116	55	212
Итого	5,42 [4,59; 6,25]	487	49	515	51	1002

Проведено углубленное обследование детей: осмотр врачами–специалистами узкой специализации; ультразвуковое исследование (УЗИ) печени, желчного пузыря, поджелудочной железы выполнено с помощью линейного матричного датчика (диапазон от 5,0 до 15,0 МГц) и выпуклого многочастотного датчика (диапазон от 2 до 6 МГц и от 1,8 до 6 МГц); по общепринятой методике для установления костного возраста выполнено рентгенологическое исследование кистей с использованием рентгеновского аппарата ТМХR+; диагностика нарушений осанки и деформаций позвоночника проведена с помощью системы ТОДП (топограф компьютерный оптический бесконтактный определения деформации позвоночника); диагностика стоп проведена с помощью программно-аппаратного комплекса «ПОДОСКАН». Таким образом, дети, включенные в группы наблюдения и группы сравнения, сопоставимы по всем анализируемым критериям (пол, возраст, гендерный состав, социальный статус, условия проживания, основной диагноз).

Для установления диапазонов ответных реакций иммунной системы на воздействие дети, проживающие в условиях экспозиции хлороформа, были поделены на подгруппы – I подгруппа ($n = 20$) и II подгруппа ($n = 40$) с учетом содержания анализируемого компонента в образцах крови. Подгруппы обследуемых детей не отличались между собой по гендерному и возрастному составу ($p > 0,05$).

Химико-аналитические исследования

Химико-аналитические исследования включали определение содержания в биосредах (кровь) 20 компонентов (марганец, мышьяк, никель, свинец, стронций, хром, 1,2-дихлорэтан, дибромхлорметан, дихлорбромметан, хлороформ, четыреххлористый углерод, масляный альдегид, п-ксилол, м-ксилол, п-крезол, м-крезол, о-крезол, фенол, пропионовый альдегид, этилбензол) (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Химические вещества и соединения, определяемые при химико-аналитическом обследовании в крови у обследованных детей

Группа обследованных детей	Вещество или соединение
Группа наблюдения № 1 Группа сравнения № 1	Марганец, мышьяк, никель, свинец, стронций , хром, дибромхлорметан, дихлорбромметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ, четыреххлористый углерод, фенол, м-крезол, о-крезол
Группа наблюдения № 2 Группа сравнения № 2	Марганец, дибромхлорметан, дихлорбромметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ , четыреххлористый углерод, масляный альдегид, п-ксилол, м-ксилол, п-крезол, м-крезол, пропионовый альдегид, этилбензол

Химико-аналитическое исследование содержания металлов в биосредах детей (кровь) выполнено с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой («Измерение массовых концентраций свинца, кадмия, мышьяка в крови методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой» МУК 4.1.3161-14.; «Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой» МУК 4.1.3230-14.). Установление содержания органических соединений выполнено методом анализа равновесной паровой фазы («Определение массовой концентрации хлороформа, 1,2-дихлорэтана, тетрахлорметана в биосредах (кровь) методом газохроматографического анализа равновесного пара» МУК 4.1.2115-06.; «Газохроматографический метод количественного определения ароматических (бензол, толуол, этилбензол, о-, м-, п-ксилол) углеводородов в биосредах (кровь)» МУК 4.1.765-99.). Оценка содержания химических факторов в биосредах проводилась с учетом группы обследуемых детей, а также в зависимости от приоритетного загрязняющего вещества.

Критериями содержания металлов и органических соединений в крови обследуемых являлись референтные уровни, установленные по данным научной литературы, и показатели групп сравнения [100, 238]. Критерием галогенорганических соединений в крови является их отсутствие.

В условиях длительной экспозиции стронцием и хлороформом у экспонируемого населения в крови регистрируются анализируемые компоненты, которые можно рассматривать как маркеры экспозиции [57, 399, 400, 401]. В связи с тем, что количество проб крови с повышенным содержанием других идентифицированных компонентов, не являющихся маркерами экспозиции, составляло менее 5 % от числа всех исследованных проб в группах наблюдения и контрольных группах, концентрация ингредиентов была принята нулевой и в дальнейших исследованиях не учитывалась [77]. Исследования выполнены в отделе химико-аналитических методов исследования ФБУН ФНЦ МПТ УРЗН Роспотребнадзора (заведующий д-р биол. наук Уланова Т.С.).

Цитофлюориметрические методы исследования

Кровь из локтевой вены получали утром натощак в вакуумные пробирки системы Vacutaner» фирмы «Becton Dickinson («BD», USA), с антикоагулянтом К3EDTA. Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson с использованием универсальной программы CellQuestPro с помощью компьютера Macintosh. Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD95⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (NKT), CD4⁺25⁺127⁻ (Treg)) проводили методом мембранной иммунофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). На Рисунке 2.3. представлен типичный пример анализа образца с антителами к определяемым CD. Все лимфоциты идентифицировали по наличию CD45 и соответствующего показателя рассеяния света (SSC) – зона зеленого цвета на рисунке. Затем определяли лимфоциты, несущие одновременно CD3 и CD4 молекулы. Аналогичным образом определяли другие субпопуляции лимфоцитов. Для идентификации индикаторных показателей апоптоза использовали суспензию

мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) [142].

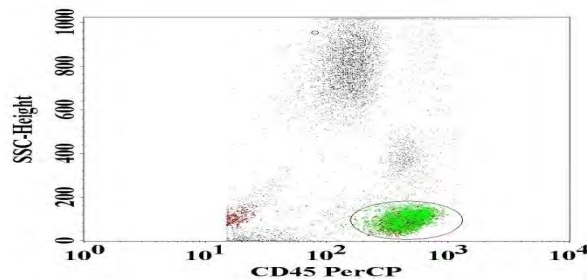


Рисунок 2.3 – Анализ образца с антителами к определяемым CD

Для определения уровня экспрессии TNFR1 использовали цитофлюориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором к TNF α на лимфоцитах. Клетки ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) отмывали фосфатно-солевым буфером ($pH = 7,2$) (PBS) и окрашивали стандартными МКАТ к рецептору TNFR1, мечеными PE (Phycocerythrin) Becton Coulter («BC», USA) согласно протоколу фирмы-производителя. Определение внутриклеточного маркера апоптоза – p53-протеина – проводилось с помощью МКАТ против белка p53, конъюгированных с PE. Для анализа использовалась суспензия мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина. Затем клетки, дважды отмывые в холодном фосфатно-солевом буфере, ресуспендировали в буфере для разведения клеток Cell Wash ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) и окрашивали стандартными МКАТ согласно протоколу фирмы-производителя («BC», USA). Сбор данных проводили на проточном цитометре. Определение уровня экспрессии белка bcl-2, бах проводили с использованием соответствующих МКАТ («BC», USA) и одновременным проведением процедуры отрицательного изотипического контроля. Регистрацию апоптоза лимфоцитов осуществляли методом, основанным на определении экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (Ann V-FITC) («BD», USA). После отмывания клетки ($1 \cdot 10^6$ клеток / мл) ресуспендировали в рабочем растворе буфера для окрашивания

и инкубировали с добавлением красителей. Через 15 минут их фиксировали рабочим раствором связывающего буфера и подвергали проточной цитофлюорометрии. Окрашивание клеток аннексином V-FITC проводилось одновременно с витальным красителем, что позволяло идентифицировать определяемые клетки на ранней стадии апоптоза. В качестве витального красителя использовали пропидиум йодид (PI (Propidium Iodide)) («BD», USA). Живые клетки негативны по Ann V и PI (AnnV-FITC-PI⁻), Ann V-FITC⁺PI⁻ – ранний апоптоз (обратимый), Ann V-FITC⁺PI⁺ – поздний апоптоз (необратимый) и / или некроз [64, 94, 414].

Иммуноферментные и биохимические методы исследования

Методы определения, материалы, приборы, используемы в работе для идентификации иммунологических и биохимических индикаторных показателей нарушения клеточной гибели, представлены в Таблицах 2.3, 2.4.

Таблица 2.3 – Методы, материалы, приборы, используемы в работе для изучения цитокинового статуса, процессов «окисление–антиокисление» и печеночного профиля

Показатель, единица измерения	Материал	Метод определения	Прибор, фирма
1	2	3	4
Цитокиновый профиль			
IL1 β , IL4, IL6, IL8, IL10, IL17, IFN γ , TNF α , VEGF, пг/см ³	Кровь (сыворотка)	ИФА	Sunrise (Tecan, Austria)
Показатели окислительно-восстановительных процессов			
Оксидантные процессы			
Малоновый диальдегид (MDA), мкмоль/дм ³	Кровь (плазма)	Спектрофотометрия	СФ ПЭ-5300 (Россия)
Гидроперекиси липидов (LPO), мкмоль/дм ³	Кровь (сыворотка)	ИФА	Sunrise (Tecan, Austria)
Антиоксидантные процессы			
Глутатионпероксидаза (GPx); супероксиддисмутаза (SOD); глутатионтрансфераза (GST), нг/см ³	Кровь (сыворотка)	ИФА	Sunrise (Tecan, Austria)
Интегральный показатель состояния антиоксидантной активности			
Антиоксидантная активность плазмы (АОА), %	Кровь (плазма)	Спектрофотометрия	СФ ПЭ-5300 (Россия)

Окончание Таблицы 2.3.

1	2	3	4
Печеночный профиль			
Аспаратаминотрансфераза (АСТ); аланинаминотрансфераза (АЛТ); γ -глутамил-трансфераза (γ -ГТ), Е/дм ³	Кровь (сыворотка)	Колориметрия	Keylab (Italy)
Печеночный изофермент щелочной фосфатазы (LALP), Е/дм ³	Кровь (сыворотка)	Электрофорез	SAS1 plus (HELENA, United Kingdom)
Альбумины и белок общий, г/дм ³ ; билирубин общий и билирубин прямой, мкмоль/дм ³	Кровь (сыворотка)	Колориметрия	Keylab (Italy)

Таблица 2.4 – Методы, материалы, приборы, используемы в работе для изучения показателей метаболизма костной ткани

Показатель, единица измерения	Материал	Метод определения	Прибор, фирма
Биохимические параметры крови в выявлении дефицита костной массы			
Ионизированный кальций, нг/см ³	Кровь	Ионоселективная потенциометрия	Easylyte Calcium (Medica, USA)
Регуляция остеокластогенеза (маркеры кальцификации)			
Промоутер кальцификации			
Лиганд рецептора-активатора ядерного фактора κ -В (RANKL), пг/см ³	Кровь (сыворотка)	ИФА	Sunrise (Tecan, Austria)
Ингибитор кальцификации			
Остеопротегерин (OPG), пг/см ³	Кровь (сыворотка)	ИФА	Sunrise (Tecan, Austria)
Гормональная регуляция обмена кальция			
Кальцитонин, нг/мл	Кровь (сыворотка)	ИФА	Infinite F50 (Tecan, Austria)
Маркёры костного формирования			
Щелочная фосфатаза (ALP), Е/дм ³	Кровь (сыворотка)	Колориметрия	Keylab (Italy)
Костный изофермент щелочной фосфатазы (BALP), Е/дм ³ и остеокальцин (BGP), нг/мл	Кровь (сыворотка)	ИФА	Infinite F50 (Tecan, Austria), Sunrise (Tecan, Austria)
Маркёры костной резорбции			
Тартрат-резистентная кислая фосфатаза (TRACP), Е/дм ³ ; С-концевые тепептиды, нг/см ³	Кровь (сыворотка)	ИФА	Sunrise (Tecan, Austria)

Генетические методы исследования

Забор материала для ПЦР проводился методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Затем проводили выделение ДНК с помощью сорбентного

метода, в основе которого лежит разрушение клеток с дальнейшей сорбцией нуклеиновых кислот на сорбент. Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику ПЦР, в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени (мультиплексная ПЦР). В качестве праймеров использовали участок ДНК генов: *VEGFA G634C* (эндотелиальный фактор роста); *CPOX rs1131857* (копропорфириноген оксидаза); *CYP1A1 Ile462Val* (цитохром P-450); *GSTA4 rs3756980* (глутатион-S-трансфераза); *MMP9 Gln279Arg* (металлопротеиназа); *SOD2 C14510A* (супероксиддисмутаза); *TP53 rs178841594*; *FOXP3 T(-3499)C*; *FAS C14405T*; *ZMP STE24 rs2076697* (цинк-металлопептидаза); *TERT C309G* (ген обратной теломеразной транскриптазы); *TNF G4682A*. Указанные гены могут рассматриваться как гены-кандидаты иммуноассоциированных заболеваний.

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. Статобработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт», служащей для расчета статистических параметров для исследований «случай–контроль», использующих SNP.

Экспериментальные модели

У детей, проживающих в условиях экспозиции, для оценки влияния низкомолекулярных химических соединений на клеточную гибель в системе *in vitro* из общего количества всех проб, анализируемых с учетом гаптенной нагрузки, отобрано: для изучения воздействия стронция 49 проб крови, хлороформа – 60 проб. Определение уровня экспрессии CD25⁺-рецептора, CD95⁺-рецептора, белка bcl-2, bax, p53, содержание Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток и Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток проводили методом мембранной иммунофлюоресценции («BD», USA; «BC», USA). В экспериментах с хлороформом и стронцием жизнеспособность клеток оценивали после инкубации в термостате при 37°C, время инкубации подбирали опытным путем (1 час, 2 часа,

3 часа, 4 часа, 5 часов). Жизнеспособность клеток рассчитывается как количество жизнеспособных клеток, поделенное на общее число клеток в камере Горяева. Клетки, окрашенные трипановым синим, считаются нежизнеспособными. Этот краситель не проникает через мембраны живых клеток, но при их повреждении способен окрашивать клеточное ядро. Жизнеспособность клеток должна быть не менее 95 % для здоровых культур.

Экспериментальные модели в условиях экспозиции стронцием

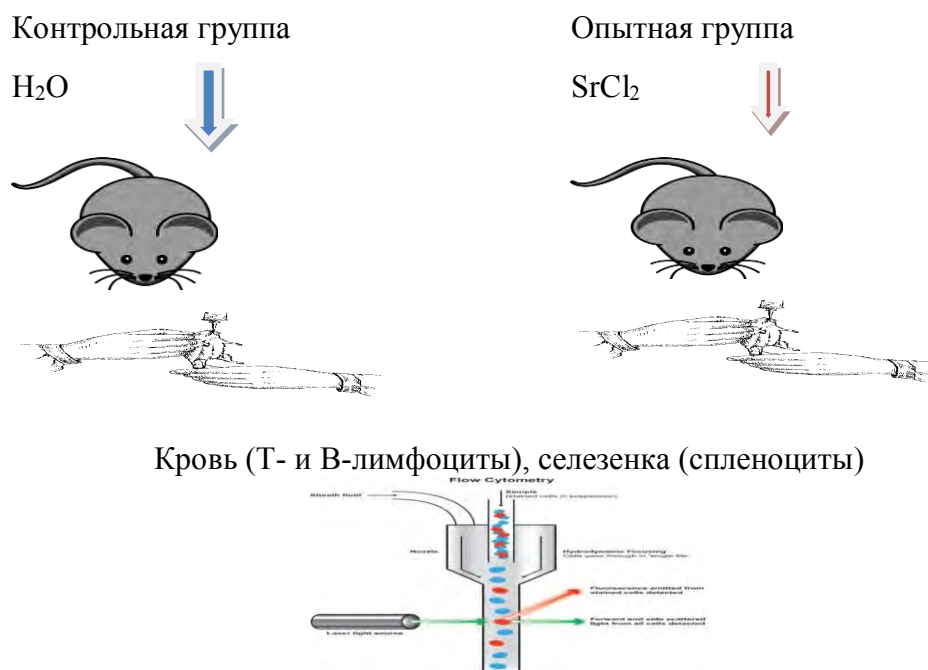
Экспериментальные исследования в системе in vitro. Для изучения влияния стронция (Sr^{2+}) на реализацию апоптоза опытные пробы инкубировали со стронцием в концентрации 7 мг/дм³ (соответствующей ПДК для воды водных объектов) в течение 4 часов при 37°C. В качестве контроля использована суспензия клеток без добавления стронция, которые инкубировались при таких же условиях.

Экспериментальные исследования в системе in vivo. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., а также международными правилами Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Эксперименты по изучению клеточной экспрессии выполнены на 24 здоровых 8–10-недельных (масса 18–24 г) мышах линий Balb / c, разделенных на две группы: 1-я – контрольная ($n = 8$), 2-я – опытная группа, животные с моделированной интоксикацией хлоридом стронция ($n = 16$), которым в течение 45 дней проводили затравку SrCl_2 из расчета 1 мг/кг веса животных (Рисунок 2.4).

Для определения уровня экспрессии CD62L на спленоцитах и клетках периферической крови использовался проточный цитометр FACSCalibur («BD», USA). Выделение взвеси спленоцитов (взвесь клеток селезенки) производили стандартными методами щадящей гомогенизации лимфоидного органа (гомогенизатор Miltenyi Biotec, Германия) с удалением эритроцитарной фракции путем осмотического лизиса. Для получения иммунокомпетентных клеток использовали метод позитивной иммуноселекции с помощью магнитных частиц

(«Miltenyi Biotec», Germany), покрытых антителами крысы к CD62L мыши («CD4⁺ CB62L T cell Isolation Kit mouse» Miltenyi Biotec, USA).



Проточная цитометрия

Рисунок 2.4 – Схема эксперимента

Экспериментальные модели в условиях экспозиции хлороформом

Экспериментальные исследования в системе in vitro. Для оценки влияния хлороформа на реализацию апоптоза опытные пробы инкубировали с хлороформом 0,06 мг/дм³ [40] в течение 4 часов при 37°C (опытная проба). В качестве контроля использованы лейкоцитарные клетки без добавления хлороформа, которые инкубировались при таких же условиях.

Иммунологические и генетические методы исследования выполнены в отделе иммунобиологических методов диагностики ФБУН ФНЦ МПТ УРЗН Роспотребнадзора (заведующий д-р мед. наук Долгих О.В.).

Внутрилабораторный контроль качества в клинико-диагностических лабораториях обеспечен участием в Федеральной системе внешней оценки качества (сертификат лаборатории № 10843 по биохимическим исследованиям, № 10845 – по общеклиническим исследованиям, № 10844/16 – по иммунологическим исследованиям) и в международной системе оценки качества

лабораторных исследований EQAS (сертификат лабораторий № 9473, № 13494) (приказ МЗ РФ от 07.02.2000 № 45).

Оценку риска (диапазон отклонения индикаторного показателя клеточной гибели от физиологической нормы в зависимости от содержания стронция в крови и частоты встречаемости заболеваний костно-мышечной системы и соединительной ткани в данном диапазоне значений индикаторного показателя) проводили по данным научных источников из обзора литературы по проблеме и установленным закономерностям, обнаруженным в процессе настоящего исследования.

Малый риск – диапазон отклонения индикаторного показателя от физиологической нормы от 0 до 5 % в соответствующем диапазоне стронция в крови, при этом менее чем у 5 % детей диагностируются болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Средний риск – диапазон отклонения индикаторного показателя от 5,1 до 10,0 % от физиологической нормы в соответствующем диапазоне стронция в крови, при этом у 5,1-30 % детей диагностируются болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Высокий риск – диапазон отклонения индикаторного показателя от физиологической нормы от 10,1 до 20,0 % в соответствующем диапазоне стронция в крови, при этом у 31–80 % детей диагностируются болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Очень высокий риск диапазон отклонения индикаторного от физиологической нормы от 20 % и более в соответствующем диапазоне стронция в крови, при этом болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани диагностируются от 80,1 до 100 % случаев у детей с данными отклонениями индикаторного показателя.

Статистический анализ данных

Проверка распределения количественных данных проводилась с помощью статистического критерия Колмогорова-Смирнова. Для описания данных, имеющих нормальное распределение, использовались среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (σ) и 95% доверительный интервал для среднего (95% ДИ). Данные с распределением, отличающимся от нормального,

описаны с помощью медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (P_{25} , P_{75}) и 95% доверительного интервала для медианы (95% ДИ). Категориальные переменные описаны в виде относительных частот (%).

Для проверки нулевых гипотез о равенстве средних значений между двумя независимыми группами с нормальным распределением применялся двухвыборочный критерий Стьюдента. Две независимые группы с распределением данных, отличающимся от нормального, сравнивались с использованием критерия Манна-Уитни. Сравнение выборочных данных с референтными уровнями выполнено с использованием одновыборочного критерия Вилкоксона. Проверка нулевых гипотез об отсутствии различий между долями проводилась с помощью критерия хи-квадрат (χ^2).

Для прогноза дозовой нагрузки химическими веществами, получаемой детьми при потреблении питьевой воды, а также для прогноза изменения иммунологических ответов при экспозиции хлороформа и стронция, использовался простой линейный регрессионный анализ. Вклад независимых переменных в вариацию зависимых оценивался по коэффициенту детерминации (R^2). Для предсказания вероятности нарушения апоптоза использовался простой логистический регрессионный анализ.

Для оценки связи исследуемых ответов с воздействием факторов рассчитывалось отношение шансов (OR) и 95 % доверительный интервал для отношения шансов.

Уровень значимости, на котором проводилась проверка нулевых гипотез, принимался равным 0,05. Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США).

ГЛАВА 3. ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ВОДНОЙ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ, КСЕНОБИОАЛЬНОГО И МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД ДЕТЕЙ, ПОТРЕБЛЯЮЩИХ ПИТЬЕВУЮ ВОДУ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

3.1. Анализ особенностей водной гаптенной нагрузки природного и техногенного происхождения на территориях риска возникновения патологии костно-мышечной системы и гепатобилиарной системы в Российской Федерации

Оценка состояния воды хозяйственно-питьевого назначения селитебных территорий Российской Федерации, проведенная на основе материалов ФИФ СГМ (Федерального информационного фонда данных социально-гигиенического мониторинга) в период 2013–2017 гг., показала увеличение процента проб с превышением ПДК с 2,68 до 3,54 % (в 1,32 раза). Между тем на ряде территорий доля проб питьевой воды с превышением гигиенических нормативов (ПДК) за анализируемый период времени возрастает до 1,7 раза (в Ямало-Ненецком автономном округе – в 1,67 раза), а в Курганской области – в 1,31 раза; в Пермском крае – в 1,25 раза (2013 г. – 1,47 %, 2017 г. – 1,83 %).

Следует отметить, что содержание в питьевой воде химических веществ природного происхождения, оказывающих негативное воздействие на костно-мышечную систему, а также веществ техногенного происхождения, ухудшающих работу печени, в целом по Российской Федерации остается стабильно высоким (Рисунок 3.1.1).

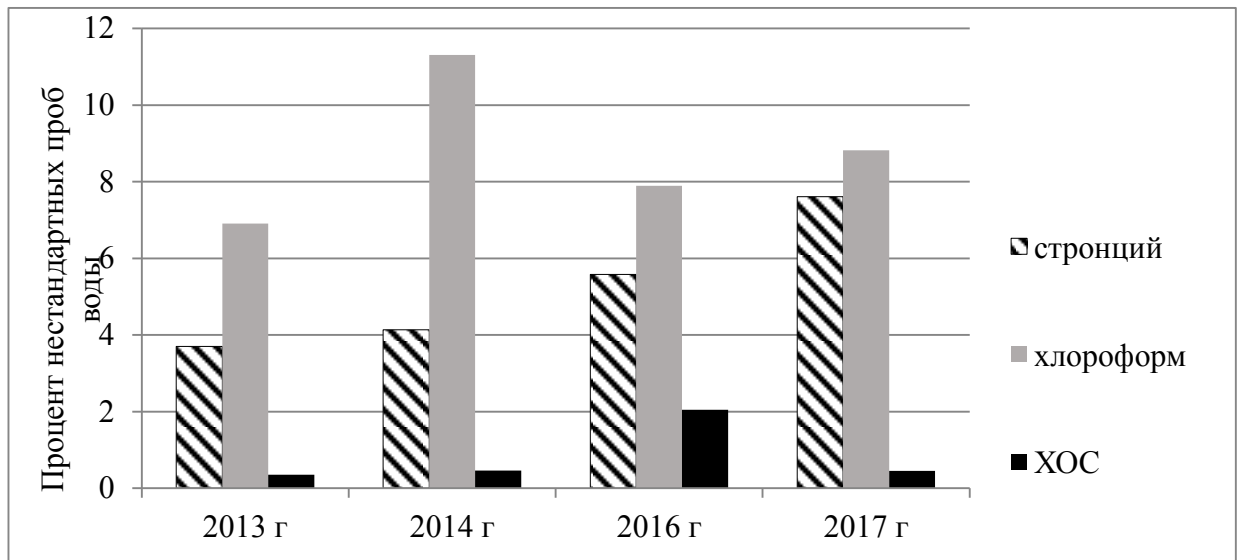


Рисунок 3.1.1 – Динамика показателей качества питьевой воды по содержанию химических веществ природного и техногенного происхождения на территории Российской Федерации (% нестандартных проб выше 1 ПДК), 2013–2017 гг.; ХОС – хлорсодержащие органические соединения (тетрахлорметан, дибромхлорметан, бромдихлорметан, дибромхлорметан, 1,2-дихлорэтан).

Процент нестандартных проб щелочно–земельных металлов (стронций) в 2017 г. достигает максимальных значений и составляет 7,61 %, галогенорганических соединений: хлороформа в 2014 г. – 11,31 %, других галогенорганических соединений (тетрахлорметан, дибромхлорметан, бромдихлорметан, дибромхлорметан, 1,2-дихлорэтан) в 2016 г. – 2,05 %.

По сравнению с 2013 г. в 2017 г. удельный вес нестандартных проб питьевой воды по содержанию стронция природного происхождения на территории Российской Федерации в целом возрос более чем в 2 раза, при этом максимальный прирост (до 6,8 раза) отмечается на территории Пермского края (Приволжский федеральный округ) (Таблица 3.1.1). Следует отметить, что за анализируемый период в отдельных регионах доля нестандартных проб питьевой воды по содержанию стронция составляла 37,5 % (Брянская область Центральный федеральный округ в 2013 г.) и 54,5 % (Калужская область Центральный федеральный округ в 2013 г.). Между тем в Калужской области (Центральный федеральный округ в 2010 г.) доля нестандартных проб составляла 2,08 %.

В 2017 г. значительные превышения содержания в питьевой воде стабильного стронция (от 2 до 5 ПДК) зафиксированы в шести субъектах Российской Федерации, в том числе и в Пермском крае (Приволжский федеральный округ) (Таблица 3.1.2.).

Таблица 3.1.1 – Показатели качества питьевой воды по содержанию щелочно–земельных металлов (стронций) в Российской Федерации, 2013–2017 гг., (% нестандартных проб)

Территория	2013 г.	2017 г.	Кратность повышения
Российская Федерация	3,70	7,61	2,1
Пермский край (Приволжский ФО)	0,37	2,50	6,8
Тверская область (Центральный ФО)	0	4,17	4,2
Архангельская область (Северо-Западный ФО)	0	3,71	3,7
Республика Мордовия (Приволжский ФО)	3,0	7,69	2,6
Республика Татарстан (Приволжский ФО)	1,75	4,37	2,5

Высокий удельный вес (более 10 %) проб питьевой воды из водопроводной сети, не отвечающих требованиям гигиенических нормативов по содержанию хлороформа (от 2 до 5 ПДК), в 2017 г. зарегистрирован на территории Волгоградской области (Южный федеральный округ), Челябинской области, (Уральский федеральный округ), Пермского края (Приволжский федеральный округ) и Республики Карелия (Северо-Западный федеральный округ) (Таблица 3.1.2).

Таблица 3.1.2 – Ранжирование территорий РФ по безопасности питьевой воды по содержанию химических веществ техногенного происхождения, 2017 г.

Территория	Хлороформ	Ранговое место
1	2	3
% нестандартных проб от 1 до 2 ПДК		
Российская Федерация	5,20	-
Волгоградская область (Южный ФО)	49,32	1
Кировская область (Приволжский ФО)	42,71	2
Архангельская область (Северо-Западный ФО)	19,70	3
Вологодская область (Северо-Западный ФО)	14,62	4
Пермский край (Приволжский ФО)	13,89	5
% нестандартных проб от 2 до 5 ПДК		
Российская Федерация	3,62	-
Волгоградская область (Южный ФО)	36,26	1
Челябинская область (Уральский ФО)	15,23	2

Окончание Таблицы 3.1.2

1	2	3
Пермский край (Приволжский ФО)	12,10	3
Республика Карелия (Северо-Западный ФО)	10,9	4
Новгородская область (Северо-Западный ФО)	9,02	5
Кировская область (Приволжский ФО)	8,33	6
Архангельская область (Северо-Западный ФО)	8,18	7
Кемеровская область (<i>Сибирский ФО</i>)	4,90	8
Ярославская область (<i>Центральный ФО</i>)	3,28	9
Вологодская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	3,08	10
Красноярский край (<i>Сибирский ФО</i>)	0,71	11
Мурманская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	0,52	12
Приморский край (<i>Дальневосточный ФО</i>)	0,19	13
% нестандартных проб > 5 ПДК		
Новгородская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	1,64	1
Ярославская область (<i>Центральный ФО</i>)	1,56	2
Московская область (<i>Центральный ФО</i>)	0,57	3
Архангельская область (Северо-Западный ФО)	0,37	4
Пермский край (Приволжский ФО)	0,20	5

В то же время в Республике Крым и г. Севастополе в период с 2010 г. до 2016 г. нестандартных проб по содержанию хлороформа не обнаружено. В 2017 г. зафиксированы превышения предельно допустимой концентрации по хлороформу более чем в 5 раз в Новгородской, Архангельской (Северо-Западный федеральный округ), Ярославской, Московской (Центральный федеральный округ) областях и Пермском крае (Приволжский федеральный округ).

Таким образом, обоснован выбор приоритетной территории РФ с существенным уровнем санитарно-гигиенических проблем – Пермский край, имеющий наиболее неблагоприятные показатели качества питьевой воды по содержанию химических веществ природного (стронций: за период 2013–2017 гг. удельный вес нестандартных проб питьевой воды увеличился в 6,8 раза; в 2017 г. – удельный вес нестандартных проб (от 2 до 5 ПДК) составил 1,67 %, 4-е ранговое место) и техногенного происхождения (хлороформ: в 2017 г. – удельный вес нестандартных проб (от 2 до 5 ПДК) составил 12,1 %, 3-е ранговое место).

Сравнительная оценка водной гаптенной нагрузки природного и техногенного происхождения на территории Пермского края

Установлено, что в 2016 г. по сравнению с 2015 г. в Пермском крае доля проб воды в источниках централизованного водоснабжения, не соответствующих гигиеническим требованиям по санитарно-химическим показателям, возросла в 1,1 раза за счет подземных вод (Таблица 3.1.3). Необходимо отметить отрицательную динамику показателей химической безопасности воды подземных источников водоснабжения за 2014–2016 гг. (в 2014 г. процент нестандартных проб составлял 11,6 %). Однако динамика микробиологических показателей для подземных вод на территории Пермского края остается стабильной (в 2014 г. доля нестандартных проб составляла 3,8 % против 3,0 % в 2016 г.)

Таблица 3.1.3 – Доля проб воды в источниках централизованного водоснабжения, не соответствующих гигиеническим требованиям, на территории Пермского края, 2015–2016 гг., (%)

Показатель	Тип источника	2015 г.	2016 г.
Санитарно-химические	Всего	19	21,2
	Поверхностные	57,5	49,3
	Подземные	14,7	17,4
Микробиологические	Всего	4,7	3,7
	Поверхностные	7,4	7,9
	Подземные	4,4	3,0

Высокий уровень нестандартных проб воды по микробиологическим показателям, отобранных из поверхностных водоисточников, в 2016–2017 гг. установлен в г. Чернушке (31,3 %), Краснокамске (33,3 %), Лысьве (10 %), Кунгуре (25 %), Чайковском районе (10 %). Высокий уровень нестандартных проб по санитарно-химическим показателям отмечается в г. Краснокамске (93,7 %), Чернушке (92,8 %), Перми (48,3 %), а также в Губахинском (80 %), Гремячинском (68 %), Чусовском (53 %), Нытвенском (79 %) районах.

Природно-обусловленный повышенный уровень в питьевой воде микроэлементов, а также образование в процессе гипрехлорирования галогенорганических соединений являются актуальными на сегодняшний день для Пермского края (Таблица 3.1.4, Рисунок 3.1.2). В Пермском крае с 2014 г. по 2017 г. стабильно регистрируются повышения нестандартных проб по содержанию химических веществ, образующихся в воде при хлорировании.

В 2014 г. из всех исследованных проб 32 % (по содержанию хлороформа) и 3 % (по содержанию дихлорметана) превышали предельно допустимый уровень, однако в 2017 г. из всех исследованных проб 44 % (по содержанию хлороформа) и 5 % (по содержанию дихлорметана). За анализируемый период времени удельный вес нестандартных исследований питьевой воды систем водопроводов централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения (ЦХПВ) (перед подачей в водопроводную сеть и в разводящей сети) по содержанию хлороформа увеличился на 12 %.

Таблица 3.1.4. – Характеристика территорий Пермского края по преобладающим путям поступления приоритетных загрязнителей питьевую воду систем центрального хозяйственно-питьевого водоснабжения в 2014–2017 гг. (с превышением более 2 ПДК, с превышением среднегодовой концентрации более чем в 1,1 раза)

Территория	Способ поступления загрязняющего вещества	
	загрязнение/ природные свойства источника	обработка воды
г. Пермь	Сульфаты	Алюминий, хлороформ
г. Кунгур	Стронций	Хлороформ, дихлорметан, тетрахлорметан
Кишертский р-н	Стронций, железо, марганец, сульфаты	Хлороформ, дихлорметан
Краснокамский р-н	Железо	Хлороформ
Оханский р-н	Нитраты	-
Пермский р-н	Марганец, железо	Алюминий, хлороформ
Чусовской р-н	-	Алюминий, хлороформ
Горнозаводский р-н, Гремячинский р-н, Губахинский р-н, Октябрьский р-н	Железо	-

За последние два года (2015–2017 гг.) на территории края установлено значительное превышение гигиенических нормативов по 17 из 35 исследуемых санитарно-химических показателям питьевой воды. В частности более 5 ПДК по содержанию галогенорганических соединений (хлороформ, дихлорметан) и более 1,2 ПДК по уровню щелочно–земельных металлов (стронций).

Следовательно, г. Кунгур и г. Пермь, а также Краснокамский, Березовский, Оханский, Пермский, Куединский, Кишертский районы относятся к территориям

с наиболее низким качеством питьевой воды источников и водопроводов централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения по санитарно-химическим показателям (Таблица 3.1.5.).

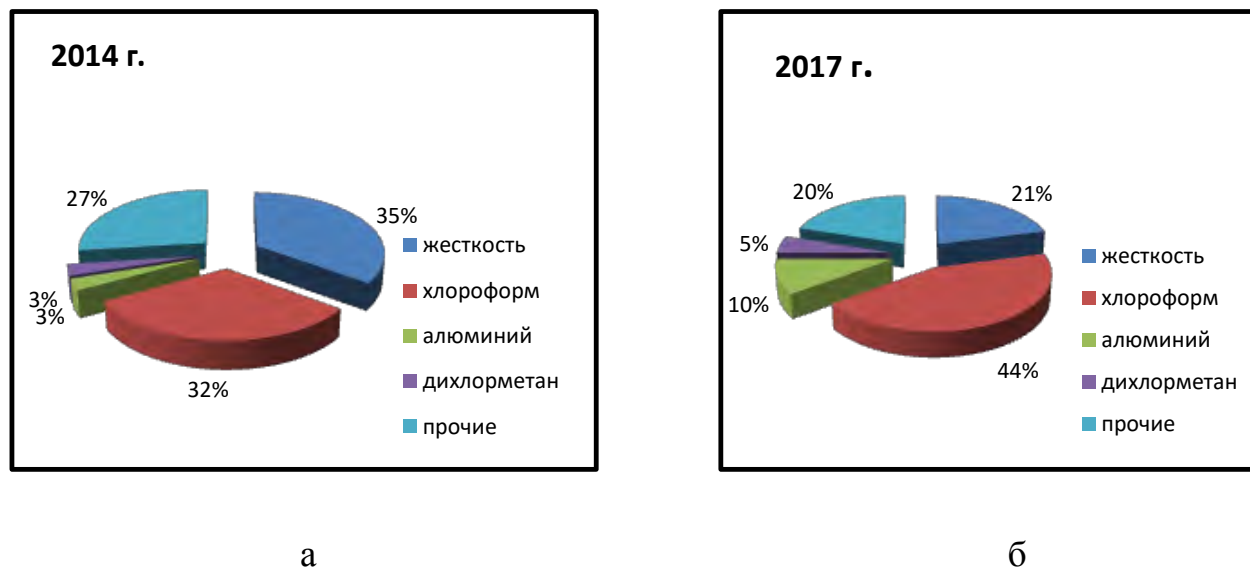


Рисунок 3.1.2 – Структура исследований питьевой воды систем водопроводов централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, не соответствующих гигиеническим требованиям, по санитарно-химическим показателям по данным ФИФ СГМ (перед подачей в водопроводную сеть и в разводящей сети), (%); а – в 2014 г., б – в 2017 г.

Таблица 3.1.5 – Пример ранжирования территорий Пермского края по качеству питьевой воды источников и водопроводов централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения за 2015-2017 гг.

Территория	Ранг территории по санитарно-химическим показателям	Ранг территории по бактериологическим показателям
Краснокамский район	1	5
г. Пермь	3	29
Кишертский район	7	2
Суксунский район	15	1
Оханский район	3	13
Куединский район	6	14
Березовский район	2	19
Кунгурский район	10	12
г. Кунгур	9	38

Очевидно, в Пермском регионе содержание в питьевой воде щелочно-земельных металлов (на примере стронция) и галогенорганических соединений (на примере хлороформа), оказывающих негативное воздействие на костно-мышечную систему и гепатобилиарный тракт, ассоциированных с иммунной системой, остается стабильно высоким.

3.2. Оценка качества водной среды стронциевой геохимической провинции (на примере Пермского края)

Оценка качества воды систем централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения (питьевого водоснабжения) в зоне воздействия стронция

В настоящее время источниками хозяйственно-питьевого водоснабжения населения территории наблюдения являются подземные воды: фактический водоотбор составляет 2,6 тыс. м³/сут. Качество питьевой воды используемого водозабора соответствует требованиям СанПиН 2.1.4.1074-01, кроме содержания иона стронция. По данным ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» на территории стронциевой геохимической провинции доля нестандартных проб питьевой воды по содержанию стронция составляла в отдельных точках мониторинга до 25 %. Лабораторные исследования воды показали, что состав воды стабилен и его изменений не отмечается. Ключевым фактором формирования подземных вод с высоким уровнем содержания стронция является его наличие в горных породах. Вследствие взаимодействия подземных вод с водовмещающими горными породами происходит изменение химического состава этой воды.

При оценке качества питьевой воды хозяйственно-питьевого водоснабжения на территории наблюдения, выполненной ФБУН ФНЦ МПТ УРЗН Роспотребнадзора, идентифицированы превышения предельно допустимых концентраций по стронцию (Рисунок. 3.2.1, Таблица 3.2.2).

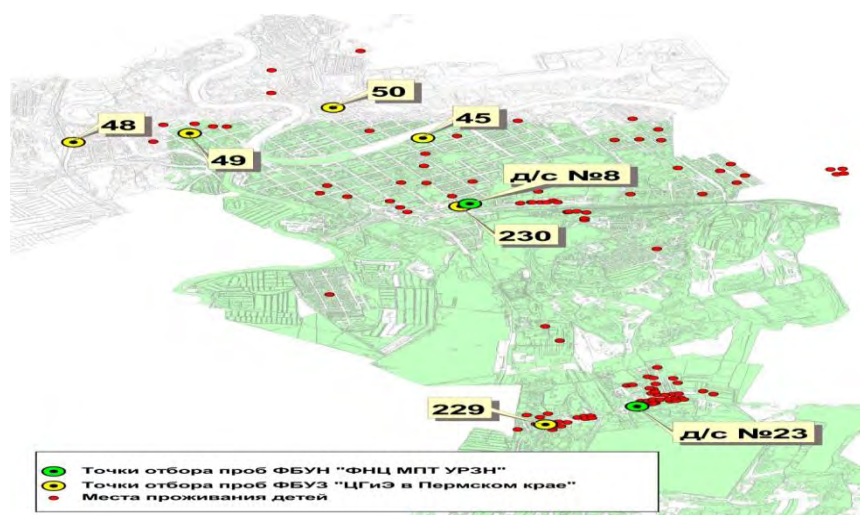


Рисунок 3.2.1 – Карта-схема точек отбора проб воды и мест проживания обследованных детей

Доля нестандартных проб по содержанию стронция в питьевой воде составила 16,7 %, максимальная концентрация стронция – 8,4 мг/л (1,2 ПДК). В ходе сопоставительного анализа результатов исследований установлено, что кратность превышения содержания стронция в пробах воды относительно территории сравнения составляет до 10,9 раза. Содержание стронция в водопроводной воде на территории сравнения не превышает 1 ПДК. Содержание остальных анализируемых ингредиентов в пробах воды централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения населения территории наблюдения и территории сравнения соответствуют гигиеническим нормативам.

Среди всех исследованных веществ наиболее значимыми элементами, формирующими загрязнение питьевых вод территории наблюдения, являются щелочно–земельные металлы (на примере стронция).

Таблица 3.2.2 – Качество питьевой воды обследуемых территорий ($M \pm \sigma$ [95% ДИ], мг/л)

Токсикант	ПДК	Территория сравнения	Территория наблюдения	
			точка отбора №1	точка отбора №2
Стронций	7,0	0,71±0,06 [0,60–0,82]	7,10±1,17 [9,39–4,81]	5,96±0,48 [6,90–5,02]

Содержание железа, кадмия, марганца, никеля, свинца, хрома, мышьяка, фторидов, хлороформа, тетрахлорметана, дибромхлорметана, дихлорбромметана

и 1,2-дихлорэтана в пробах питьевой воды на территории сравнения и территории наблюдения не превышали 1 ПДК.

Для исключения негативного влияния на иммунную систему детей химических веществ, поступающих аэрогенным путем, выполнена гигиеническая оценка качества атмосферного воздуха. Установлено, что приоритетными для территории наблюдения, с выбросами более 10 тонн / год, являются 14 предприятий. По данным формы «2-ТП воздух» валовый выброс загрязняющих веществ в атмосферу от всех предприятий города составляет до 3,225 тыс. тонн в год. Доля веществ IV класса опасности составляет 57,7 % от валового выброса предприятий г. Кунгура, веществ II класса опасности – 0,09 %, в том числе марганца и его соединений – 0,0015 %. Вещества I класса опасности в выбросах предприятий территории наблюдения отсутствуют. Источники выбросов стронция и его соединений в атмосферный воздух г. Кунгура отсутствуют. В структуре выбросов преобладают: углерода оксид – 57,3 %, смесь углеводородов предельных C1–C5 – 21,1 % и сажа – 6,5 %. В Таблице 3.2.3 представлен сравнительный анализ содержания элементов в пробах атмосферного воздуха территории наблюдения и территории сравнения.

Таблица 3.2.3 – Среднее содержание химических веществ и элементов в пробах атмосферного воздуха исследуемых территорий ($M \pm \sigma$; мг/м³)

Химическое вещество	ПДК _{с.с.}	RfC	Территория сравнения	Территория наблюдения
Железо	0,004	0,6	0,00028±0,00014	0,00029±0,00016
Кадмий	0,0003	2,0·10 ⁻⁵	<0,000002	<0,000002
Марганец ⁴⁺ оксид	0,001	5,0·10 ⁻⁵	<0,0001	<0,00001
Никель	0,001	5,0·10 ⁻⁵	0,00002±0,00001	<0,0001
Свинец	0,0003	0,0005	0,00003±0,00001	0,00003±0,00001
Хром ⁶⁺ оксид	0,0015	0,0001	0,00004±0,00002	0,00003±0,00002
Мышьяк	0,003	3,0·10 ⁻⁵	<0,000002	<0,000002
Стронций	0,015	–	0,0000025±0,0000012	<0,0000025

Примечание: здесь и в других таблицах ПДК – предельно допустимые концентрации; RfC – референтная концентрация при ингаляции

Установлено, что существенных различий в содержании в пробах воздуха таких элементов как железо, никель, свинец, стронций, мышьяк, кадмий, хрома⁶⁺ оксид (в перерасчете на триоксид хрома) и марганец не обнаружено.

Очевидно, из данных натуральных исследований следует, что концентрации ни одного из исследуемых веществ в атмосферном воздухе не превышали 1 ПДК, что свидетельствует о соответствии качества атмосферного воздуха на территории наблюдения и территории сравнения требованиям ГН 2.1.6.1338-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест» и СанПиН 2.1.6.1032-01 «Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест».

Таким образом, гигиеническая оценка качества питьевой воды на территории наблюдения позволила установить приоритетные химические вещества природного происхождения, загрязняющие питьевую воду селитебной территорий – стронций (до 1,2 ПДК).

3.3. Оценка качества водной среды территорий с повышенным содержанием в питьевой воде остаточного хлора (на примере Пермского края)

Централизованное хозяйственно-питьевое водоснабжение населения г. Краснокамска (территория наблюдения) осуществляется из поверхностного источника водоснабжения (р. Кама) через Краснокамскую фильтровальную станцию. В г. Краснокамске забор воды для хозяйственно-питьевых нужд из р. Камы производится дальше по направлению подавляющего количества пунктов сброса сточных вод г. Перми, в итоге характер (качество) исходной воды в источнике водоснабжения не соответствует гигиеническим требованиям. На сегодняшний день всего лишь на территории г. Перми насчитывается свыше трех десятков выпусков промышленных сточных вод (Рисунок 3.3.1) [45, 59].

В районе «Пермь – Краснокамск» в р. Каму каждый год сбрасывается более 30 млн м.³ сточных вод без очистки и более 70 млн м.³ неудовлетворительно

очищенных стоков. Удельный вес нестандартных проб в р. Каме по данным Управления Роспотребнадзора по ПК в районе территории наблюдения по микробиологическим и санитарно-химическим показателям в динамике с 2004 по 2011 г. составлял 86–66 % и 91–31 % соответственно. В 2016 году высокий уровень нестандартных проб воды по микробиологическим показателям, отобранным из поверхностных водоисточников, вновь отмечается в Краснокамске (33,3 %) [59].

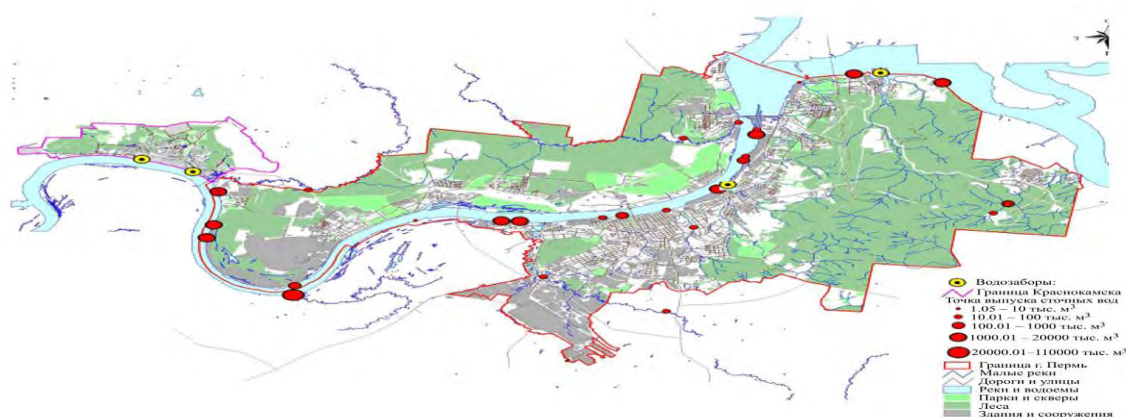


Рисунок 3.3.1 – Места выпусков сточных вод и мест питьевых водозаборов на территории наблюдения

Значительный уровень микробиологического загрязнения создает предпосылки в случае использования поверхностных вод в качестве источника хозяйственно-питьевого водоснабжения интенсивного обеззараживания воды, что приводит к повышенному содержанию хлора и его производных в питьевых водах.

Оценка качества воды систем централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения (питьевое водоснабжение) в зоне воздействия хлороформа

По материалам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» установлено, что на территории наблюдения производится гиперхлорирование водопроводной воды (в 62,5 % всех проб хлор остаточный свободный выше предельно допустимой концентрации, хлор остаточный связанный – в 12,5 % проб), что при существующем уровне загрязнения воды источника водоснабжения органическими веществами является причиной образования и

поступления в питьевую воду высокотоксичных галогенорганических соединений.

В питьевой воде детских учреждений территории наблюдения обнаружены все изучаемые индикаторные соединения – хлороформ, тетрахлорметан, дихлорэтан, дихлорбромметан и дибромхлорметан, относящихся ко 2-му классу опасности и нормируемые по санитарно-токсикологическому признаку вредности (Таблица 3.3.1). В сумме образующихся при водоподготовке тригалометанов хлороформ составляет 70–90 % [57]. Наличие хлороформа в питьевой воде рассматривается как индикатор содержания в ней продуктов хлорирования [35; 45].

Таблица 3.3.1 – Результаты химического анализа питьевой воды территории наблюдения на содержание галогенорганических примесей ($M \pm \sigma$ [95% ДИ], мг/дм³)

Химическое вещество	ПДК	Концентрация, $M \pm \sigma$ [95%ДИ]	Концентрация, доли ПДК
Хлороформ	0,060	0,033±0,010 [0,052–0,014]	до 0,06 до 1 ПДК
Тетрахлорметан	0,002	0,00057±0,0001 [0,00038–0,00076]	до 0,032 до 1,6 ПДК
Дихлорэтан	0,003	0,00088±0,0002 [0,00012–0,00058]	до 0,0056 до 1,87 ПДК
Дихлорбромметан	0,030	0,0261±0,0052 [0,0161–0,0362]	до 0,04 до 1,33 ПДК
Дибромхлорметан	0,030	0,0045±0,0012 [0,0025–0,0068]	до 0,013 0,4 ПДК
Суммация	Допустимый уровень=1,0	-	1,57±0,37 до 2,5

Обнаружено, что содержание хлорсодержащих примесей в питьевой воде не соответствует гигиеническим нормативам (результаты исследований ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»). Зафиксированы в местах отбора превышения в питьевой воде уровня дихлорбромметана в 1,3 раза, дихлорэтана – в 1,47–1,87 раза, тетрахлорметана – в 1,6 раза. В воде разводящей сети регистрируются галогенорганические соединения, оценка их по критерию суммы отношений обнаруженных концентраций, нормируемых по санитарно-токсикологическому признаку

вредности, к ПДК в соответствии с ГН 2.1.5.1315 показала, что данный параметр превышает допустимый уровень до 2,5 раза.

При оценке качества питьевой воды централизованной системы водоснабжения на территории сравнения не обнаружено присутствие изучаемых галогенорганических соединений ни в одной из проанализированных проб. Содержания марганца и меди в водопроводной воде территории сравнения не превышало гигиенических нормативов.

Для исключения негативного влияния на иммунную систему детей химических веществ, поступающих аэрогенным путем, выполнена гигиеническая оценка качества атмосферного воздуха.

На территории г. Краснокамск расположено более 60 предприятий и организаций, являющихся источниками выбросов загрязняющих веществ в атмосферный воздух [59] (Таблица 3.3.2). Приоритетными для территории наблюдения, с выбросами более 10 тонн / год, являются 6 предприятий. По результатам исследований качества атмосферного воздуха на территории г. Краснокамске не установлены превышения по анализируемым примесям (Таблица 3.3.3).

Таблица 3.3.2 – Объем валовых выбросов в атмосферный воздух территории наблюдения (данные формы «2-ТП воздух») (экспозиция хлороформа), 2015 г.

Предприятие	Выброс, т / год
ТЭЦ-5 ОАО «ТГК № 9»	915,328
Камский ЦБК	262,429
Краснокамский хлебокомбинат	30,484
«Краснокамскпромжелдортранс» ОАО	22,855
ЗАО «КАРБОКАМ-ПЕРМЬ»	20,819
Краснокамский завод ЖБК	14,861

Таблица 3.3.3 – Показатели качества атмосферного воздуха территории наблюдения (экспозиция хлороформа) (мг/м³), 2015 г.

Химическое вещество	Среднегодовая концентрация	Доли ПДК _{с.с.}
Ксилол	0,028	0,14
Бензол	0,017	0,17
Этилбензол	0,0146	0,73
Толуол	0,036	006

Очевидно, что концентрации ни одного из исследуемых веществ в атмосферном воздухе не превышали 1 ПДК, что свидетельствует о соответствии качества атмосферного воздуха территории наблюдения и территории сравнения требованиям ГН 2.1.6.1338-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест», а также СанПиН 2.1.6.1032-01 «Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест»

Таким образом, гигиеническая оценка качества питьевой воды, выполненная на территории наблюдения, позволила установить приоритетные химические примеси, загрязняющие питьевую воду селитебной территорий, – галогенорганические соединения (хлороформ) (хлор остаточный свободный – 62,5 % проб выше ПДК, хлор остаточный связанный – 12,5 % проб выше ПДК).

3.4. Особенности формирования микрокомпонентного состава биосред у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием химических веществ природного происхождения

Исследования биологических сред (кровь) детей включали определение 11 показателей (кровь): мышьяк, стронций, марганец, никель, свинец, хром, хлорорганические соединения (хлороформ, тетрахлорметан, 1,2-дихлорэтан, дибромхлорметан, дихлорбромметан).

Установлено, что среднегрупповое содержание мышьяка, марганца, никеля, свинца, хрома у детей группы сравнения и группы наблюдения идентифицировано в диапазоне референтных значений. У детей группы наблюдения и группы сравнения в биосредах галогенсодержащие соединения данной методикой не идентифицированы.

Обнаружено, что у детей группы наблюдения в биологических средах статистически значимо ($p = 0,001$) повышено содержание стронция по сравнению с референтным уровнем в 1,6 раза и статистически значимо ($p = 0,001$) в 11,3 раза повышено по сравнению со значениями, полученными у детей группы сравнения

(Таблица 3.4.1). У детей группы наблюдения доля проб с повышенным уровнем стронция относительно значений, полученных у детей группы сравнения, составила 100 %.

Анализ причинно-следственных связей с использованием математического моделирования выявил адекватные модели зависимости между концентрацией стронция в крови детей и концентрацией стронция в питьевой воде ($b_0 = 0,03195$; $b_1 = 0,01523$; $R^2 = 0,56$; $F = 434,68$; $p < 0,001$) (Рисунок 3.4.1). Установлено, что на 1 мг/л повышения стронция в воде его концентрация в крови возрастает на 0,015 мкг/дм³.

Таким образом, анализ особенностей формирования состояния качества микрокомпонентного состава биологических сред у детей с учетом территориальной гаптенной нагрузки, характеризующейся превышением предельно допустимых концентраций стронция в питьевой воде, выявил дисбаланс содержания химических веществ в крови обследуемых. У детей группы наблюдения установлено статистически значимое ($p = 0,001$) превышение содержание стронция в крови по отношению к референтному уровню (верхняя граница диапазона) в 1,6 раза и группе сравнения в 11,3 раза.

Таблица 3.4.1 – Сравнительная характеристика содержания стронция в биосредах обследуемых детей (мг/дм³)

Показатель	Концентрация стронция в крови				Анализ частот по отношению к контролю (выше контроля, %)
	Группа сравнения ($n = 238$)		Группа наблюдения ($n = 266$)		
	$Me (P_{25}, P_{75})$	[95% ДИ]	$Me (P_{25}, P_{75})$	[95% ДИ]	
Референтные значения	0,01-0,077 (P. Heitland, 2006 г.)*				
Диапазон концентрации	0,002-0,0170		0,0171-0,371		
Среднее значение	0,0109 (0,001; 0,0149)	[0,0083- 0,014]	0,1235 (0,0856; 0,1745)	[0,1108- 0,1474] $p1=0,001, p=0,001$	100 %

Примечание: здесь и в других таблицах главы 4 p^1 – различие с референтными значениями; p – различие между группой сравнения и группой наблюдения; * – Heitland P., Köster H.D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. // J. Trace Elem. Med. Biol. –2006. – Vol. 20 (4). – P. 253–262.

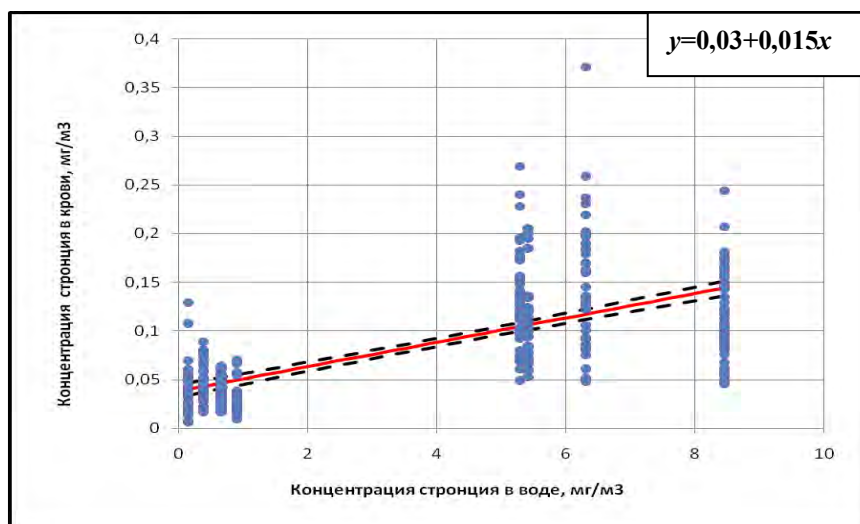


Рисунок 3.4.1 –Зависимость уровня стронция в крови детей от концентрации стронция в питьевой воде

Обобщение результатов математического моделирования причинно-следственных связей в системе «щелочно–земельные металлы в питьевой воде – стронций в крови» позволило установить, что повышенный уровень в крови стронция зависит от концентрации стронция в питьевой воде. Следовательно, стронций в крови следует рассматривать как маркер экспозиции.

3.5. Особенности формирования микрокомпонентного состава биосред у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием химических веществ техногенного происхождения

Результаты химико-аналитического исследования свидетельствуют об идентификации в крови обследованных детей г. Краснокамск представителей галогенорганических соединений (Таблица 3.5.1, 3.5.2). Хлороформ, дихлорбромметан, тетрахлорметан идентифицированы в крови у всех детей, потребляющих гиперхлорированную воду, дибромхлорметан – в 60 %, дихлорэтан – в 52 % от общего количества проб.

Таблица 3.5.1 – Сравнительная характеристика содержания хлороформа в биосредах обследуемых детей, мг/дм³)

Стронций в крови	Группа сравнения (n = 212)	Группа наблюдения (n = 286)	
		Me (P ₂₅ , P ₇₅)	[95% ДИ]
Диапазон концентрации	0	0,00001-0,230	
Среднее значение	-	0,0058 (0,0037; 0,0140)	[0,00089-0,0138]

Установлено, что содержание в биосредах детей группы наблюдения масляного альдегида, п-, м-ксилола, п-, м-крезола, пропионового альдегида, этилбензола, марганца не превышает значений, обнаруженных в образцах крови детей группы сравнения.

Диапазоны значений маркера экспозиции хлороформа у детей, потребляющих питьевую воду ненормативного качества

Для установления ответной реакции иммунной системы на воздействие с учетом уровня экспозиции дети, потребляющие питьевую воду ненормативного качества (по содержанию галогенорганических примесей), были подразделены на две подгруппы (Таблица 3.5.2).

Таблица 3.5.2 – Диапазон значений маркера экспозиции хлороформа у детей, проживающих в зоне воздействия (мг/дм³)

Хлороформ в крови	I подгруппа (n=20)		II подгруппа (n=40)	
	Me (P ₂₅ , P ₇₅)	[95% ДИ]	Me (P ₂₅ , P ₇₅)	[95% ДИ]
Диапазон концентрации	0-0,0032		0,0033-0,0420	
Среднее значение	0,0022 (0,00075; 0,0027)	[0,0011- 0,0023]	0,0068 (0,0052; 0,0027)	[0,0069-0,0122] <i>p</i> = 0,001

Примечание: p – различие между I подгруппой и II подгруппой

Установлено, что у детей II подгруппы (диапазон концентрации хлороформа в крови от 0,0033 до 0,0420 мг/дм³) статистически значимо (*p* = 0,001) превышена средняя концентрация хлороформа в крови по сравнению со средней концентрацией анализируемого компонента в биосредах испытуемых I подгруппы (диапазон концентрации хлороформа в крови от 0,00001 до 0,0032 мг/дм³).

В ходе выявления и оценки параметров зависимости «доза галогенорганического соединения – концентрация тригалометана в крови» получены адекватные модели зависимости между средней суточной дозой хлороформа ($y = 0,02 + 12,854x$, $p = 0,025$), тетрахлорметана ($y = 0,002 + 54,341x$, $p = 0,018$), дибромхлорметана ($y = 0,551 + 0,233x$, $p = 0,007$), 1,2-дихлорэтана ($y = 0,056 + 1,485x$, $p = 0,012$), поступающих с питьевой водой, и концентрацией данных соединений в биосредах детей группы наблюдения.

Пример графического отображения зависимости уровня галогенорганического соединений в крови от дозы хлороформа, поступающего с питьевой водой в организм, представлен на Рисунке 3.5.1.

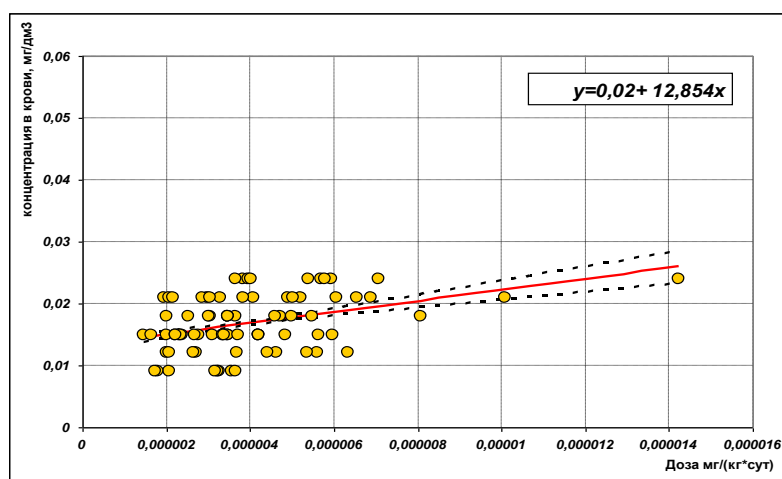


Рисунок 3.5.1 – Зависимость уровня хлороформа в крови от дозы хлороформа, поступающего с питьевой водой в организм детей

Очевидно, микрокомпонентный состав биологических сред (кровь) у детей, потребляющих питьевую воду ненормативного качества (по содержанию хлорсодержащих примесей), характеризуется наличием галогенорганических соединений по сравнению с детьми группы сравнения. По результатам математического моделирования причинно-следственных связей в системе «доза загрязняющего вещества – концентрация контаминанта в крови» установлено, что повышенный уровень в крови тетрахлорметана, дибромхлорметана, хлороформа зависит от средней суточной дозы загрязнений, поступающих в организм с питьевой водой. Таким образом, химическое вещество техногенного происхождения (хлороформ) является маркером экспозиции.

Резюме по главе 3. Основываясь на данных гигиенического анализа водной гаптенной нагрузки, для дальнейшего углубленного исследования обоснован выбор приоритетных территорий: территория, имеющая наиболее неблагоприятные показатели качества питьевой воды по уровню щелочно-земельных металлов (на примере стронция); территория, имеющая наиболее неблагоприятные показатели качества питьевой воды по уровню галогенорганических соединений (на примере хлороформа) (на примере Пермского края).

Установлено, что на территории стронциевой геохимической провинции качество питьевой воды по гигиеническим показателям – содержание стронция до 1,2 ПДК – не соответствовало требованиям гигиенических нормативов. Выявлено, что на территории, где используется гиперхлорированная вода, в воде разводящей сети регистрируются хлороформ (хлор остаточный свободный – 62,5 % проб выше ПДК, хлор остаточный связанный – 12,5 % проб выше ПДК).

Установлено, что повышенное содержание в питьевой воде химических веществ природного происхождения (щелочно-земельные металлы) и техногенного происхождения (галогенорганические соединения) формирует особенности микрокомпонентного состава биосред детей, потребляющих воду ненормированного качества. У детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, в крови статистически значимо, в 1,6 раза, повышено содержание стронция относительно референтных значений ($p = 0,001$) и – в 11,3 раза значений, зарегистрированных у обследуемых группы сравнения ($p = 0,001$). Потребление гиперхлорированной воды формирует микрокомпонентный состав крови обследуемых детей – наличие галогенорганических соединений (хлороформ) в биосредах.

По результатам математического моделирования причинно-следственных связей в системе «стронций в питьевой воде – стронций в крови» и «доза хлороформа – концентрация хлороформа в крови» установлено, что повышенный уровень в крови химических компонентов природного происхождения и техногенного происхождения зависит от концентрации (стронция) и средней

суточной дозы (хлороформа), поступающих в организм с питьевой водой. Очевидно, представленные результаты доказывают, что стронций и хлороформ являются маркерами экспозиции.

ГЛАВА 4. ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ПОСТУПЛЕНИЯ ГАПТЕНОВ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ С ОЦЕНКОЙ РИСКА РАЗВИТИЯ У ДЕТЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОСТНО-МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА

4.1. Актуальные проблемы и современные тенденции динамики заболеваемости костно-мышечной системы и пищеварительной системы у детского населения, проживающего в Российской Федерации на территориях с негативными текущими и предполагаемыми тенденциями

В результате проведенного исследования установлено, что за последние 10 лет уровень впервые выявленной заболеваемости детей от 0 до 14 лет в целом на территории Российской Федерации имеет тенденцию к росту. Как показало исследование, первичная заболеваемость среди детского населения в регионах России значительно отличается. По данным за 2006–2016 г, в ряде округов РФ этот показатель выше среднероссийского в среднем в 1,3 раза (в Северо-Западном федеральном округе, в Дальневосточном федеральном округе, в Приволжском федеральном округе, в том числе Пермском крае) (Таблица 4.1.1).

Общая заболеваемость детского населения от 0 до 14 лет, проживающего на территории РФ, за период 2006–2016 гг. имеет незначительную положительную тенденцию (темп убыли составил 0,06 %), но при этом имеет определенные статистические особенности. Наиболее неблагоприятные статистические тенденции отмечаются в Дальневосточном федеральном округе (ФО), Северо-Западном федеральном округе, Приволжском федеральном округе, Пермском крае. Напротив, в Уральском и Центральном федеральных округах отмечается незначительное снижение общей заболеваемости среди детского населения за

анализируемый период времени (темп убыли составил 2,9 и 7,1 % соответственно).

Таблица 4.1.1 – Распространённость и динамика общей / впервые выявленной заболеваемости у детей (0-14 лет), проживающих в Российской Федерации на территориях с наиболее неблагоприятными тенденциями, 2006–2016 г., сл. на 100 тыс. детского населения

Субъект Федерации	Общая заболеваемость	Темп прироста/убыли, %	Субъект Федерации	Впервые выявленная заболеваемость	Темп прироста/убыли, %
Российская Федерация	224933,5	-0,06	<i>Российская Федерация</i>	179444,1	1,96
<i>Северо-Западный ФО</i>	290893,2	10,1	<i>Северо-Западный ФО</i>	236222,2	10,7
<i>Приволжский ФО</i>	<i>253860,4</i>	<i>4,2</i>	<i>Приволжский ФО</i>	<i>199461,1</i>	<i>8,4</i>
Пермский край	285147,0	2,4	Пермский край	225268,8	4,0
<i>Дальневосточный ФО</i>	240773,2	14,6	<i>Дальневосточный ФО</i>	200471,4	6,0

В ходе настоящего исследования выявлено, что наиболее значимый вклад в формирование показателя общей и первичной заболеваемости детского населения (0–14 лет) РФ вносят следующие классы болезней, в том числе иммуноассоциированные: болезни нервной системы, эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, органов пищеварения, костно-мышечной системы и соединительной ткани, мочеполовой системы.

Необходимо отметить, что костно-мышечная система тесно связана с иммунной системой общностью происхождения и функций [156, 246, 422]. Костно-мышечная и иммунная системы, взаимодействуя друг с другом, являются механизмом, поддерживающим гомеостаз в организме человека, нарушение которого приводит к заболеванию. Результаты оценки официальных статистических данных показали, что общая и первичная заболеваемость болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани среди детского населения (0–14 лет) в регионах России значительно отличается. По сравнению с 2006 г. уровень общей заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани в 2008 г. по РФ вырос, темп прироста составил 2 % (с

8029,8 до 8180,7 сл. на 100 тыс. детского населения), в Приволжском федеральном округе – 2,7 % (с 8988,6 до уровня 9227,7 сл. на 100 тыс. детского населения), при этом в 1,2 раза превышая общероссийский уровень. Максимальный среднегодовой темп прироста в РФ и Приволжском федеральном округе в период с 2006 по 2016 г. наблюдался в 2008 г., затем темп прироста анализируемой заболеваемости незначительно снизился. Анализ динамики первичной заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани среди детского населения с 2006 по 2008 г. показал повышение регистрации данной патологии в целом по РФ с 3843,9 до уровня 4004,6 сл. на 100 тыс. детского населения (4,2 %), на территории Приволжского федерального округа – с 4264,5 до 4658,1 сл. на 100 тыс. детского населения (9,2 %) и Северо-Западного федерального округа – с 4040,4 до 4341,8 сл. на 100 тыс. детского населения (7,5 %).

По данным за 2016 г. в трех федеральных округах показатель общей заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани в 1,3 раза выше среднероссийского (Таблица 4.1.2).

Таблица 4.1.2 – Распространённость и динамика болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани у детей (0–14 лет), проживающих в Российской Федерации, 2014–2016 гг., сл. на 100 тыс. детского населения

Субъект Федерации	Общая заболеваемость	Темп прироста / убыли, %
Российская Федерация	7665,4	1,4
<i>Северо-Западный ФО</i>	11773,5	18,7
<i>Приволжский ФО</i>	8725,5	4,4
Пермский край	8326,9	-10,4
<i>Центральный ФО</i>	7895,9	-10,6
<i>Сибирский ФО</i>	7365,7	7,2
<i>Уральский ФО</i>	6987,7	3,0
<i>Южный ФО</i>	6744,3	2,4
<i>Дальневосточный ФО</i>	4964,8	-4,9
<i>Северо-Кавказский ФО</i>	4240,5	-12,8

В Пермском крае в 2014 г. данный показатель на 20 % превышал общероссийский и составлял 9194,8 сл. на 100 тыс. детского населения. В 2016 г. также отмечается превышение распространенности болезней костно-мышечной

системы относительно общероссийских значений на 10 %. В 2014–2016 гг. темп прироста общей заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани в Северо-Западном ФО составил 18,7 %, Приволжском ФО – 4,4 %, Сибирском ФО – 7,2 %.

По состоянию на 2016 г. в РФ показатели первичной заболеваемости между субъектами опять же значительно различались. Наиболее высокая заболеваемость отмечалась в Северо-Западном ФО (5284,2 сл. на 100 тыс. детского населения), Пермском крае (4362,2 сл. на 100 тыс. детского населения, в 1,3 раза превышая аналогичный показатель по Приволжскому ФО и в 1,4 раза – по РФ), Приволжском ФО (3453,5 сл. на 100 тыс. детского населения), наименьшая – в Дальневосточном ФО (2576,2 сл. на 100 тыс. детского населения), а в целом по России составляла 3204,4 сл. на 100 тыс. детского населения.

На территориях РФ с высоким процентом проб питьевой воды, превышающих ПДК по содержанию стронция более чем в два раза, ассоциированные заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани у детей составляли от 1,9 до 5,1 % от общей заболеваемости (Брянская (Центральный ФО), Московская (Центральный ФО), Тульская (Центральный ФО), Смоленская (Центральный ФО) области, Пермский край (Приволжский ФО), Татарстан (Приволжский ФО)) (Таблица 4.1.3).

Таблица 4.1.3 – Пример ранжирования территорий РФ по безопасности питьевой воды по содержанию химических веществ природного происхождения, ассоциированных с заболеваниями костно-мышечной системы у детей от 0 до 14 лет, 2017 г.

Территория	Стронций в воде от 2 до 5 ПДК		% заболеваний костно-мышечной системы от общей заболеваемости, сл. на 100 тыс. дет. населения
	% нестандартных проб	ранговое место	
Российская Федерация	2,3	-	3,45
Брянская область (Центральный ФО)	9,09	1	1,94
Московская область (Центральный ФО)	7,62	2	2,71
Смоленская область (Центральный ФО)	2,38	3	5,06
Пермский край (Приволжский ФО)	1,67	4	3,0
Тульская область (Центральный ФО)	1,01	5	3,02
Республика Татарстан (Приволжский ФО)	0,29	6	2,94

Гепатобилиарная система функционирует в тесной связи с окружающими ее органами и системами, среди которых важнейшей является иммунная система [112, 211]. Патологические процессы в печени могут спровоцировать нарушение функций всего организма, что обуславливает необходимость в изучении распространенности и заболеваемости гепатобилиарного тракта, связанного с иммунной системой, с целью раннего выявления этих нарушений, а также определения приоритетных направлений развития тех или иных методов индикации и профилактики.

Изучена заболеваемость детского населения (0–14 лет) РФ болезнями органов пищеварения. Установлено, что в динамике за 2006–2016 гг. первичная (темп убыли 16,2 %; с 8508,5 до 7128,4 сл. на 100 тыс. детского населения), общая (темп убыли составил 13,7 %; с 15221,6 до 13133,1 сл. на 100 тыс. детского населения) заболеваемость детского населения снижается. Между тем, несмотря на положительную динамику, на сегодняшний день болезни органов пищеварения в структуре общей заболеваемости занимают ведущее место. Также следует подчеркнуть, что общая тенденция к их росту продолжается в отдельных регионах страны. Необходимо отметить, что за 2006–2016 гг. высокий уровень заболеваемости и значительные темпы прироста заболеваний органов пищеварения отмечались в Северо-Западном ФО (5,0 %; с 15001,8 до 15707,5 сл. на 100 тыс. детского населения), Пермском крае (23,8 %; с 15943,4 до 19731,0 сл. на 100 тыс. детского населения). Также в 2016 г. на территориях Северо-Западного ФО, Сибирского ФО и Пермского края у детей отмечается превышение общероссийских показателей общей и впервые выявленной патологии пищеварительного тракта (до 1,5 раза).

По результатам анализа официальных статистических данных установлено, что уровень общей заболеваемости детского населения РФ болезнями печени за 2012–2016 гг. повысился с 40,9 до 44,0 сл. на 100 тыс. детского населения (темп прироста составил 7,8 %). Следует отметить, что за период 2010–2015 гг. на территории Приволжского федерального округа у детей регистрируется превышение общероссийских показателей общей и впервые выявленной

патологии печени (до 2 раз). В Пермском крае у детей также отмечаются превышения общероссийских показателей общей и впервые выявленной патологии печени (до 5 раз) (Таблица 4.1.4).

Таблица 4.1.4 – Заболеваемость болезнями печени и болезнями желчного пузыря, желчевыводящих путей детского населения (от 0 до 14 лет) по субъектам РФ, 2016 г., сл. на 100 тыс. детского населения

Субъект Федерации	Болезни печени		Болезни желчного пузыря, желчевыводящих путей	
	общая заболеваемость	впервые выявленная заболеваемость	общая заболеваемость	впервые выявленная заболеваемость
Российская Федерация	44,0	14,2	1527,7	563,1
<i>Уральский ФО</i>	61,7	24,8	1496,4	662,4
Челябинская область	16,0	7,7	1161,7	454,0
<i>Приволжский ФО</i>	61,6	22,1	2261,1	771,2
Пермский край	161,0	68,4	1815,6	713,6
<i>Северо-Кавказский ФО</i>	66,1	15,3	1202,1	420,7
<i>Южный ФО</i>	46,1	12,4	1952,9	507,0
Волгоградская область	12,3	3,2	1936,4	540,8
<i>Сибирский ФО</i>	43,0	13,7	1093,2	463,6
<i>Дальневосточный ФО</i>	35,8	9,4	1822,0	718,5
<i>Северо-Западный ФО</i>	32,5	9,7	1678,0	677,4
Архангельская область	9,6	5,1	1401,5	419,4
Вологодская область	28,9	10,0	2239,3	679,9
Республика Карелия	41,2	16,9	1178,9	344,9
Новгородская область	16,1	8,0	896,5	280,1
<i>Центральный ФО</i>	18,5	6,4	1195,4	410,5

По сравнению с 2014 г. в целом по России в 2016 г. значительно увеличилась заболеваемость детей болезнями печени – с 41,6 до 44,0 сл. на 100 тыс. детского населения (темп прироста составил 5,8 %), причем в отдельных регионах темп прироста за последние два года превышал общероссийский до 34 раз. Так, в Дагестане (Северо-Кавказский ФО) заболеваемость болезнями печени увеличилась с 100,9 до 128,5 сл. на 100 тыс. детского населения (27,4 %), Курганской области (Уральский ФО) – с 137,0 до 254,9 сл. на 100 тыс. детского населения (86 %), Хакасии (Сибирский ФО) – с 69,9 до 208,6 сл. на 100 тыс. детского населения (198,4 %).

Оценка результатов исследования показала, что на территории Уральского ФО, Приволжского ФО, Северо-Кавказского ФО, а также на территории

Пермского края в 2016 г. наблюдается превышение общероссийских показателей первичной и общей заболеваемости болезнями желчного пузыря, желчевыводящих путей до 1,5 раза (Таблица 4.1.4).

В целом на территории РФ заболевания печени, ассоциированные с воздействием факторов среды обитания, у детского населения достигали 0,34 % от всех зарегистрированных заболеваний пищеварительной системы, а на территории Пермского края этот показатель составлял 0,89 %, что в 2,6 раза превышает общероссийский (Таблица 4.1.5).

Таблица 4.1.5 – Пример ранжирования территорий РФ с повышенным уровнем хлороформа в питьевой воде, ассоциированного с заболеваниями печени у детей от 0 до 14 лет, 2017 г.

Территория	Ранговое место по % нестандартных проб > 1 ПДК	% заболеваний печени, от всех заболеваний ЖКТ, сл. на 100 тыс. дет. населения
Российская Федерация	-	0,34
Волгоградская область (<i>Южный ФО</i>)	1	0,16
Кировская область (<i>Приволжский ФО</i>)	2	0,16
Архангельская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	3	0,05
Пермский край (<i>Приволжский ФО</i>)	4	0,89
Республика Карелия (<i>Северо-Западный ФО</i>)	5	0,15
Челябинская область (<i>Уральский ФО</i>)	6	0,12
Вологодская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	7	0,24
Новгородская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	8	0,23
Мурманская область (<i>Северо-Западный ФО</i>)	9	0,25
Ярославская область (<i>Центральный ФО</i>)	10	0,16

Установлено, что с 2006 по 2014 г. уровень впервые выявленных заболеваний мочеполовой системы у детей от 0 до 14 лет в целом по России имеет тенденцию к постепенному, хотя и не очень значительному, его снижению – с 3047,2 до 3046,2 сл. на 100 тыс. детского населения (-0,03 %).

Установлено, что с 2006 по 2014 г. уровень впервые выявленных заболеваний мочеполовой системы у детей от 0 до 14 лет в целом по России имеет тенденцию к постепенному, хотя и не очень значительному, его снижению – с 3047,2 до 3046,2 сл. на 100 тыс. детского населения (-0,03 %). Следует отметить, что в ряде регионов РФ сохраняются негативные тенденции. Наибольший темп

прироста наблюдается на территории Северо-Западного федерального округа – 14,7 % (с 3022,3 до 3465,8 сл. на 100 тыс. детского населения), Приволжского федерального округа – 6,0 % (с 3274,7 до уровня 3469,5 сл. на 100 тыс. детского населения), Пермского края – 12,7 % (с 3460,9 до уровня 3901,4 сл. на 100 тыс. детского населения). По сравнению с 2006 г. уровень общей заболеваемости болезнями мочеполовой системы в 2014 г. по РФ снизился с 5792,2 до 5410,2 сл. на 100 тыс. детского населения (темп убыли – 6,6%), в Приволжском ФО с 6338,2 до уровня 6164,7 сл. на 100 тыс. детского населения (темп убыли – 2,7 %). Между тем за данный период времени в Пермском крае отмечается прирост заболеваний мочеполовой системы (с 7237,0 до уровня 8019,8 сл. на 100 тыс. детского населения; темп прироста – 10,8 %).

Как показало исследование, общая заболеваемость эндокринной патологией среди детского населения от 0 до 14 лет в регионах России значительно отличается. По данным за 2016 г. в отдельных субъектах РФ этот показатель до 1,3 раза выше среднероссийского – 4113,6 сл. на 100 тыс. детского населения (в Приволжском федеральном округе – 4891,5 сл. на 100 тыс. детского населения, в Пермском крае – 5516,5 сл. на 100 тыс. детского населения, в Северо-Западном федеральном округе – 4284,7 сл. на 100 тыс. детского населения, в Уральском федеральном округе – 4422,3 сл. на 100 тыс. детского населения, в Северо-Кавказском федеральном округе – 4187,0 сл. на 100 тыс. детского населения, в Сибирском федеральном округе – 4170,7 сл. на 100 тыс. детского населения). Рассматривая динамику впервые выявленной эндокринной патологии у детей за период с 2014–2016 гг. в целом по РФ, можно отметить ее тенденцию к повышению, темп прироста составил 4,9 % (с 1492,8 до 1566,9 сл. на 100 тыс. детей), а также по отдельным субъектам Российской Федерации: в Дальневосточном федеральном округе – 35,6 %, с 919,0 до 1246,4 сл. на 100 тыс. детского населения, в Приволжском федеральном округе – 1,4 %, с 1634,0 до 1656,7 сл. на 100 тыс. детского населения.

Анализ динамики патологии нервной системы среди детского населения РФ с 2006 по 2014 г. показал повышение регистрации заболеваний с 8557,3 до 8963,5

сл. на 100 тыс. детского населения (темпы прироста – 4,7%), в том числе установленных впервые в жизни – с 3777,6 до 3983,6 сл. на 100 тыс. детского населения (темпы прироста – 5,5%). Неблагоприятные тенденции роста общей заболеваемости болезнями нервной системы среди детей отмечаются в Южном федеральном округе (с 7465,0 до 9651,5 сл. на 100 тыс. детского населения (29,3%), в том числе впервые выявленной – с 3177,0 до 4428,8 сл. на 100 тыс. детского населения (39,4%)), Северо-Западном ФО (с 8254,7 до 9451,5 сл. на 100 тыс. детского населения (14,5%), в том числе впервые установленной – с 3507,2 до 4403,0 сл. на 100 тыс. детского населения (25,5%)), Приволжском ФО (с 10902,1 до 11919,3 сл. на 100 тыс. детского населения (9,3%), в том числе впервые выявленной – с 4676,7 до 4948,2 сл. на 100 тыс. детей (5,8%)), Пермском крае (с 8483,8 до 10730,0 сл. на 100 тыс. детей (26,5%), в том числе впервые выявленной с 4110,7 до 4419,0 сл. на 100 тыс. детского населения (7,5%)). Между тем уровень первичной заболеваемости болезнями нервной системы в целом по РФ в 2014 г. составил 3983,6 сл. на 100 тыс. детского населения, а в 2016 г. – 3727,2 сл. на 100 тыс. населения (-6,4%). В Приволжском федеральном округе этот показатель в 2014 г. составил 4948,2 сл. на 100 тыс. детского населения, а в 2016 г. – 4478,2 сл. на 100 тыс. детского населения (-9,5%), в Пермском крае в 2014 г. – 4419,0 сл. на 100 тыс. детского населения, а в 2016 г. – 3760,6 сл. на 100 тыс. детского населения (-14,9%) соответственно. Между тем на территории Северо-Западного ФО наблюдается прирост данной патологии среди детей на 7,7% (с 4403,0 до 4741,9 сл. на 100 тыс. населения).

При обобщении полученной информации удалось установить, что заболеваемость эндокринной патологией, болезнями нервной системы, мочевыделительной системы, пищеварительной системы, а также костно-мышечной системы и соединительной ткани среди детского населения РФ имеет существенные территориальные различия. Между тем наиболее приоритетной патологией, в патогенезе которой значимая роль принадлежит дисфункции иммунной системы, у детей по данным статистического анализа заболеваемости являются заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани и

заболевания желудочно-кишечного тракта. Необходимо отметить, что показатели анализируемой заболеваемости на территории Приволжского округа до 5 раз превышали общероссийские. Таким образом, существует необходимость более детального изучения структуры и динамики заболеваемости у детей, проживающих на территориях с текущими негативными и прогнозируемыми тенденциями (на примере Пермского края).

Распределение субъектов РФ по уровню заболеваемости детей и уровню санитарно-эпидемиологического благополучия.

По результатам оценки регионов РФ по комплексу санитарно-гигиенических и медико-эпидемиологических показателей выделены территории, характеризующиеся: высоким процентом проб воды, не соответствующих гигиеническим нормативам по содержанию стронция (до 54 %) или хлороформа (до 60 %), наиболее высоким уровнем детской заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани (превышение общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 2,6 раза) или гепатобилиарного тракта (превышение общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 12 раз) соответственно (**очень высокий риск** нарушения здоровья детского населения); отсутствием нестандартных проб по содержанию стронция или хлороформа в воде, высоким уровнем детской заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани (превышение общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 2 раз) или гепатобилиарного тракта (превышение общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 2,5 раза) соответственно (**высокий риск** нарушения здоровья детского населения); наличием нестандартных проб по содержанию стронция (до 18 %) или хлороформа (до 17 %), низким уровнем детской заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани (ниже общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 1,5 раза) или гепатобилиарного тракта (ниже общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 4,3 раза) соответственно (**средний**

риск нарушения здоровья детского населения); отсутствием нестандартных проб по содержанию стронция или хлороформа в воде, низким уровнем детской заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани (ниже общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 2,2 раза) или гепатобилиарного тракта (ниже общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии до 5,1 раза) соответственно (**малый риск** нарушения здоровья детского населения) (Рисунок 4.1.1, 4.1.2).

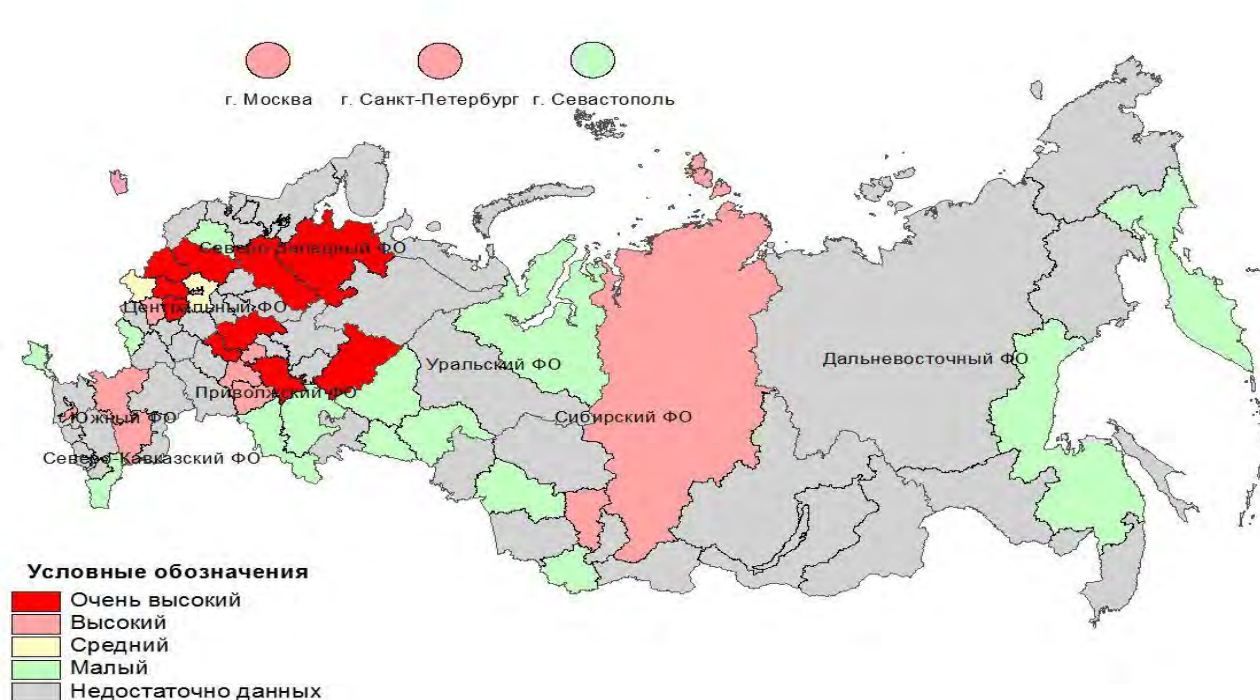


Рисунок 4.1.1 – Распределение субъектов Российской Федерации по уровню заболеваемости детского населения патологией костно-мышечной системы и соединительной ткани, ассоциированной с водной гаптенной нагрузкой

Ряд регионов Центрального ФО (Белгородская область), Северо-Западного ФО (Новгородская область), Южного ФО (Республика Крым, город Севастополь), Северо-Кавказского ФО (Республика Дагестан), Приволжского ФО (Республика Башкортостан, Оренбургская область), Уральского ФО (Курганская область, Свердловская область, Тюменская область без АО, Ямало-Ненецкий АО), Сибирский ФО (Республика Алтай, Новосибирская область), Дальневосточного ФО (Камчатский край, Хабаровский край) относятся к территориям с возможным малым риском нарушения здоровья детского населения по болезням костно-

мышечной системы и соединительной ткани, ассоциированным с факторами окружающей среды.

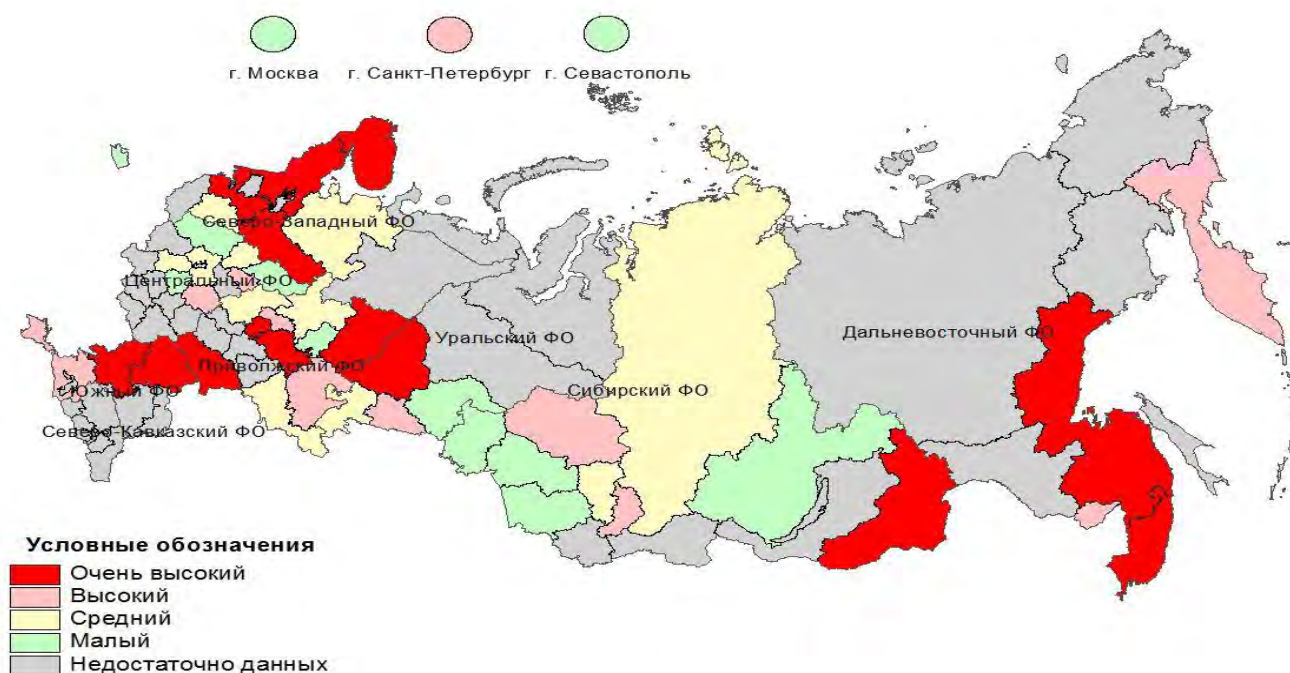


Рисунок 4.1.2 – Распределение субъектов Российской Федерации по уровню заболеваемости детского населения патологией гепатобилиарного тракта (болезни печени, желчного пузыря, желчевыводящих путей), ассоциированной с водной гаптенной нагрузкой

Ряд регионов Центрального ФО (Костромская область, Тверская область, город Москва, Тульская область), Южного ФО (город Севастополь), Приволжского ФО (Удмуртская Республика, Тюменская область без АО), Сибирский ФО (Алтайский край, Иркутская область, Новосибирская область, Омская область) относятся к территориям с малым риском нарушения здоровья детского населения по болезням печени, желчного пузыря, желчевыводящих путей, ассоциированным с факторами окружающей среды.

Ряд регионов Центрального, Северо-Западного (Архангельская, Вологодская области), **Приволжского (Пермский край)** федеральных округов относятся к территориям с возможным очень высоким риском нарушения здоровья детского населения в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере *стронция*).

Ряд регионов Северо-Западного (Карелия, Вологодская, Мурманская, Ленинградская области), Южного, Сибирского, Дальневосточного и **Приволжского (Пермский край)** федеральных округов относятся к территориям с возможным очень высоким риском нарушения здоровья детского населения в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере **хлороформа**).

Сравнительная оценка заболеваемости, структуры и динамики заболеваемости у детей, проживающих на территории Пермского края

На территории Пермского края отмечается повышение общей и впервые зарегистрированной заболеваемости в целом по всем классам заболеваний среди детского населения за период 1992–2017 гг. (темп прироста составил 12,0 и 8,6 % соответственно). Установлено, что за анализируемый период наблюдения на территории Пермского края отмечается выраженная тенденция к росту общей заболеваемости ($R^2 = 0,741$) (Рисунок 4.1.3).

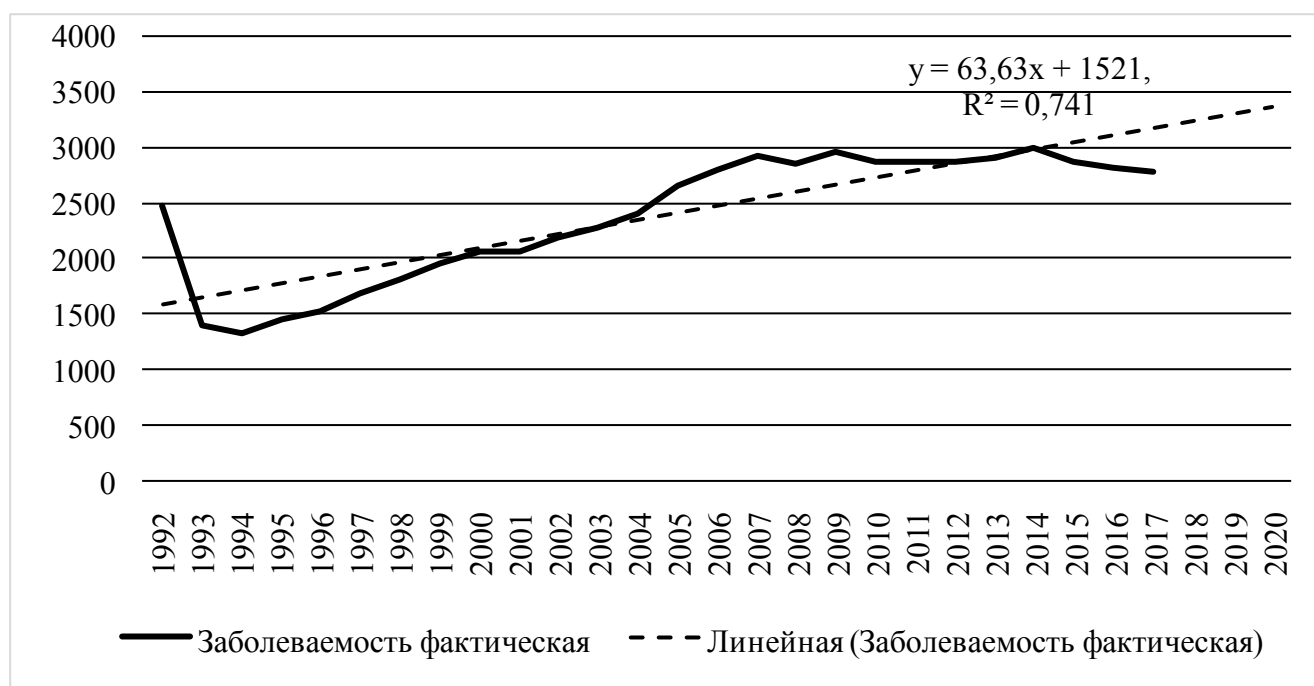


Рисунок 4.1.3 – Динамика общей заболеваемости детей, проживающих на территории Пермского края за 1992–2017 гг., всего сл. / 1000 детей от 0 до 14 лет

Как показало исследование, первичная заболеваемость среди детского населения Пермского края значительно отличается. По данным за 1992–2017 гг. в ряде районов этот показатель выше среднекраевого уровня в среднем в 1,1 раза

(Краснокамский район и др.), однако на других территориях края – ниже до 2 раз (Сивинский район, Ильинский район).

Анализ динамики патологии пищеварительного тракта среди детского населения ПК в целом с 1992 по 2016 г. показал повышение регистрации заболеваний в 2 раза, в том числе установленных впервые в жизни – в 1,7 раза. Максимальный рост общей и впервые выявленной патологии желудочно-кишечного тракта наблюдается на территории Краснокамского района – более чем в 2 раза, между тем на территории Сивинского, Ильинского районов отмечается снижение изучаемых показателей в 2 раза и при этом, они остаются ниже среднекраевых

Также за анализируемый период в Пермском крае наблюдаются неблагоприятные тенденции роста общей заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани среди детей до 6,6 раза, а зарегистрированной впервые – до 2,4 раза. Так, на территории Кунгурского района только начиная с 1992 по 2014 г. данные показатели выросли в 4 и 2 раза соответственно. Причем в период 1992–2007 гг. показатели заболеваемости костно-мышечной системы и соединительной ткани в Кунгурском районе стабильно в среднем в 3 раза (в отдельных случаях до 5 раз) превышали аналогичные показатели по Пермскому краю в целом. По сравнению с 1992 г. в г. Кунгуре в 2014 г. значительно увеличилась заболеваемость детей (0–14 лет) болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани – с 40,37 до 144,37 на 1 тыс. детского населения (темп прироста составил 257,6 %), в том числе впервые выявленной с 39,32 до 76,42 сл. на 1 тыс. детского населения (темп прироста составил 94,4 %). В г. Краснокамске в 2016 г. по сравнению с 1992 г. отмечается существенный подъем заболеваемости болезнями органов пищеварительной системы среди детского населения – с 52,15 до 104,13 на 1 тыс. детского населения (темп прироста составил 99,7 %), в том числе впервые выявленной с 25,93 до 49,71 сл. на 10 тыс. детского населения (темп прироста составил 91,7 %). Однако на территории Ильинского района за период 2000–

2016 гг. наблюдается снижение уровня распространенности заболеваний опорно-двигательного аппарата среди детского населения в 1,7 раза.

Уровень первичной заболеваемости болезнями нервной системы в целом по ПК в 2007–20016 гг. снизился в 1,42 раза. Только на территории Краснокамского района показатели общей и первичной заболеваемости болезнями нервной системы снизились в 1,36 раза. Вместе с тем в данный период времени на территории Пермского края наблюдается рост патологии эндокринной системы и патологии мочеполовой системы среди детей в среднем в 1,9 раза. По сравнению с 1992 г. уровень общей заболеваемости и впервые зарегистрированной патологии эндокринной системы в 2016 г. по Краснокамскому району возрос в 3,5 раза, между тем данные показатели не превысили общекраевых. Найдено, что в Краснокамском районе за анализируемый период времени наблюдается повышение заболеваний мочеполовой системы, в том числе впервые выявленной, в среднем в 4 раза, однако их уровень в среднем в 1,5 раза остается ниже, чем по Пермскому краю в целом.

Заболевания пищеварительной системы и костно-мышечной системы в структуре первичной и общей заболеваемости детского населения (0–14 лет) Пермского края в 1992 г. из 18 классов болезней занимали 6-е (4,02 %) и 15-е (0,51 %) ранговые места соответственно, а в 2017 г. – 2-е (5,2 %) и 8-е (3 %) ранговые места соответственно (Рисунки 4.1.4, 4.1.5). При этом заболевания эндокринной системы в структуре первичной и общей заболеваемости детского населения Пермского края, занимавшие в 1992 г. 10-е (0,98 %) ранговое место, в 2017 г. переместились на 12-е (1,97 %) ранговое место.

В период с 1992 по 2017 г. в ПК заболевания мочеполовой системы у детей в структуре первичной и общей заболеваемости занимали 8-е (1,7 %) и 10-е (2,42 %) ранговые места.



Рисунок 4.1.4 – Структура общей и первичной заболеваемости детского населения ПК за 1992 г., %



Рисунок 4.1.5 – Структура общей и первичной заболеваемости детского населения ПК за 2017 г., %

Заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани в структуре первичной и общей заболеваемости детского населения Кунгурского района в 2007 г. занимали 7-е ранговое место, а в 2014 г. – 3-е. Заболевания органов пищеварения в структуре первичной и общей заболеваемости детского населения Краснокамского района в 2010 г. занимали 5-е ранговое место, а в 2014 г. – 2-е.

Установлено, что распространенность болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани, а также заболеваний желудочно-кишечного тракта у детей, проживающих на территории края (Кунгурского района и Краснокамского района соответственно), имеют тенденцию к повышению ($R_I^2 = 0,114$ и $R_I^2 = 0,574$ соответственно) (Рисунки 4.1.6, 4.1.7).

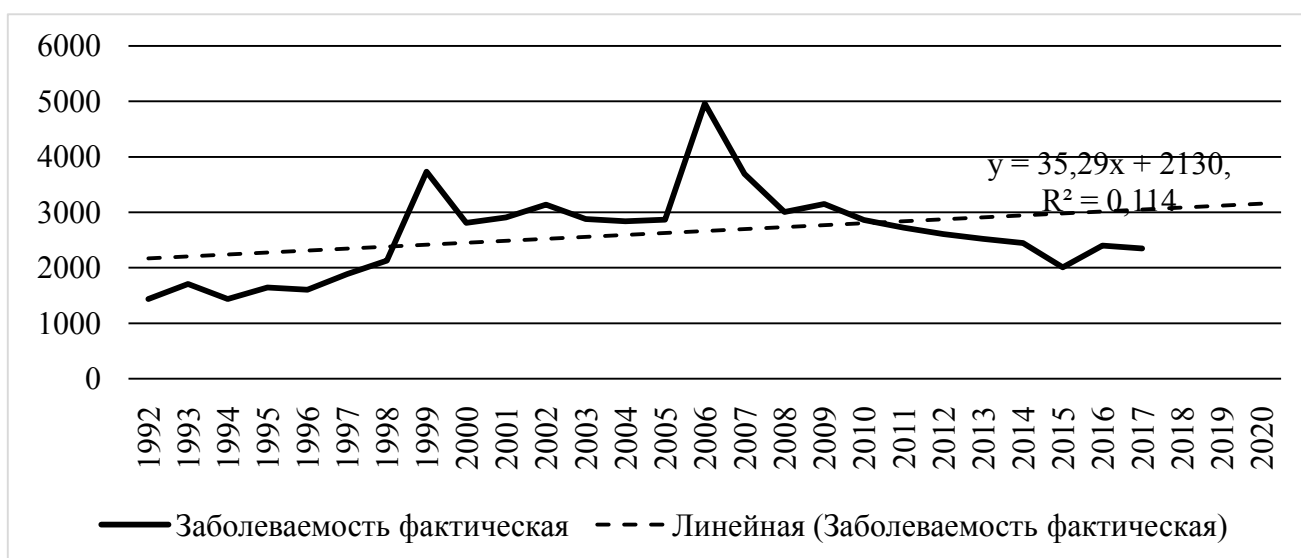


Рисунок 4.1.6 – Динамика общей заболеваемости детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани за 1992–2017 гг., на 1000 детей от 0 до 14 лет

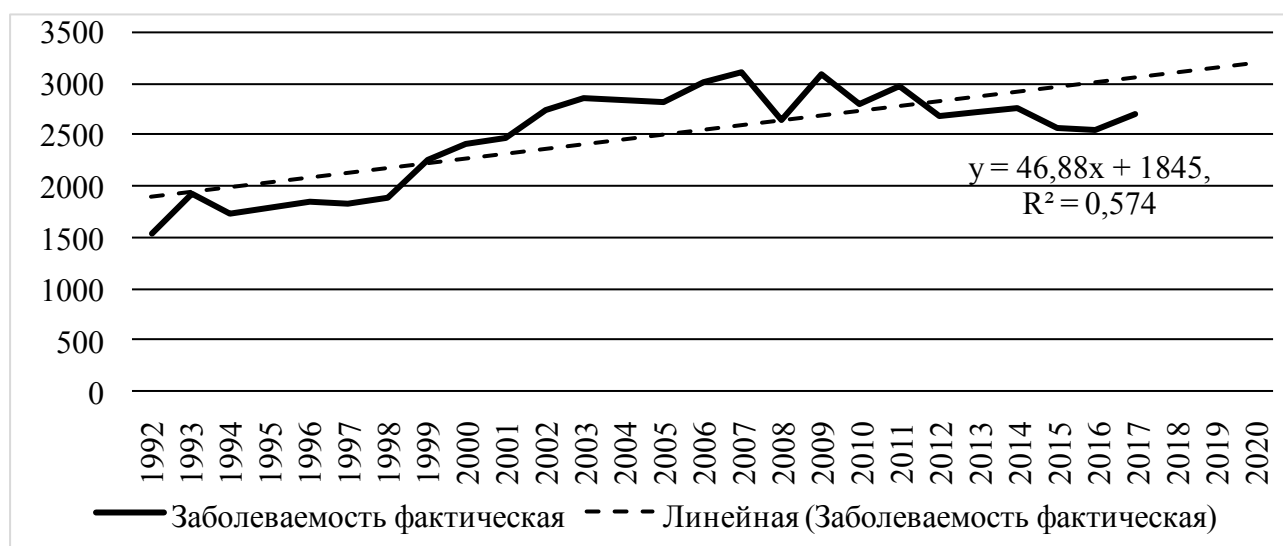


Рисунок 4.1.7 – Динамика общей заболеваемости детей, проживающих на территории, где используется гиперхлорированная вода, болезнями органов пищеварения за 1992–2017 гг., на 1000 детей от 0 до 14 лет

Таким образом, наиболее неблагоприятные тенденции отмечаются на территории стронциевой геохимической провинции и территории, где используется гиперхлорированная вода (на примере Пермского края), на которых зафиксированы высокие уровни заболеваемости и опережающие темпы прироста иммуноассоциированных нарушений – заболеваний костно-мышечной системы (в 4 раза превышающих общекраевые показатели заболеваемости, за 1992–2014 гг.

темпы прироста – 257,6 %) и пищеварительной системы (в 2 раза превышающих общекраевые показатели заболеваемости, за 1992–2016 гг. темпы прироста – 99,7 %).

4.2. Эпидемиологический анализ уровня, структуры и динамики заболеваемости детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции

Общая заболеваемость детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции (экспозиция стронция)

По данным обращаемости за медицинской помощью, оплачиваемой в системе ОМС, в 2014 г. детей от 0 до 14 лет, проживающих на территории наблюдения, количество оплаченных случаев составило 3940,3 на 1000 детского населения, что выше уровня заболеваемости на территории сравнения – 2901,2 % (Рисунок 4.2.1). В структуре заболеваемости детского населения территории наблюдения и территории сравнения (по данным обращаемости за медицинской помощью в поликлинику, оплачиваемой в системе ОМС), приоритетные позиции занимают X. «Болезни органов дыхания» (J00–J99) (52,34 и 47,86 % соответственно). Далее в структуре заболеваемости на территории наблюдения стоят классы VI. «Болезни нервной системы» (G00–G99) (8,94 %), XVI. «Отдельные состояния, возникающие в перинатальном периоде» (P00–P96) (7,57 %), а на территории сравнения – XI. «Болезни органов пищеварения» (K00–K93) (8,83 %), VII. «Болезни глаза и его придаточного аппарата» (5,13 %).

По 13 из 18 классов болезней уровень общей заболеваемости детского населения по данным обращаемости в поликлинику в системе ОМС (на 1000 человек) на территории наблюдения превышает анализируемый показатель на территории сравнения в 1,29 – 9,41 раза (Таблица 4.2.1).

Таблица 4.2.1 – Показатели заболеваемости детского населения исследуемых территорий по данным обращаемости в поликлинику в системе ОМС (на 1000 детского населения) за 2013–2014 г.

Приоритетные классы болезней	Территория сравнения	Территория наблюдения	Кратность превышения
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–M99)	83,95	173,75	2,07
Болезни органов дыхания (J00–J99)	1518,60	1965,5	1,29
Отдельные состояния, возникающие в перинатальном периоде (P00–P96)	138,15	227,25	1,64
Болезни глаза и его придаточного аппарата (H00–H59)	90,33	191,80	2,12
Некоторые инфекционные и паразитарные болезни (A00–B99)	148,78	152,37	1,02
Болезни органов пищеварения (K00–K93)	256,11	185,50	0,72
Болезни нервной системы (G00–G99)	65,89	214,20	3,25
Болезни кожи и подкожной клетчатки (L00–L99)	65,89	65,25	0,99
Болезни мочеполовой системы (N00–N99)	64,82	71,28	1,10
Врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения (Q00–Q99)	73,33	122,00	1,66
Травмы и отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин (S00–T98)	94,58	116,82	1,24
Болезни уха и сосцевидного отростка (H60–H95)	156,22	103,77	0,66
Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях, не классифицированные в других рубриках (R00–R99)	20,19	190,04	9,41
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00–E90)	47,82	75,26	1,57
Болезни системы кровообращения (I00–I99)	28,07	46,93	1,67
Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50–D89)	17,00	30,92	1,13
Новообразования (C00–D48)	9,56	30,92	0,30
Психические расстройства и расстройства поведения (C00–D48)	31,88	2,50	0,08

Так, обращаемость в амбулаторно-поликлинические учреждения в разрезе данной возрастной категории на территории наблюдения превышала аналогичную на территории сравнения по классу XIII. «Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани» (M00–M99) – в 2,07 раза (Рисунок 4.2.2).

Общая заболеваемость детского населения по данным обращаемости в поликлинику в системе ОМС в 2014 г. (по сравнению с 2013 г.) на территории наблюдения выросла на 0,90 %, а на территории сравнения – снизилась на 9,9 %.

Так, темпы прироста заболеваемости в 2014 году на территории наблюдения демонстрируют XVIII «Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях, не классифицированные в других рубриках» (R00– R99) (11,43 %), XIII. «Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани» (M00–M99) (6,86 %), I. «Некоторые инфекционные и паразитарные болезни» (A00–B99) (9,47 %),

V «Психические расстройства и расстройства поведения» (C00–D48) (2,45 %), VII «Болезни глаза и его придаточного аппарата» (H00–H59) (9,57 %), тогда как на территории сравнения отмечается снижение заболеваемости по данным классам заболеваний (-43,33 %, -33,78 %, -54,3 %, -50,0 %, -11,42 % соответственно) (Таблица 4.2.2).

Таблица 4.2.2 – Темпы прироста или убыли заболеваемости детей территория наблюдения и территория сравнения по данным обращаемости в поликлинику в системе ОМС в 2014 г. по сравнению с 2013 г. (%)

Класс болезней	Территория наблюдения	Территория сравнения
Болезни органов дыхания (J00–J99)	-1,54	-7,45
Болезни нервной системы (G00–G99)	1,98	-11,43
Отдельные состояния, возникающие в перинатальном периоде (P00–P96)	5,61	-4,49
Болезни кожи и подкожной клетчатки (L00–L99)	24,16	31,69
Травмы и отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин (S00–T98)	-18,64	12,90
Болезни глаза и его придаточного аппарата (H00–H59)	9,57	-11,24
Болезни уха и сосцевидного отростка (H60–H95)	-9,32	-62,00
Врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения (Q00–Q99)	18,16	5,95
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–M99)	6,86	-33,78
Некоторые инфекционные и паразитарные болезни (A00–B99)	9,47	-54,30
Болезни мочеполовой системы (N00–N99)	-0,13	-17,57
Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях, не классифицированные в других рубриках (R00–R99)	11,43	-43,33
Психические расстройства и расстройства поведения (C00–D48)	2,45	-50,00

Примечание: «-» – темп убыли заболеваемости

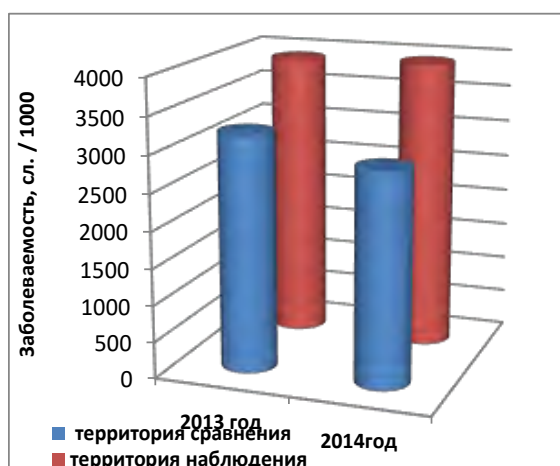


Рисунок 4.2.1 – Динамика обращаемости за медицинской помощью в поликлинику в системе ОМС детского населения, проживающего на изучаемых территориях, 2013-2014 гг.

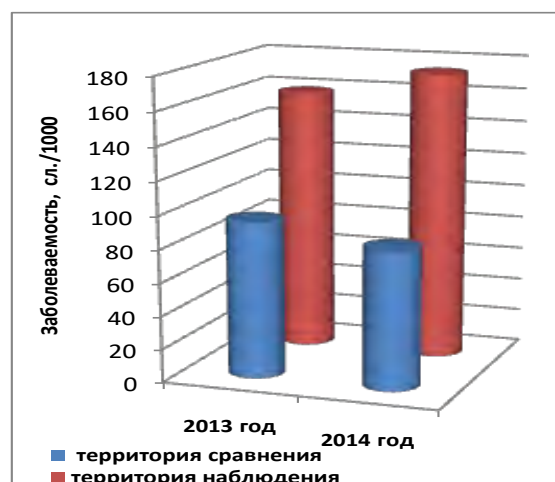


Рисунок 4.2.2 – Распространенность болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани у детей, проживающих на изучаемых территориях, по данным обращаемости в поликлинику в системе ОМС, 2013-2014 гг.

Установлено, что у детей, потребляющих ненормированную питьевую воду по содержанию стронция, статистически значимо ($p = 0,001$) в 2 – 5 раз чаще регистрируются следующие заболевания опорно-мышечной системы: приобретённые деформации костно-мышечной системы неуточнённые (M95.9) ($p = 0,001$), вальгусная деформация, не классифицированная в других рубриках (M21.0) ($p = 0,004$), болезнь сустава неуточнённая (M25.9) ($p = 0,001$), плоская стопа [*pes planus*] (приобретенная) (M21.4) ($p = 0,001$) относительно детей, потребляющих питьевую воду, соответствующую гигиеническим нормативам.

Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с развитием заболеваний у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани ($OR = 3,08$; 95% ДИ = 2,09-4,085; $p < 0,05$) (Таблица 4.2.3).

Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки у детей, проживающих на территории наблюдения, и вальгусной деформации, не классифицированной в других рубриках ($OR = 2,36$; 95% ДИ = 1,04-5,34; $p < 0,05$). Популяционный риск возникновения болезней костно-мышечной системы и

соединительной ткани у детей может составить 728 дополнительных случаев, из них 91 с диагнозом вальгусной деформации, не классифицированной в других рубриках.

Таблица 4.2.3 – Показатели причинно-следственной связи заболеваний костно-мышечной системы, патогенетически связанной с иммунной системой, у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции

Класс болезни / рубрика	Группа	Ответ на воздействие		OR [95% ДИ]	RR
		есть	нет		
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани	Дети, проживающие на территории наблюдения	1210	9593	3,08 [2,09-4,09]	2,75
	Дети, проживающие на территории сравнения	37	904		
Вальгусная деформация, не классифицированная в других рубриках	Дети, проживающие на территории наблюдения	161	10642	2,36 [1,04-5,34]	2,32
	Дети, проживающие на территории сравнения	6	935		

Примечание: здесь и в других таблицах OR – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; RR – относительный риск

Исследования продемонстрировали, что реализация иммунного ответа происходит с участием клеток костномозгового происхождения [112]. Основной функцией врожденного иммунитета и костной ткани является поддержание целостности тканей [156]. Сигналы, генерируемые клетками врожденной иммунной системы, имеют решающее значение для удаления поврежденных и апоптотических клеток, а также стимулирования регенеративных процессов. Цитокины и сигналы от различных клеток иммунной системы оказывают значительное влияние на дифференцировку и функциональную активность остеокластов за счет прямого влияния на предшественников остеокластов и опосредованных эффектов на остеобласты и другие клетки микросреды, окружающие костную ткань, включая стромальные клетки, остециты и хондроциты. Установлено, что остеокласты способны экспрессировать ряд иммунных рецепторов, и их активность регулируется аналогично макрофагам и дендритным клеткам [422]. Процессы постоянного обновления костной ткани, осуществляющегося в организме, происходят путём сопряженного по времени

костеобразования и рассасывания (резорбция) кости. Апоптозу в данном процессе отводится одна из ключевых ролей, а клетки костной ткани активно участвуют в данном процессе [268].

Распределение поглощенного стронция в организме человека аналогично распределению кальция. Примерно 99 % стронция, поступившего в организм, распределяется в костной ткани. Предполагают схожие механизмы поглощения кальция и стронция в организме, а также участие одних и тех же факторов в данных процессах (факторы, влияющие на ремоделирование костной ткани: кальбиндин-D, паратиреоидный гормон, Ca^{2+} -зависимая АТФаза, инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I), кальмодулин, переносчик кальция через кишечную стенку) [401]. Доказано влияние стронция на образование биологически активных веществ. В частности, стронций может стимулировать высвобождение гистамина, одного из главных факторов развития аллергических реакций, медиатора нервной системы, а также стимулятора паратиреоидного гормона. Стронций способен вызывать высвобождение нейромедиаторов из пресинаптических мембран, как и кальций, но менее эффективно, из-за различий активации процесса экзоцитоза. Предполагается, что оба катиона действуют, путем связывания с синаптотагмином 1. Однако в отличие от Ca^{2+} , который связывается с двумя цитозольными доменами синаптотагмина, Sr^{2+} связывается только с одним из них [402]. Показано, что стронций оказывает прямое или опосредованное влияние на эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развитие, дифференцировку, летальную программу клеток костной системы организма [268, 401, 422]. Очевидно, в условиях избыточного поступления стронция в организм происходит изменение темпа костного обмена или разобщенности (дисбаланса) его составляющих – костной резорбции и костеобразования, что способствует формированию заболеваний костной системы, патогенетически связанной с иммунной системой.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, значительную долю среди причин обращаемости за медицинской помощью составляют

заболевания XIII. «Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани» (M00–99), иммунопатологические механизмы, при которых имеют доминирующее значение.

4.3. Оценка риска формирования у детей заболеваний костно-мышечной системы, ассоциированных с иммунной системой

Приоритетными для оценки риска для здоровья населения по результатам идентификации являются вещества: железо, кадмий, марганец, никель, свинец, хром, мышьяк, стронций, хлороформ, тетрахлорметан, дибромхлорметан, дихлорбромметан, 1,2-дихлорэтан, фториды (неорганические, хорошо растворимые) при пероральном поступлении с водой (Таблицы 4.3.1, 4.3.2).

Таблица 4.3.1 – Коэффициенты опасности (HQ) для веществ, поступающих с питьевой водой на территории наблюдения

Вещество	Точка отбора № 1	Точка отбора № 2
Железо	0,01	0,03
Кадмий	0,001	0,001
Марганец	0,0014	0,005
Никель	0,0032	0,0042
Свинец	0,034	0,045
Хром	2,9E-05	3,6E-05
Мышьяк	0,005	0,005
Стронций	0,76	0,685
Хлороформ	0,1	0,06
Тетрахлорметан	0,002	0,002
1,2-Дихлорэтан	0,004	0,004
Дихлорбромметан	-	-
Дибромхлорметан	0,015	0,015
Фториды (неорганические хорошо растворимые)	1,42	1,068

В результате идентификации опасности установлено, что потенциальное влияние компонентов может обуславливать развитие нарушений здоровья со стороны костной системы, кожи, центральной нервной системы, сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, гормональной систем, печени, почек, крови, а также желудочно-кишечного тракта.

Оценка хронического неканцерогенного риска здоровью детского населения, проживающего в условиях стронциевой геохимической провинции при воздействии химических веществ, загрязняющих питьевую воду, не выявила превышений приемлемых значений коэффициентов опасности ($HQ = 1,0$) в отношении анализируемых компонентов. Коэффициент опасности для стронция составил до 0,76 (Таблица 4.3.2).

Таблица 4.3.2 – Вклад веществ (%) в величину индекса опасности (HI)

Органы и системы	Вещества	Точка отбора № 1	Точка отбора № 2
1	2	3	4
Костная	HI	2,18	1,75
	Стронций	34,8	61
	Фториды	65,2	39
Кожа	HI	0,015	0,035
	Железо	66,6	85,7
	Мышьяк	33,4	14,3
Нервная	HI	0,039	0,05
	Свинец	87	90
	Мышьяк	13	10
ЦНС	HI	0,14	0,12
	Марганец	1	6,25
	Свинец	24,3	37,5%
	Мышьяк	3,57	6,25
	Хлороформ	71,13	50
Гормональная	HI	0,14	0,11
	Кадмий	0,71	0,90%
	Свинец	24,2	40,9%
	Мышьяк	3,57	4,54
	Хлороформ	71,52	53,66
Сердечно-сосудистая	HI	0,008	0,009
	Никель	40	46,6
	Мышьяк	60	53,4
Иммунная	HI	0,015	0,035
	Железо	66,6	85,7%
	Мышьяк	33,4	14,3
Печень	HI	0,12	0,08
	Хлороформ	83,3	75
	Тетрахлорметан	1,6	2,5
	Дибромхлорметан	15,1	22,5
Почки	HI	0,103	0,063
	Кадмий	0,97	1,6
	Хлороформ	97	95,2
	Тетрахлорметан	2,03	3,2
Желудочно-кишечный тракт	HI	0,008	0,009
	Никель	40	46,6
	Мышьяк	60	53,4

Окончание Таблицы 4.3.2.

1	2	3	4
Кровь	<i>HI</i>	<i>0,15</i>	<i>0,14</i>
	Железо	6,6	21,4
	Марганец	0,93	3,57
	Свинец	22,6	32,14
	Хлороформ	69,87	42,89

При совместном действии веществ имеется вероятность развития заболеваний выше допустимых значений ($HI > 1$) только со стороны костной системы: *HI* до 2,18.

В ходе данного исследования определяли вклад стронция (остеотропа) в величину опасности (*HI*) развития неканцерогенных эффектов со стороны костной системы при пероральном воздействии всего комплекса загрязнений воды централизованного водоснабжения. Оценка риска для здоровья детского населения, проживающего на территории стронциевой геохимической провинции, показала, что вклад стронция в величину *HI* развития патологии костно-мышечной системы при пероральном воздействии достигает более 60 % (до 61 %).

Таким образом, результаты оценки риска здоровью детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, показали, что уровень риска превышает приемлемый (*HI* до 2,18). Вклад стронция в формирование высоких уровней риска составил до 61 % (костная система).

4.4. Эпидемиологический анализ уровня, структуры и динамики заболеваемости детей, проживающих на территории, где используется гиперхлорированная питьевая вода

Наличие рисков для здоровья детского населения, потребляющего гиперхлорированную воду, подтверждается медицинской статистикой и специальными исследованиями (Таблица 4.4.1).

Таблица 4.4.1 – Зарегистрированная и прогнозируемая общая заболеваемость по всем классам болезней детского населения территории, где используется гиперхлорированная вода (экспозиция хлороформа), сл. / 1000 чел.

Год	Заболеваемость фактическая	Заболеваемость прогнозная
1	2	3
1992	1532,55	1974,57
1993	1913,67	1999,71
1994	1722,13	2025,17
1995	1794,05	2050,96
1996	1837,97	2077,08
1997	1827,85	2103,53
1998	1874,68	2130,31
1999	2253,79	2157,44
2000	2413,69	2184,91
2001	2467,91	2212,73
2002	2737,04	2240,91
2003	2858,22	2269,44
2004	2826,55	2298,34
2005	2806,22	2327,61
2006	3005,17	2357,25
2007	3107,46	2387,26
2008	2641,85	2417,66
2009	3082,74	2448,45
2010	2791,03	2479,62
2011	2968,95	2511,20
2012	2682,96	2543,17
2013	2725,38	2575,56
2014	764,63	2608,35
2015	2564,38	2641,57
2016	2537,02	2675,20
2017	2696,87	2709,27
2018	-	2743,77
2019	-	2778,71

Обнаружено, что распространенность заболеваний органов пищеварения у детей, проживающих на территории, где производится гиперхлорирование водопроводной воды, за последние десять лет выросла более чем на 10 % и регистрируется на неизменно высоком уровне.

Общая заболеваемость детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием галогенорганических соединений

По результатам эпидемиологических исследований заболеваемости детского населения, потребляющего питьевую воду, содержащую

галогенорганические соединения, по деперсонифицированным данным обращаемости за медицинской помощью, представленные в системе фонда обязательного медицинского страхования по отношению к населению территории сравнения, где используется качественная питьевая вода по химическому составу, установлены значимые различия.

Выявлено, что обращаемость детей (3–7 лет), потребляющих некачественную питьевую воду, по причине заболеваний «Болезни желчного пузыря, желчевыводящих путей и поджелудочной железы» (K80–87) в 4,64 раза выше, чем на территории, где используется качественная питьевая вода (класс XI. «Болезни органов пищеварения» (K00–K93)). Установлено, что обращаемость детей территории наблюдения в 2010 г. по поводу болезней крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм (D50–D89), в 4 раза выше, чем на территории сравнения, заболеваний вегетативной нервной системы (G90) – в 7 раз, болезней конъюнктивы (H10–H13) – в 8,5 раза. Расчет отношения шансов показывает связь гаптенной нагрузки с развитием заболеваний у детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформа, болезней органа зрения и его придаточного аппарата ($OR = 7,45$; 95% ДИ = 3,17–17,47; $p < 0,05$), болезней крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм ($OR = 3,78$; 95% ДИ = 1,69–8,45; $p < 0,05$), болезней нервной системы ($OR = 1,52$; 95% ДИ = 1,03–2,25; $p < 0,05$), врожденные аномалии (пороки развития), деформации и хромосомные нарушения) ($OR = 3,97$; 95 ДИ% = 1,93–8,16; $p < 0,05$). Расчет отношения шансов показал связь гаптенной нагрузки с нарушением целостности гепатоцитов у детей, потребляющих гиперхлорированную воду ($OR = 13,5$; 95% ДИ = 7,48–24,41; $p < 0,05$). Цитолиз гепатоцитов доказывает изменение паренхимы печени, что характерно для ряда заболеваний гепатобилиарного тракта.

Оценка состояния здоровья детей на основании анализа данных персонального развития ребенка выявила, что у 35,6 % обследованных детей территории наблюдения функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта являются основными видами патологии. Очевидно, у детей, проживающих

в условиях воздействия хлороформа, частота возникновения нарушений здоровья по ряду заболеваний гепатобилиарного тракта, при которых иммунопатологические механизмы имеют доминирующие значения, выше, чем на территории сравнения. Между тем установлено, что патологические процессы в печени могут спровоцировать нарушение функций всего организма, что обуславливает необходимость поиска эффективных методов профилактики и раннего выявления нарушений гепатобилиарной системы, патогенетически связанной с иммунной системой. Взаимосвязь между гепатобилиарной системой и иммунной системой достаточно сложная. Печень – это составная часть пищеварительной системы, которая обладает огромной ролью в метаболических процессах организма, а также в неспецифических и специфических реакциях иммунной системы. Печень относится к иммунорегуляторному органу организма [211]. Установлена прочная ассоциация гепатоцитов с достаточно большим количеством биологически активных молекул, участвующих в различных процессах организма, в том числе процессах воспаления и иммунитета. Доказано участие печени в реакциях иммунологического надзора [406]. При попадании ксенобиотиков в организм (например, галогенорганических соединений с питьевой водой) из просвета кишечника или других органов в системный кровоток печень выполняет главную роль в регулировании уровня антигенов. В печени локализовано большое количество полиморфноядерных лейкоцитов, Т- и В-лимфоцитов. Около 30 % общего количества крови проходит через печень каждую минуту, перенося около 108 лимфоцитов крови за 24 часа. В норме в печени находится 1-2 % лимфоцитов, которые экспрессируют CD8⁺-антиген. В печени CD8⁺-клетки преобладают над количеством клеток, экспрессирующих CD4⁺-маркер. В печени организация и регуляция воспалительного процесса контролируется клетками иммунной системы: эндотелиальными клетками синусоидов, звездчатыми клетками Ито и клетками Купфера.

Очевидно, поступление в организм хлороформа с питьевой водой способствует развитию целого ряда негативных эффектов со стороны гепатобилиарного тракта, патогенетически связанного с иммунной системой. У

детей, потребляющих некачественную питьевую воду по содержанию галогенорганических соединений, заболевания гепатобилиарной системы диагностируются практически в 5 раз чаще, чем у детей, проживающих на территории, где используется качественная питьевая вода.

4.5. Оценка риска формирования у детей заболеваний гепатобилиарного тракта, ассоциированных с иммунной системой

При длительном поступлении галогенорганических соединений с питьевой водой в организм человека существует потенциальная вероятность повреждения жизненно важных органов и систем или развитие вредных эффектов (Таблица 4.5.1) [57, 61, 77, 400].

Таблица 4.5.1 – Критические органы / системы при пероральном поступлении галогенорганических соединений (мг/кг)

Вещество	CAS	RfD	Источник	Критические органы / системы	RfDR
Хлороформ	67-66-3	0,01	IRIS	Печень, почки, ЦНС, гормональная система, кровь	0,003*
1,2-дихлорэтан	107-06-02	-	-	Печень, сердечно-сосудистая система	0,001*
Тетрахлорметан	56-23-5	0,0007	IRIS	Печень, поджелудочная железа	0,0003*
Хлорбромметан	74-97-5	0,013	DWR	Почки	-

Примечание: * – вещество нормировано в воде водных объектов по санитарно-токсикологическому признаку вредности.

Обнаруживаемые эффекты органов и систем при постоянном поступлении в организм с питьевой водой галогенорганических соединений: хлороформ – разрушение клеток печени и эритроцитов, снижение белоксинтезирующей активности, ингибирование нервных центров, активация свободнорадикального окисления; 1,2-дихлорэтан, дихлорбромметан, дибромхлорметан – цитолиз гепатоцитов; тетрахлорметан – активация перекисного окисления липидов, ингибирование антиоксидантных свойств, ослабление белоксинтезирующей функции, цитолиз гепатоцитов, угнетение фильтрационной возможности почек,

ингибирование реабсорбции в почечных канальцах и плазматока в почках, дисбаланс в системе свертывания крови.

На территории, где используется гиперхлорированная вода, установлен недопустимый неканцерогенный риск формирования нарушений со стороны органов и систем: ЦНС – индекс опасности до 1,33; эндокринной системы – индекс опасности до 2,25; печени – индекс опасности до 1,54; системы крови – индекс опасности до 1,8; почек – индекс опасности до 1,83. При выполненной оценке риска для здоровья детей, потребляющих гиперхлорированную воду, установлено, что при хроническом воздействии исследуемых галогенорганических соединений, превышения допустимого значения коэффициента опасности были для хлороформа: HQ до 1,28

Очевидно, на территории, где используется гиперхлорированная вода, у детей, при хроническом поступлении галогенорганических соединений с питьевой водой формируются неприемлемые неканцерогенные риски развития патологии гепатобилиарного тракта (HI до 1,54). Среди факторов, оказывающих значительное влияние на качество питьевой воды на территории наблюдения, ведущая роль по величине коэффициента опасности (HQ) принадлежит хлороформу (HQ до 1,28).

Резюме по главе 4. На основании статистического анализа уровня, структуры и динамики заболеваемости детей, проживающих в условиях санитарно-гигиенического неблагополучия среды обитания, для дальнейшего углубленного исследования выбраны приоритетные территории, характеризующиеся высоким уровнем заболеваний костно-мышечной системы и гепатобилиарного тракта, ассоциированных с иммунной системой. Неудовлетворительное качество питьевой воды по содержанию щелочно-земельных металлов (на примере стронция) и галогенорганических соединений (на примере хлороформа), формируемое целым рядом причин, своим следствием имеет доказанное ухудшение состояния здоровья детей. Установлено, что у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, значительную

долю среди причин обращаемости за медицинской помощью составляют заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани, иммунопатологические механизмы при которых имеют доминирующее значение. Полученные результаты свидетельствуют, что у детей, проживающих в условиях воздействия хлороформа, частота возникновения нарушений здоровья по ряду заболеваний гепатобилиарного тракта, в патогенезе которых лежит нарушение функции иммунной системы, выше, чем на территории сравнения.

Доказано, что у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием щелочно-земельных металлов (на примере стронция), формируется риск развития заболеваний костно-мышечной системы (HI до 2,18). Вклад стронция в величину индекса опасности развития патологии костной системы составляет от 34,8% до 61%. На территории, где используется гиперхлорированная вода, установлен недопустимый неканцерогенный риск формирования нарушений со стороны печени (HI до 1,54). Ведущее место по величине HQ среди показателей качества воды занимает хлороформ (HQ до 1,28).

Установлено, что уровень заболеваемости здоровья детского населения, проживающего на территориях наблюдения (экспозиция стронция и хлороформа) выше, чем у неэкспонированных групп (группы сравнения). Необходимо отметить, что обследуемые дети, проживающие в условиях геохимической провинции и на территории, где используется гиперхлорированная вода, отличались от детей соответствующих групп сравнения только степенью содержания в биосредах приоритетных химических веществ.

ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ У ДЕТЕЙ С УЧЕТОМ ТЕРРИТОРИАЛЬНОЙ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

5.1. Клинические особенности иммуноассоциированных нарушений у детей, проживающих в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция), поступающих с питьевой водой

В ходе проведенного анкетирования между родителями детей группы наблюдения и группы сравнения достоверных различий по социальным показателям (образование, профессия родителей, материальные и жилищные условия семьи) не установлено.

В основную выборку включены дети, не имеющие в анамнезе органической и врожденной патологии, рожденные в срок от 1-3-й беременности, срочных родов (группа наблюдения – 48,6 %, группа сравнения – 52,1 %, $p = 0,521$). 80 % детей группы наблюдения и 56 % группы сравнения проживали в благоустроенной квартире, ($p = 0,003$). Из исследования были исключены дети, чьи родители страдали алкоголизмом или наркоманией, а также дети из асоциальных семей. В подавляющем большинстве случаев (95 % в наблюдения группы и 77,6 % в группе сравнения, $p=0,242$) семьи использовали для питья водопроводную воду без предварительной очистки. Установлено, что родители в группе наблюдения статистически значимо чаще отмечали наличие у детей болей в суставах и костях (12,9 против 3,45 % группы сравнения, $p = 0,01$), а также симптом диспепсического характера в виде нарушения аппетита (91,4 и 61 % соответственно, $p=0,043$), отрыжки (45,5 против 25,4 %, $p = 0,033$), болей в животе (58,6 против 37,2 %, $p = 0,030$).

Установлено, что среди детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, патология опорно-двигательного аппарата встречались в 6 раз чаще, чем в группе сравнения (62,8 и 11,8 % соответственно, $p = 0,001$) (Таблица 5.1.1).

Таблица 5.1.1 – Структура заболеваемости у обследованных детей (экспозиция стронция)

Класс болезней	Нозологическая единица	Группа сравнения ($n = 238$)	Группа наблюдения ($n = 266$)
		Абс., (%)	Абс., (%)
1	2	3	4
Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50–D89)	Общий переменный иммунодефицит неутонченный (D83.9)	8 (3,4 %)	20 (7,7%) $p=0,030$
Болезни системы кровообращения (I00–I99)	Малые аномалии развития сердца (МАРС) (Q24.8)	11 (4,6 %)	-
Болезни нервной системы (G00–G99)	Невротические реакции, связанные со стрессом слабо выраженные (F43)	96 (40,3 %)	15 (5,6 %) $p = 0,030$
Болезни органов дыхания (J00–J99)	Вазомоторный и аллергический ринит (J30): аллергический ринит легкое течение (J30.1)	28 (11,8 %)	62 (22,4%) $p = 0,040$
Болезни кожи и подкожной клетчатки (L00–L99)	Крапивница локализованная (L50)	10 (4,2 %)	-
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–M99)		Всего 28 (11,8 %)	Всего 167 (62,8%) $p = 0,001$
	Уплотнение стоп	12 (5,1 %)	37(13,9 %)
	Нарушение осанки	16 (6,7 %)	130 (48,9 %)
Симптомы, признаки и отклонения от нормы, не классифицированные в других рубриках (R00–R99)		12 (5 %)	-
Болезни органов пищеварения (K00–K93)	Функциональные кишечные нарушения (K59)	20 (8,4 %)	2 (1,5 %) $p = 0,051$
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00–E90)	Избыток массы тела, низкий рост (E34.3)	25 (10,5 %)	-
Итого		238 (100 %)	266 (100 %)

Общий переменный иммунодефицит неуточненный (D83.9) и заболевания респираторного тракта достоверно в среднем в 2,2 раза чаще регистрировались у детей группы наблюдения по сравнению с детьми группы сравнения (7,7 и 3,4 % соответственно, $p = 0,030$; 22,4 и 11,8 % соответственно, $p = 0,043$).

Расчет отношения шансов показал связь гаптенной нагрузки с развитием у детей группы наблюдения болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–99) ($OR = 12,65$; 95% ДИ = 7,94-20,17; $p < 0,05$) (Таблица 5.1.2). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с развитием заболеваний у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, уплощенной стопы и нарушения осанки ($OR = 3,04$; 95% ДИ = 1,55-5,99; $p < 0,05$) и ($OR = 13,26$; 95% ДИ = 7,57-23,25; $p < 0,05$).

Таблица 5.1.2 – Показатели причинно-следственной связи возникновения заболеваний костно-мышечной системы у детей, проживающих на территории экспозиции стронция, с фактором риска (стронций в крови)

Показатель	RR [95% ДИ]	OR [95% ДИ]
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–M99) $p < 0,05$	5,34 [3,72-7,65]	12,65 [7,94-20,17]
Уплощение стоп $p < 0,05$	2,76 [1,47-5,17]	3,04 [1,55-5,99]
Нарушение осанки $p < 0,05$	7,27 [4,46-11,85]	13,26 [7,56- 23,25]

Примечание: здесь и в других таблицах главы 5, 8 – $p < 0,05$ между группой сравнения и группой наблюдения.

Установлена и параметризована вероятностная причинно-следственная связь развития группы болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–99) с повышенным содержанием в крови стронция ($b_0 = -2,69$; $b_1 = 5,52$; $R^2 = 0,2$; $F = 9,0$; $p = 0,001$); достоверно возрастает вероятность развития плоской стопы [*pesr planus*] (приобретенная) (M21.4) ($b_0 = -3,60$; $b_1 = 0,03$; $R^2 = 0,68$; $F = 64,9$; $p = 0,001$) (Таблица 5.1.3).

Выполненное рентгенологическое исследование кистей для установления костного возраста детей группы наблюдения и группы сравнения показало, что в группе наблюдения несоответствие костного возраста паспортному регистрировалось в 1,25 раза чаще, чем в группе сравнения (54 и 43 %

соответственно, $p = 0,520$). Отклонение в биологическом развитии проявлялось ускоренным созреванием костей и в группе наблюдения выявлялось в 3,9 раза чаще, чем в группе сравнения (27 и 7 % соответственно, $p = 0,138$) (Таблица 5.1.4).

Таблица 5.1.3 – Параметры моделей зависимости «стронций в крови – показатель ответа» у детей группы наблюдения

Параметры моделей	b_0	b_1	R^2	F	p
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00-M99)	-2,689	5,515	0,127	8,597	0,001
Плоская стопа [per planus] (приобретенная) (M21.4)	-3,664	0,031	0,684	64,924	0,001

Примечание: здесь и в других таблицах b_0 , b_1 – параметры модели; R^2 – коэффициент детерминации; F – критерий Фишера; $p < 0,05$ между группой сравнения и группой наблюдения.

Таблица 5.1.4 – Сравнительная характеристика соответствия костного возраста паспортному у обследуемых детей

Характеристика костного возраста	Группа сравнения ($n = 238$)		Группа наблюдения ($n = 266$)		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Соответствие паспортному	138	57,9	120	45,5	0,512
Несоответствие паспортному:	100	42,1	146	54,5	0,512
из них					
- отставание костного возраста	88	36,9	66	25,0	0,517
- опережение костного возраста	12	5,1	80	30,0	0,138

Отношения шансов показало связь гаптенной нагрузки с несоответствием костного возраста паспортному у детей группы наблюдения ($OR = 1,6$; 95% ДИ = 0,41-6,18; $p = 0,731$).

Анализ коэффициента оссификации (рентгенологический возраст / паспортный) выявил уменьшение доли детей с нормальными значениями этого показателя в группе наблюдения при сопоставлении с группой сравнения ($p = 0,311$). Значение коэффициента оссификации более 1, в группе наблюдения встречалось в 3,2 раза чаще, чем в группе сравнения (22,73 и 7,14 % соответственно, $p = 0,221$) (Таблица 5.1.5).

Таблица 5.1.5 – Сравнительная характеристика значений коэффициента оссификации у обследуемых детей

Коэффициент оссификации	Группа сравнения (n = 238)		Группа наблюдения (n = 266)		p
	Абс.	%	Абс.	%	
< 0,8 (отставание биологического возраста)	63	26,4	59	22,1	0,927
> 1,2 (опережение паспортного возраста)	5	2,2	62	23,3	0,221
1,0 ± 0,2 (соответствие паспортному возрасту)	170	71,4	145	54,6	0,311

Отклонение в биологическом развитии костей в группе наблюдения регистрировалось в 1,2 раза чаще относительно аналогичных значений, полученных в группе сравнения, при этом преобладало опережение биологического развития над отставанием у каждого четвертого ребенка, проживающего в условиях экспозиции.

Таким образом, у детей группы наблюдения (экспозиция стронция) в 6 раз чаще, чем у детей группы сравнения, встречаются нарушения со стороны костно-мышечной системы, патогенетически связанной с иммунной системой ($p > 0,05$). Функциональные расстройства, при которых нарушается регуляция определенных функций органов и систем, в дальнейшем могут способствовать формированию достаточно серьезных хронических заболеваний (заболевания костно-мышечной системы).

5.2. Иммунологические, биохимические индикаторные показатели у детей, проживающих в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция)

Представлены результаты изучения апоптотической регуляции в условиях повышенной экспозиции стронция (Таблицы 5.2.1 – 5.2.5, Рисунки 5.2.1. – 5.2.3.).

Результат оценки иммунного статуса показал (Таблица 5.2.1), что у детей с повышенным содержанием стронция в крови статистически значимо ($p = 0,042-0,001$) в 1,2 раза снижено количество CD3⁺-лимфоцитов (по абсолютной

величине), в 1,2 раза – относительное количество CD8⁺-лимфоцитов и в 1,4 раза абсолютное число CD8⁺-лимфоцитов по сравнению с результатами, полученными у детей группы сравнения.

Таблица 5.2.1 – Индикаторные показатели иммунной системы у детей, проживающих в зоне средового воздействия стронция

Показатель	ФН	Группа сравнения (n = 200)			Группа наблюдения (n = 250)			p
		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		
			выше	ниже		выше	ниже	
CD3 ⁺ , %	55-84	69,8 ± 3,51 [66,4-73,2]	0	0	69,0 ± 2,39 [66,7-71,3]	0	0	0,693
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,69- 2,54	2,2 ± 0,32 [1,9-2,5]	10	0	1,8 ± 0,22 [1,6-2,0]	6,7	0	0,042
CD4 ⁺ , %	31-60	33,9 ± 3,59 [30,4-37,3]	0	23,3	33,9 ± 3,13 [30,9-36,9]	0	20	0,973
CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,41- 1,59	1,1 ± 0,24 [0,9-1,3]	3,3	0	0,9 ± 0,13 [0,8-1,0]	0	0	0,133
CD8 ⁺ , %	13-41	29,5 ± 3,14 [26,5-32,5]	0	0	24,7 ± 1,95 [22,8-26,6]	0	0	0,013
CD8 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,19- 1,14	0,9 ± 0,13 [0,8-1,06]	8	0	0,6 ± 0,09 [0,6-0,7]	0	0	0,001
CD19 ⁺ , %	6-25	14,1 ± 2,41 [11,8-16,4]	6,7	0	15,4 ± 2,01 [13,5-17,3]	0	0	0,377
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,09- 0,66	0,5 ± 0,08 [0,4-0,5]	0	0	0,4 ± 0,04 [0,3-0,7]	0	0	0,424
NKT, %	5-27	9,6 ± 2,37 [7,3-11,9]	0	6,7	9,9 ± 1,69 [8,3-11,5]	0	0	0,848
NKT, 10 ⁹ /дм ³	0,09- 0,59	0,3 ± 0,08 [0,2-0,4]	6,7	0	0,3 ± 0,01 [0,2-0,3]	0	0	0,433

Динамика изменения количества CD3⁺, CD8⁺-клеток может являться критерием контроля иммунологической адаптивности организма к антигенной нагрузке. С одной стороны низкая экспрессия CD3 – общего популяционного маркера Т-лимфоцитов, является отражением дефекта Т-клеточного звена иммунитета [112]. С другой стороны, дефицит экспрессии CD3⁺-антигена на лимфоцитах следует расценивать как мобилизацию иммунной системы человека. В результате снижения экспрессии CD3⁺-маркера ослабляются процессы

регистрации и редукцию антигенного сигнала с мембраны в клетку и способность Т-лимфоцита отвечать на апоптогенный стимул. В CD8⁺-клетках экспрессируются факторы цитолитического комплекса – перфорин, гранзимы, молекулы адгезии, FAS-лиганд и другие индукторы рецепторного апоптоза. Есть экспериментальные данные, доказывающие, что в некоторых культурах клеток дефицит CD8⁺-клеток изменяет экспрессию FASL [342], тем самым изменяя реализацию FAS-опосредованного апоптоза.

Полученные результаты свидетельствуют, что повышенное содержание стронция в крови может приводить к изменениям в субпопуляционном составе лимфоцитов (индикаторные показатели: снижение количества CD3⁺-лимфоцитов, CD8⁺-лимфоцитов).

Исследование антиоксидантного статуса показало, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,001$) в 1,7 раза повышен уровень гидроперекиси липидов (LPO) в сыворотке крови, а уровень MDA в плазме крови – в 1,4 раза относительно аналогичных показателей у детей группы сравнения (Таблица 5.2.2). У 47 % детей из группы наблюдения зарегистрировано превышение уровня гидроперекиси липидов в сыворотке крови (первичный нестабильный продукт POL) по сравнению физиологической нормой, а в группе сравнения – только у 16 % детей (кратность превышения составила 3 раза). Количество проб с повышенным уровнем MDA в плазме крови (вторичный, относительно стабильный продукт POL) относительно физиологической нормы у детей, проживающих в условиях экспозиции стронцием, составило 74 % против 23 % у детей, проживающих на «чистой» территории (кратность превышения составила 3,2 раза). Необходимо отметить, что между показателями POL и показателями иммунного статуса и костного метаболизма существует зависимость, подтверждающая, что функциональная активность иммунной системы и костной системы зависит от про- и антиоксидантного равновесия [390].

В физиологических условиях POL в клетке поддерживается на постоянном уровне вследствие функционирования в организме многоуровневой системы антиоксидантной защиты. Регламентированное взаимодействие

неферментативного звена и ферментативного звена антиоксидантной системы контролирует уровень ROS в организме. Установлено, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,001-0,018$) в среднем в 1,3 раза снижена активность GST, GPx, SOD по сравнению с результатами, полученными у детей группы сравнения. У детей, потребляющих некачественную воду по содержанию стронция, активность GST, GPx и SOD понижена в 41, 56 и 63 % случаев соответственно против 8, 13 и 32 % случаев у детей, потребляющих качественную питьевую воду (кратность снижения составила 5,0 раз, 4,3 раза и 2,0 раза соответственно).

Таблица 5.2.2 – Индикаторные показатели окислительно-восстановительных процессов у детей, проживающих на территории экспозиции стронция

Показатель	ФН	Группа сравнения (n=200)			Группа наблюдения (n=250)			p
		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		
			выше	ниже		выше	ниже	
Окислительные процессы								
LPO, мкмоль/дм ³	0-350	215,2±37,7 [141,3-289,2]	16	0	354,5±24,9 [296,8-412,2]	46,9	0	0,001
MDA, мкмоль/дм ³	1,8-2,5	2,3±0,08 [2,2-2,5]	22,7	3	3,2±0,16 [2,9-3,6]	74	0	0,001
Антиоксидантные процессы								
GST, нг/см ³	110-290	176,4±28,02 [121,5-231,3]	4	8	120,5 ± 14,70 [91,7-149,4]	0	40,6	0,001
GPx, нг/см ³	0-100	35,6 ± 5,96 [27,5-43,7]	0	12,5	29,8 ± 5,42 [24,6-35,0]	3,8	55,8	0,018
SOD, нг/см ³	45,9-98,3	54,1 ± 6,33 [41,7-66,5]	0	32	40,6±3,51 [33,7-47,5]	0	62,5	0,001
Интегральный показатель состояния антиоксидантной активности								
АОА, %	36,2-38,6	31,9 ± 1,7 [29,6-34,2]	17,8	76,7	34,35±1,75 [30,8-37,8]	24,2	60,6	0,067

Результатами исследования подтверждается снижение антиоксидантного статуса митохондрий (снижение активности GST, GPx и SOD). В настоящее время митохондрии можно рассматривать как антиоксидант [39].

АОА – это интегральный показатель, отражающий способность крови противодействовать развитию свободнорадикальных реакций. Предполагают, что АОА принадлежит ключевая роль в транспорте и распределении антиоксидантов по организму. Антиоксидантная активность плазмы у детей группы наблюдения и группы контроля не имела статистически значимых различий.

В целом при повышенном содержании стронция в организме отмечается активация перекисного окисления липидов (индикаторные показатели: LPO, MDA) и снижение активности ферментативного звена антиоксидантной системы (индикаторные показатели: GST, GPx и SOD). Дисбаланс, возникающий между изменением уровня накопления продуктов POЛ и активностью антиоксидантных ферментов, может являться проявлением оксидативного повреждения митохондрий в условиях избыточного поступления в организм стронция.

Доказанная взаимосвязь между иммунной системой и костной системой подчеркивает роль иммунных факторов в модуляции процесса костного ремоделирования [263]. Идентификация ионизированного кальция является информативным показателем при изучении метаболизма костной ткани (Таблица 5.2.3). Как показало проведенное исследование, доля проб с повышенным уровнем ионизированного кальция относительно ФН в группе наблюдения составила 48 %, что в 1,5 раза больше по сравнению с показателем в группе сравнения (32 %). Установлено, что у детей, проживающих на территории наблюдения экспрессия, RANKL статистически значимо ($p = 0,026$) в 1,8 раза превышает аналогичный показатель у детей, проживающих на территории сравнения, а уровень OPG регистрируется в диапазоне контрольных значений ($p > 0,05$). Количество проб с превышением содержания RANKL по отношению к физиологической норме у детей группы наблюдения составило 80 %, таким образом, почти в 3 раза превышая анализируемый показатель в контроле (32 %). Количество проб с уменьшением уровня OPG относительно ФН у детей группы

Таблица 5.2.3 – Индикаторные показатели метаболизма костной ткани у детей, проживающих на территории экспозиции стронция

Показатель	ФН	Группа сравнения (n=200)			Группа наблюдения (n=250)			p
		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		
			выше	ниже		выше	ниже	
Биохимические параметры крови в выявлении дефицита костной массы								
Ионизированный Са, ммоль/дм ³	1,03-1,1	1,11 ± 0,84 [1,09-1,13]	32,4	0	1,13 ± 0,90 [0,64-1,87]	48,2	1,8	0,382
Гормональная регуляция обмена кальция								
Кальцитонин, пг/см ³	40,36-195,15	21,47 ± 3,60 [14,41-28,53]	0	0	19,67 ± 2,74 [14,28-25,06]	0	0	0,429
Регуляция остеокластогенеза (маркеры кальцификации)								
Промоутер кальцификации								
AmplisRANKL, пг/см ³	5,5-11,5	5,60 ± 1,97 [5,23-12,66]	52	12	10,05 ± 5,11 [9,49-21,39]	80	0	0,026
Ингибитор кальцификации								
OPG, пг/см ³	40,5-97,5	105,99 ± 19,80 [86,98-125,00]	0	14,3	93,44 ± 40,65 [54,41-132,47]	0	20	0,549
Маркеры костного формирования								
Щелочная фосфатаза, Е/дм ³	71-645	323,47 ± 22,63 [279,09-367,83]	0	0	295,9 ± 14,38 [267,7-324,1]	0	0	0,046
N-остеокальцин, нг/мл	27,92-67,95	59,17 ± 3,15 [53,0-65,34]	5	0	53,53 ± 4,54 [44,64-60,43]	0	6,2	0,044
Костный изофермент щелочной фосфатазы, Е/дм ³	40,36-195,15	122,81 ± 13,40 [96,55-149,07]	0	0	95,87 ± 9,92 [76,41-115,33]	0	6,2	0,002
Маркеры костной резорбции								
С-концевые телопептиды, нг/см ³	0,2-2,5	1,85 ± 0,15 [1,55-2,16]	0	0	1,99 ± 0,13 [1,73-2,25]	10	0	0,155
Тартрат-резистентная кислая фосфатаза, Е/дм ³	1,12-3,5	2,65 ± 0,21 [2,23-3,07]	5	0	2,85 ± 0,25 [2,34-3,36]	18,8	0	0,233

наблюдения составило 20 %, что практически в 1,5 раза больше по сравнению с анализируемым показателем в группе сравнения (14 %). Уровень кальцийрегулирующего гормона – кальцитонина, действие которого обеспечивает поддержание необходимого уровня кальция и потребность в котором возрастает в период интенсивного роста, идентифицируется в диапазоне контрольных величин.

Из сочетания двух разнонаправленных процессов – резорбции и костеобразования формируется ремоделирование костной ткани. В физиологических условиях процессы ремоделирования, протекающие в костной ткани, должны обеспечить постоянство структуры костной ткани.

В норме эти процессы урегулированы и тесно между собой взаимосвязаны. Установлено, что у детей, потребляющих воду с повышенным содержанием стронция, статистически значимо ($p = 0,046-0,002$) в 1,1 раза снижена активность щелочной фосфатазы, костного изофермента щелочной фосфатазы – в 1,3 раза, уровень остеокальцина – в 1,1 раза относительно значений, выявленных у детей, потребляющих качественную воду по содержанию стронция. Активность костного изофермента щелочной фосфатазы характеризует активацию остеобластов, вызванную усиленным костеобразованием либо в результате чрезмерного разрушения костной ткани. Установлено, что различные средовые воздействия, вызывая окислительный стресс, подавляют костеобразование, снижая активность щелочной фосфатазы (ALP) [265; 405], тем самым создавая предпосылки к развитию острых и хронических заболеваний опорно-двигательного аппарата [390]. Остеокальцин является маркером метаболической активности остеобластов в результате нового синтеза. Полученные результаты свидетельствуют о снижении процессов костеобразования при повышенном содержании стронция в крови.

Сопоставление показателей, отражающих процессы снижения костной плотности, показало, что уровень активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы сыворотки крови и содержание С-концевых телопептидов у детей группы наблюдения не имели статистически значимых отличий от значений,

полученных у детей группы сравнения. Частота регистрации повышенной активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы у детей, проживающих в условиях экспозиции стронцием, составляла 19 % против 5 % в группе сравнения (кратность превышения 4 раза). Частота регистрации повышенного содержания С-концевых телопептидов у детей группы наблюдения составила 10 % против 0 % в группе сравнения.

В ходе настоящего исследования установлено развитие негативных эффектов, характеризующих возможное нарушение состояния костной ткани: снижения костеобразования (индикаторные показатели: остеокальцин и костный изофермент щелочной фосфатазы) и потенцирование резорбции костной ткани (индикаторные показатели: RANKL).

Первоначально наибольший интерес вызывала связь между иммунной системой и костной тканью только при патологических процессах. Однако становится ясно, что иммунокомпетентные клетки также участвуют в гомеостазе костной ткани и в физиологических условиях. В норме формирование структуры мозгового слоя тимуса происходит при активном участии специализированных клеток, экспрессирующих RANKL [329]. У мышей, с отсутствием либо В-, либо Т-клеток, имеются остеопоротические изменения в костях, указывая на то, что данные клетки иммунной системы участвуют в поддержании костного гомеостаза [183; 349]. В-клетки являются доминирующими производителями остеопротегерина в микроокружении кости *in vivo* [263]. Также есть подтверждения, что активированные В-клетки сверхэкспрессируют RANKL и способствуют резорбции кости [183]. В системе *in vitro* установлено, что В-лимфоциты ингибировали остеокластогенез за счет продукции ими TGF- β , основным эффектом которого является активирование апоптоза остеокластов [385]. Т-клетки, по-видимому, необходимы для созревания остеобластов [410]. Т-лимфоциты опосредованно, через CD40L, повышают уровень OPG, продуцируемый В-лимфоцитами [263].

Экспериментально доказано, что индукция OPG возможна CD4⁺-лимфоцитами (CD8⁺ данным эффектом не обладают) [313]. В то же время

активированные Т-лимфоциты являются продуцентами RANKL, TNF и IL17A [327; 418]. Между активированными Т-лимфоцитами и RANK на предшественниках остеокластов существует отрицательная обратная связь. В отсутствии зрелых Т-клеток и В-клеток кость приобретает повышенную жесткость и теряет эластичность. Т-клетки необходимы для синтеза и созревания (процессинга) коллагена [150]. CD8⁺-клетки могут активироваться остеокластами, что приводит к образованию CD8⁺Treg, которые могут ингибировать резорбцию кости посредством секреции IFN γ [150]. IFN γ вызывает деградацию TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей; TNF receptor-associated factor 6) и прерывает экспрессию гена *c-FOS* – транскрипционного фактора дифференцировки остеокластов [417]. Очевидно, нормальные лимфоциты (физиологический статус клеток) являются необходимым фактором для поддержания костного гомеостаза, но активированные лимфоциты приводят к потере костной ткани [183].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дисбалансе субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (снижение абсолютного числа CD3⁺-лимфоцитов и процентного содержания и абсолютного количества CD8⁺-лимфоцитов), несбалансированности важнейших составляющих костного ремоделирования – остеосинтеза и резорбции костной ткани в условиях повышенного поступления стронция в организм. У детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция, отмечается снижение остеосинтеза (снижение активности щелочной фосфатазы и костного изофермента щелочной фосфатазы, содержания остеокальцина) и превалирование процессов остеокластогенеза (повышение RANKL). Дисбаланс процессов костного ремоделирования усугубляется повышением перекисного окисления липидов (повышение LPO, MDA) при недостаточности работы ферментативного звена антиоксидантной системы (снижение активности GST, GPx, SOD). Очевидно, к индикаторным показателям в условиях экспозиции стронция можно отнести: CD3⁺-лимфоциты, CD8⁺-лимфоциты, щелочную фосфатазу, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин, RANKL, LPO, MDA, GST, GPx, SOD.

Индикаторные показатели апоптоза у детей, проживающих в зоне экспозиции стронция

Цитофлуориметрический анализ индикаторных показателей апоптоза (мембранных и внутриклеточный) показал, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,047-0,001$) в 1,4 раза снижено относительное и абсолютное число CD95⁺-клеток, в 4 раза экспрессия TNFR1, bcl-2 и в 1,2 раза – VEGF, в 2 раза – содержание белка p53, в 1,3 раза – абсолютное число Treg и в 2,1 раза количество Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток по сравнению с величинами, идентифицированными у обследуемых детей группы сравнения (Таблица 5.2.4.).

Таблица 5.2.4 – Характеристика индикаторных показателей клеточной гибели у детей, проживающих на территории экспозиции стронция

Показатель	ФН	Группа сравнения (n=200)		Группа наблюдения (n=250)		p
		Me (P ₂₅ , P ₇₅)	[95% ДИ]	Me (P ₂₅ , P ₇₅)	[95% ДИ]	
CD25 ⁺ , %	5-12	5,0 (4,00; 6,00)	[4,84-5,61]	5,13 (4,00; 6,00)	[5,00-6,33]	0,298
CD25 ⁺ , 10 ⁹ / дм ³	0,1-0,3	0,13 (0,09; 0,18)	[0,13-0,15]	0,13 (0,11; 0,17)	[0,13-0,16]	0,390
CD95 ⁺ , %	15-25	16,0 (13,50; 18,50)	[14,81- 18,61]	12,5 (11,00; 14,00)	[11,3-14,6]	0,001
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,4-0,7	0,48 (0,44; 0,55)	[0,46-0,57]	0,35* (0,27; 0,45)	[0,32-0,43]	0,001
CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	0,8-1,2	1,85 (1,54; 2,70)	[1,72-2,34]	1,80 (1,28; 2,43)	[1,72-2,20]	0,501
CD25 ⁺ CD127 ⁻ , 10 ⁹ /дм ³	0,015- 0,04	0,04 (1,51; 2,60)	[0,009- 0,048]	0,033 (0,03-0,006)	[0,03-0,05]	0,047
p53, %	1,2-1,8	0,97 (0,31; 2,07)	[0,84-2,12]	0,43* (0,21; 0,75)	[0,40-0,63]	0,001
TNFR1, %	1,0-1,5	1,07 (0,25; 2,00)	[0,98-1,590]	0,25* (0,11; 0,41)	[0,24-0,46]	0,001
bcl-2, %	1,0-1,5	0,41 (0,29; 0,58)	[0,38-0,63]	0,1* (0,07; 0,17)	[0,10-0,15]	0,001
baх, %	5-9	6,78 (5,03; 9,38)	[6,65-9,40]	8,39 (3,91; 12,21)	[5,83-12,12]	0,911
IL17, пг/см ³	0-5	1,04 (0,77; 1,38)	[1,04-1,23]	1,02 (0,90; 1,31)	[1,019-1,23]	0,374
TNFα, пг/см ³	0-6	0,84 (0,06; 1,66)	[0,67-3,25]	1,84 (1,33; 2,53)	[1,58-3,52]	0,001
VEGF, пг/см ³	10-700	301,3 (157,4; 455,0)	[261,7- 384,6]	226,1 (122,95; 306,2)	[194,6- 267,3]	0,012
AnnV- FITC ⁺ PI ⁻ , %	1,5-2,5	2,45 (1,75; 2,75)	[2,16-2,68]	1,20 (0,91; 1,75)	[1,19-1,55]	0,001
AnnV- FITC ⁺ PI ⁺ , %	7-11	6,09 (4,84; 7,08)	[5,71-6,51]	8,03 (7,30; 8,78)	[7,08-8,32]	0,001

Анализ показателей иммунограммы выявил, что у детей группы наблюдения экспрессия TNF α и количество Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток статистически значимо ($p < 0,05$) в среднем в 1,9 раза превышает изучаемые показатели, полученные у детей группы сравнения (Рис. 5.2.1, 5.2.2). Установлено, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,030$) в 1,14 раза снижено абсолютное число CD95⁺-клеток, в 4 раза – экспрессия TNFR1 ($p = 0,001$), bcl-2 – до 10 раз ($p = 0,001$), в 2,8 раза реже определяется белок p53 ($p = 0,020$) по сравнению с физиологической нормой.

Частота регистрации проб с отклонением от физиологической нормы показателей клеточной гибели у обследуемых детей представлена в Таблице 5.2.5. Индивидуальная иммунограмма ребенка, проживающего в условиях геохимической стронциевой провинции, представлена на Рисунке 5.2.3.

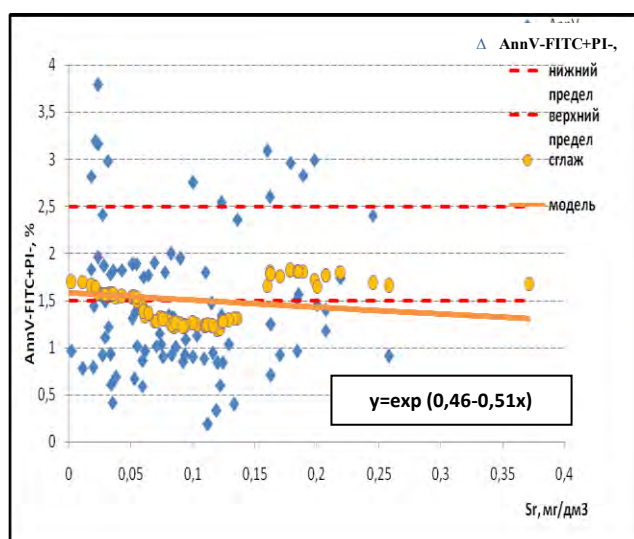


Рисунок 5.2.1 – Процентное содержание апоптотических клеток (Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток) в зависимости от концентрации Sr²⁺ в крови ($p < 0,05$)

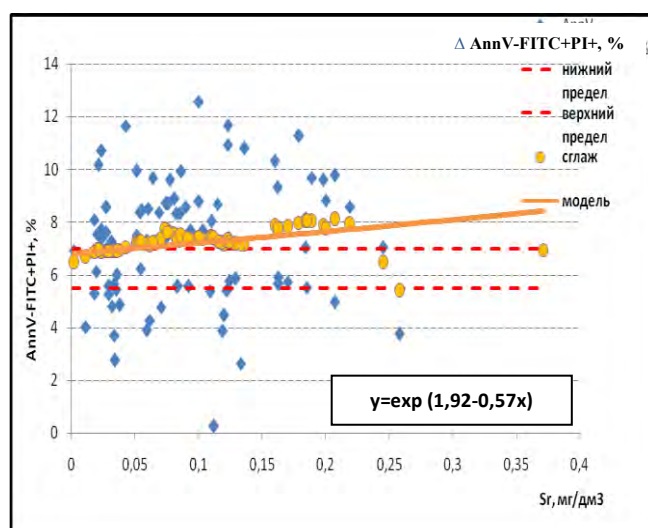


Рисунок 5.2.2 – Процентное содержание некротических клеток (Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток) в зависимости от концентрации Sr²⁺ в крови ($p < 0,05$)

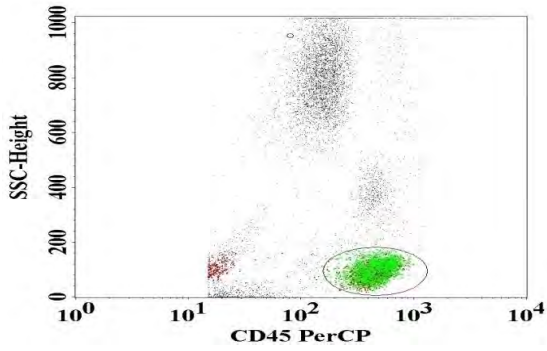
Количество проб крови с пониженным количеством CD95⁺-клеток – относительное и абсолютное число в группе сравнения, а также в группе наблюдения по сравнению с физиологической нормой составило 36,7 и 14,5 %, а также – 80 и 80 % соответственно (кратность снижения 2,2 раза и 5,5 раза

соответственно). Доля проб крови с пониженным количеством CD25⁺-клеток по относительной и абсолютной величине составила 33,3 и 13,3 % в группе сравнения против 40 % и 20 % проб (соответственно) в группе наблюдения.

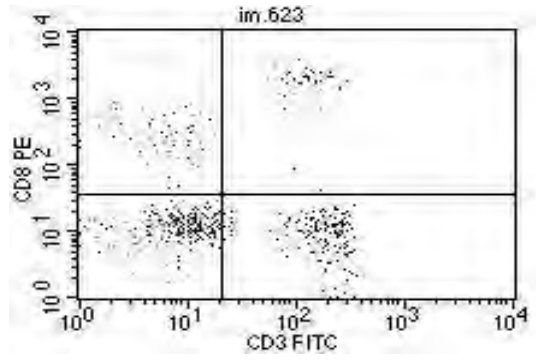
Количество проб крови с пониженным содержанием Treg у детей, проживающих в условиях экспозиции стронцием, составило 5,1 против 3,4 % у неэкспонированных детей (кратность снижения 1,5 раза). Частота регистрации превышений физиологических значений уровня TNF α в сыворотке крови детей группы сравнения составила 3,2 против 5,1 % в группе наблюдения (кратность превышений составила 1,6 раза). Установлено, что в группе наблюдения во всех анализируемых пробах уровень bcl-2, TNFR1 ниже физиологической нормы. Количество проб крови с пониженным количеством Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток составило 63,3 % и повышенным количеством Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция, – 12 % против 13,5 и 1,0 % соответственно у детей, потребляющих качественную воду.

Таблица 5.2.5 – Частота регистрации проб индикаторных показателей клеточной гибели с отклонением от физиологической нормы у детей, проживающих на территории экспозиции стронция (%)

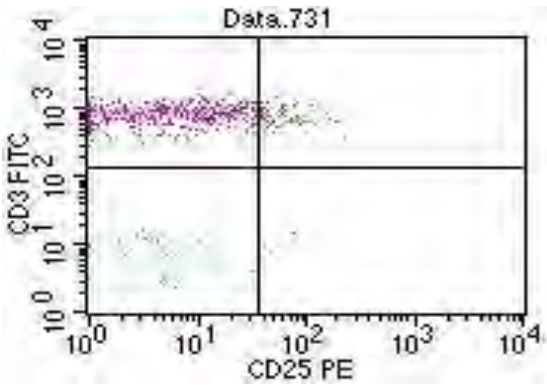
Показатель	ФН	Группа сравнения (n = 200)			Группа наблюдения (n = 250)		
		Me	Частота регистрации проб с отклонением от ФН		Me	Частота регистрации проб с отклонением от ФН	
			выше	ниже		выше	ниже
CD25 ⁺ , %	5-12	5,00	0	33,3	5,00	0	40
CD25 ⁺ , 10 ⁹ / дм ³	0,1-0,3	0,13	0	13,3	0,13	0	20
CD95 ⁺ , %	15-25	16,0	0	36,7	12,50	0	80
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,4-0,7	0,48	0	14,5	0,35	0	80
CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	0,8-1,2	1,85	37	3,4	1,80	44,5	5,1
p53, %	1,2-1,8	0,97	26,6	53,3	0,43	1,7	91,5
TNFR1, %	1-1,5	1,07	40	36	0,25	0	100
bcl-2, %	1-1,5	0,41	0	50	0,10	0	100
IL17, пг/см ³	0-5	1,02	0	0	1,02	0	0
TNF α , пг/см ³	0-6	0,67	3,2	0	1,84	5,1	0
VEGF, пг/см ³	10-700	261,7	9,7	0	226,1	2,5	0
AnnV-FITC ⁺ PI ⁻ , %	1,5-2,5	2,45	18	13,5	1,20	8	63,3
AnnV-FITC ⁺ PI ⁺ , %	7-11	6,09	1	55	8,03	12	3,3



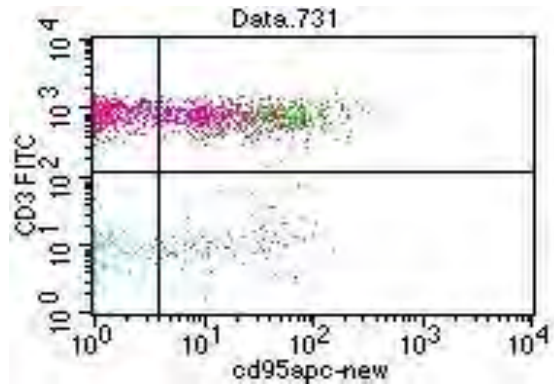
CD45⁺



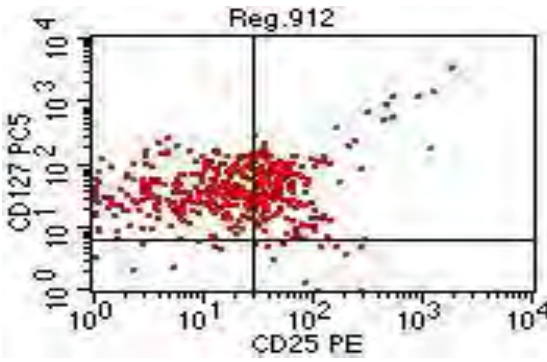
CD3⁺ - 66%



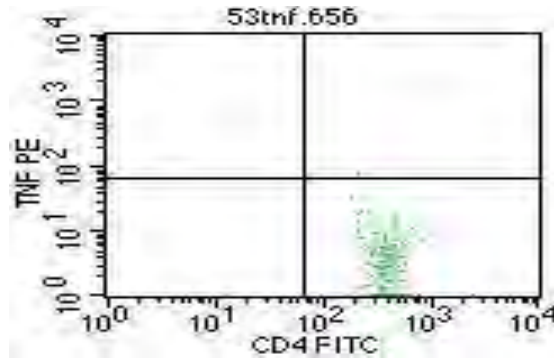
CD25⁺ - 12 %



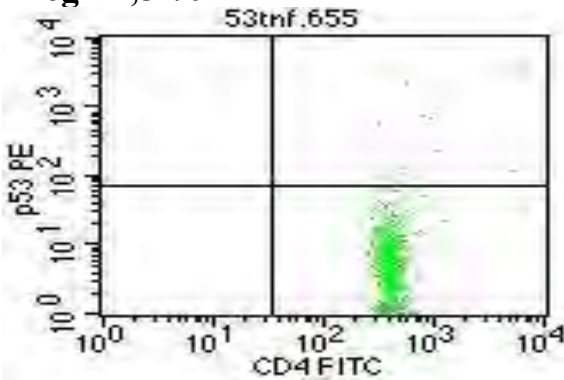
CD95⁺ - 10 %



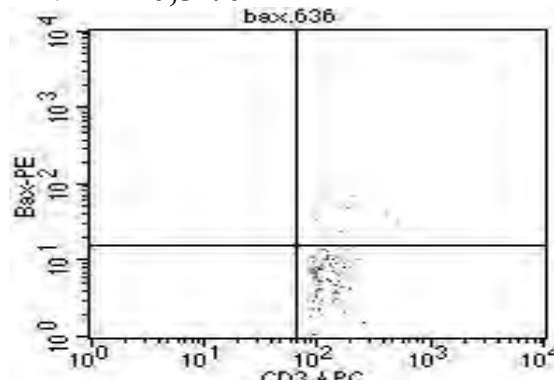
Treg - 1,5 %



TNFR - 0,5 %



p53 - 0,7 %



bax - 6,5 %

Рисунок 5.2.3 – Индивидуальная иммунограмма ребенка, проживающего в условиях геохимической стронциевой провинции

Одним из перспективных направлений изучения иммунного статуса является анализ активационного профиля субпопуляций лимфоцитов. Многолетний экспериментальный опыт показал, что определение экспрессии на поверхности лимфоцитов CD25-, CD95-маркеров является наиболее простым и эффективным способом оценки активационных процессов в иммунной системе.

На сегодняшний день известно большое количество активационных антигенов, экспрессирующихся на мембране лимфоцитов. CD25, CD95 – активационные антигены дифференцировочного характера. CD25 рассматривают как ранний активационный маркер, а CD95 – как поздний активационный маркер [70]. Изменение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих ранний активационный CD25⁺-антиген, свидетельствует о характере пролиферативного и дифференцировочного процесса в иммунокомпетентных клетках. Динамика изменения количества CD25⁺-маркера на лимфоцитах определяет системную адаптацию иммунной системы в условиях повышенной гаптенной нагрузки.

В качестве одного из апоптотических маркеров, позволяющих судить о степени негативной активации иммунокомпетентных клеток, используют CD95-маркер, экспрессируемый мембранами активируемых мононуклеаров. Однако экспрессия маркера CD95 отражает лишь готовность лимфоцитов вступить в апоптоз – включить механизм запрограммированной клеточной гибели по FAS-зависимому механизму. Вклад CD95⁺ в генетически детерминированную клеточную гибель зависит от специфической восприимчивости клетки к FAS-зависимому апоптозу [246]. Как отмечалось выше, значима роль системы FAS / FASL и в ремоделировании костной ткани [263, 264, 381].

Снижение или тенденция к снижению содержания Treg в периферической крови можно рассматривать как изначальную дезинтеграцию иммунной системы в условиях повышенной гаптенной нагрузки, что наблюдается в настоящем исследовании.

В Th2 идентифицирован потенциалзависимый Ca-канал, ингибирование которого снижает продукцию цитокинов Th2. Возможно, ингибирование продукции Th2-цитокинов повышает продукцию Th1-цитокинов и основных его

представителей TNF α и IFN γ . Установлено, что остеобласты и остеокласты могут взаимодействовать друг с другом посредством цитокинов [342, 269]. Можно предполагать, что Sr²⁺, замещая кальций, изменяет экспрессию медиаторов межклеточного взаимодействия, вызывая цитокиновый дисбаланс.

Так как для осуществления своих функций клетки иммунной системы непосредственно контактируют с эндотелием как на пути из кровеносного русла в ткани, так и на выходе из тканей в лимфатическую систему, VEGF должен рассматриваться как важный фактор физиологической иммунорегуляции [342; 416]. Синтез VEGF постоянно выявляется во многих органах и тканях, а также в органах иммунной системы. Макрофаги конститутивно способны синтезировать VEGF. Активированные Т-клетки также способны секретировать VEGF и экспрессировать VEGFR-2 [276, 416]. VEGF обладают способностью стимулировать матриксные металлопротеиназы MMP9 в Т-лимфоцитах, и этот эффект можно рассматривать в качестве аутокринной регуляции способности клеток мигрировать через эндотелий [416]. VEGF как таковой не достаточен и не является необходимым для индукции FASL, но его недостаток резко снижает продукцию FASL [276, 342]. Следовательно, снижение уровня VEGF косвенно подтверждает снижение активности системы FAS – FASL. Белок p53 экспрессируется во всех клетках организма, являясь продуктом гена-супрессора опухоли p53. Апоптоз, обусловленный белком p53, может быть инициирован через несколько минут или несколько часов [109]. Однако механизмы, лежащие в основе проапоптотического действия белка p53, до конца неясны. Белок p53 обладает способностью репрессировать ген *TERT*, регулировать синтез ряда белков с ангиогенной и антиангиогенной активностью [50].

Важным результатом взаимодействия регуляторных факторов с про- и антиапоптотической активностью является способность организма адекватно модулировать процесс гибели клеток в неблагоприятных условиях. В условиях, когда снижается p53-регулируемый апоптоз, рецепторзависимый сигнальный путь апоптоза с участием TNFR1 и FAS, другим возможным направлением развития апоптоза является митохондриальный сигнальный путь, о чем

свидетельствует дисбаланс в системе *bax* / *bcl-2* (экспрессия основного проапоптозного белка *bax*). Экспрессия *bax* приводит к связыванию с белком *bcl-2*, соответственно существует высокая вероятность инициации митохондриального сигнального пути апоптоза. Очевидно, FAS, TNFR1, Treg, p53, *bcl-2*, TNF α , VEGF, Annexin V-FITC⁺PI⁻, Annexin V-FITC⁺PI⁺ являются индикаторными показателями нарушения апоптоза в условиях экспозиции стронция.

Таким образом, у детей, проживающих в условиях воздействия стронция, установлены функциональные нарушения иммунной системы, характеризующиеся снижением готовности лимфоцитов к реализации иммунного ответа и процедурой угнетения передачи апоптотического сигналинга. Отмечается дефицит количества CD3⁺-лимфоцитов и эффекторных клеток с цитотоксической активностью и регуляторных лимфоцитов, Th1-смещение цитокинового профиля, замедление экспрессии внутриклеточных антиапоптотических сигнальных белков, снижение активности реакций антиокислительной защиты. Оценка показателей, отражающих состояние процессов метаболизма костной ткани, позволяет предполагать большую активность остеобластогенеза (повышение RANKL) и замедление процессов формирования костной ткани (снижение активности щелочной фосфатазы, костного изофермента щелочной фосфатазы, уровня остеокальцина) у детей, проживающих в условиях экспозиции стронция, по сравнению с детьми, которые проживают на относительно благополучной территории. В условиях воздействия стронция отмечается снижение количества Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток (ингибирование апоптоза), при этом повышается количество Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток (поздний апоптоз / некроз). Гибель клетки по пути некроза является дополнительным механизмом в регуляции иммунного ответа в условиях повышенной антигенной (гаптенной) нагрузки.

В целом результаты собственных исследований, а именно, что ремоделирование костной ткани находится под контролем факторов, связанных с иммунной регуляцией, согласуются с современными литературными данными

[176; 269; 326]. Полученные результаты доказывают особую значимость апоптоза в механизмах иммунорегуляции и в сопряженных во времени процессах локальной резорбции и формирования костной массы, а CD3⁺, CD8⁺, FAS, TNFR, Treg, p53, bcl-2, TNF α , VEGF, RANKL; LPO, MDA, GST, GPx, SOD, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин, Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клетки, Annexin V-FITC⁺PI⁻ - клетки являются индикаторными показателями нарушения клеточной гибели в условиях избыточного поступления в организм щелочно–земельных металлов (на примере стронция).

5.3. Клинические особенности иммуноассоциированных нарушений у детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа), поступающих с питьевой водой

Сравнительный анализ медико-социальных анкет статистически значимых различий между группами по социальным показателям не выявил (образование, профессия родителей, материальные и жилищные условия семьи). Группу наблюдения и группу сравнения составляли дети, рожденные от 1–3-й беременности, срочных родов, с отсутствием в анамнезе органических и инфекционных заболеваний, врожденной патологии (64,2 и 57,1 % соответственно, $p = 0,323$). Из исследования были исключены дети, чьи родители страдали алкоголизмом или наркоманией, а также дети из асоциальных семей. Найдено, что родители в группе наблюдения достоверно чаще указывали на наличие у детей жалоб на боли в животе (38,04 против 12,56 % в группе сравнения, $p = 0,049$), локализация боли отмечалась в правом подреберье (15,2 % против 9,3 % в группе сравнения, $p = 0,320$).

В ходе клинико-функционального обследования детей установлено, что в группе наблюдения и группе сравнения в качестве основного диагноза диагностировались класс XI. «Болезни органов пищеварения» (K00–K93; 65 и 40 % соответственно, $p = 0,01$) (Таблица 5.3.1). Обнаружено, что у детей группы наблюдения по сравнению с обследуемыми детьми группы сравнения отмечается

незначительная тенденция повышения класса III. «Болезней крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекающие иммунный механизм» (D80–D89; 5,1 и 3,0 % соответственно, $p = 0,051$).

Таблица 5.3.1 – Структура заболеваемости по основному диагнозу у обследованных детей (экспозиция хлороформа) (абс., %)

Основные классы заболеваний	Группа сравнения n = 212	Группа наблюдения n = 286	<i>p</i>
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–M99) (кифоз, лордоз M40; нарушение осанки)	2 0,7 %	1 0,3 %	0,785
Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50–D89) (анемии, связанные с питанием (железодефицитная и др.; легкое течение D50, D51, D52, D53)	6 2,8 %	15 5,1 %	0,068
Болезни кожи и подкожной клетчатки (зуд L29)	7 3,4 %	7 2,4 %	-
Болезни органов кровообращения IX (I00–I99) (малые аномалии сердца: Q21,1; Q24,8)	5 2,5 %	4 1,7 %	0,067
Болезни органов пищеварения (K00–K93) (дискинезия пузырного протока и желчного пузыря K82.8; синдром нарушения кишечного всасывания вторичного характера K90.0; функциональная диспепсия K30; функциональные расстройства желудка K31; функциональные кишечные нарушения K59)	85 (40,1 %)	186 (65,5 %)	<0,001
Психические расстройства и расстройства поведения (F00–G99) (нейроциркуляторная астения F45.3; невротические реакции, связанные со стрессом F43.2; расстройство сна неорганической этиологии F51; специфические расстройства развития речи и языка F80)	40 18,9 %	22 10,2 %	0,051
Болезни органов дыхания (J00–J99) (аллергический ринит легкое течение J30; хронический фарингит без клинических проявлений J31.2; хронические болезни миндалин и аденоидов гипертрофия миндалин и аденоидов 2 степени J35)	64 30,2 %	49 17,3 %	0,053
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00–E90) (недостаточность питания, дефицит массы тела; E43–E46)	3 1,4 %	2 0,7 %	0,500

В результате проведенного обследования у 19,9 % детей группы наблюдения диагностировано нарушений процессов пищеварения по типу

функциональной диспепсии (K30). Обнаружено, что у 18,3 % обследованных детей имеются дисфункциональные расстройства билиарного тракта (K82.8).

У детей группы наблюдения ($n = 284$) в ходе ультразвукового исследования органов брюшной полости выявлены признаки реактивных (72,5 %) и структурных (2,7 %) нарушений в поджелудочной железе, а именно: увеличение протока поджелудочной железы (5 %) и аэроколии (14 %) (Рисунок 5.3.1). В ходе обследования у значительной части детей выявлены изменения со стороны гепатобилиарной системы: увеличение размеров печени (38 %), лабильные (36 %) и фиксированные (12 %) перегибы желчного протока.

У детей группы наблюдения в ходе УЗИ органов брюшной полости отсутствие какой-либо патологии со стороны печени установлено только у 7,8 % детей группы наблюдения, тогда как у детей группы сравнения не выявлено патологии гепатобилиарного тракта у 78 % обследованных. Результаты УЗИ органов брюшной полости свидетельствуют о наличии дисфункции гепатобилиарного тракта у значительно большей части обследованных детей, чем это было установлено клинически.

Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с развитием у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, дискинезией пузырного протока и желчного пузыря ($OR = 2,78$; 95% ДИ = 1,93-4,01; $p < 0,05$) (Таблица 5.3.2).

Таблица 5.3.2 – Показатели причинно-следственной связи возникновения заболеваний гепатобилиарного тракта у детей группы наблюдения с фактором риска (хлороформ в крови)

Показатель	RR [95% ДИ]	OR [95% ДИ]
Дискинезия пузырного протока и желчного пузыря, K82.8 $p < 0,05$	1,62 [1,34-1,95]	2,77 [1,92-4,01]

Примечание: $p < 0,05$ – различие между группой наблюдения и группой сравнения

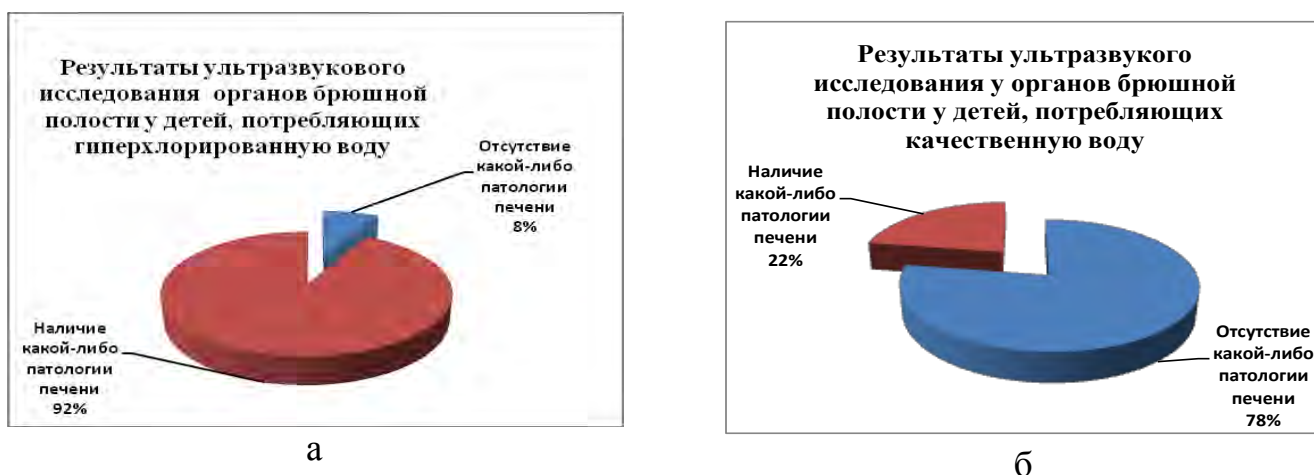


Рисунок 5.3.1 – Результаты УЗИ (%) детей, потребляющих: а – качественную питьевую воду; б – некачественную питьевую воду

Таким образом, у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, преобладают заболевания гепатобилиарного тракта, ассоциированного с иммунной системой.

5.4. Иммунологические, биохимические индикаторные показатели у детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа)

Идентификация хлороформа в биосредах (кровь) в диапазоне от 0,00001 до 0,0420 мг/дм³ позволила выделить комплекс индикаторных показателей, имеющих статистически значимый ($p < 0,05$) характер отклонений, характеризующий негативные эффекты со стороны критических органов и систем (печень, патогенетически связанная с иммунной системой) (Таблицы 5.4.1 – 5.4.8).

Сравнительный анализ иммунограмм выявил статистически значимое ($p = 0,001$) снижение в 1,3 раза процентного содержания CD3⁺-клеток и статистически значимо ($p = 0,003$) в 1,14 раза CD4⁺-клеток у детей основной выборки в сравнении с контрольными значениями (Таблица 5.4.1). В группе обследуемых, проживающих в условиях экспозиции хлороформом, отмечается статистически значимое ($p = 0,001-0,042$) в среднем в 1,2 раза, повышение

абсолютного и относительного числа CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов и CD19⁺-лимфоцитов в сравнении с контрольными величинами. Статистически значимых отклонений от физиологической нормы у обследуемых детей не установлено.

Количество проб крови с превышением физиологической нормы CD19⁺-клеток (относительное и абсолютное число); CD16⁺CD56⁺-клеток (относительное и абсолютное число) в группе наблюдения составило 7,7 и 15,0 %; 4,9 и 12,6 % соответственно против 0 и 2,6 %; 0 и 6,3 % соответственно в группе сравнения.

Таблица 5.4.1 – Индикаторные показатели иммунной системы у детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформа

Показатель	ФН	Группа сравнения (n=238)			Группа наблюдения (n=286)			p
		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН		M ± σ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН		
			выше	ниже		выше	ниже	
CD3 ⁺ , %	55-84	73,0 ± 1,49 [71,1-74,1]	0	0	66,77 ± 0,69 [65,4-69,5]	0	1,7	0,001
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,69- 2,54	1,86 ± 0,13 [1,7-1,9]	4,2	0	1,89 ± 0,65 [1,9-2,2]	0	1	0,191
CD4 ⁺ , %	55-84	42,0 ± 1,98 [38,6-42,6]	0	8,3	37,0 ± 0,68 [35,7-38,2]	0	18,5	0,003
CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,69- 2,54	1,00 ± 0,08 [0,9-1,1]	6,3	0	1,03 ± 0,03 [1,0-1,2]	4,5	1	0,417
CD8 ⁺ , %	13-41	25,0 ± 1,54 [24,4-27,5]	1,2	0	24,0 ± 0,71 [23,7-25,8]	1,4	0	0,323
CD8 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,19- 1,14	0,66 ± 0,06 [0,6-0,7]	3,9	0	0,69 ± 0,03 [0,7-0,8]	3,8	0	0,165
CD19 ⁺ , %	6-25	14,0 ± 1,01 [12,8-14,8]	0	0	15,5 ± 0,83 [14,9-16,9]	7,7	1	0,003
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,09- 0,66	0,32 ± 0,03 [0,3-0,4]	2,6	0	0,42 ± 0,02 [0,4-0,5]	15	0	0,001
NKT, %	5-27	11,0 ± 1,50 [10,1-13,1]	0	2,1	12,5 ± 0,02 [11,6-13,9]	4,9	1,7	0,042
NKT, 10 ⁹ /дм ³	0,09- 0,59	0,26 ± 0,04 [0,6-0,3]	6,3	0	0,35 ± 0,02 [11,6-13,9]	12,6	0,3	0,002

Кратность превышения составила 1,2-5,8 раза. Доля проб крови с пониженным числом CD3⁺-клеток (по относительной и абсолютной величине) в группе наблюдения составила 1,7 и 1 % соответственно против 0 и 0 % в группе

сравнения. Доля проб крови с пониженным числом CD4⁺-клеток в группе наблюдения составила 18,5 против 8,3 % в группе сравнения.

CD4⁺-антиген участвует в передаче в клетку активационного сигнала. Посредством антигена CD4 в клетку могут передаваться супрессорные сигналы и сигналы, инициирующие клеточную гибель по механизму апоптоза. Уменьшение экспрессии CD4⁺-маркера на лимфоцитах может спровоцировать ингибирование развития апоптотической программы лимфоцитов. Учитывая повышенную чувствительность Th1-клеток к факторам апоптоза [104, 177] следует полагать, что модификация апоптоза Т-лимфоцитов в результате воздействия химических факторов является одним из механизмов смещения цитокинового баланса в сторону Th2-клеток, и, соответственно, преобладания связанных с ними иммунорегуляторных механизмов инверсии иммунного ответа. Показано, что НКТ-клетки отвечают за повышенную выработку интерлейкинов Th2-профиля (IL4, IL6) в ответ на антигенную стимуляцию, что способствуют подавлению апоптоза [70]. Ряд авторов заявляют, что иногда CD3⁺CD16⁺CD56⁺-клетки способны участвовать в осуществлении широкого диапазона эффекторных функций в отношении других клеток посредством экспрессии на своей поверхности рецепторных и лигандных молекул (FASL, CD40L и др.) [104]. Установлено, что источником FASL, необходимого для процесса активационного апоптоза Т-лимфоцитов, являются активированные В-лимфоциты [70]. Причем экспрессировать FASL способны только зрелые В-клетки. Считается возможным, что В-лимфоциты могут являться источником IL4 для дифференцирования клеток Th2. Основываясь на представленных сведениях, можно полагать, что состояние интенсивности В-клеточной активации, которая часто регистрируется в ходе антигенной стимуляции, представляет собой не только фактор адаптивного иммунитета, но и немаловажное требование для ингибирования иммунологической ответной реакции [70]. Данная тенденция подтверждена результатами собственных исследований. Очевидно, к индикаторным показателям в условиях экспозиции хлороформа можно отнести: CD3⁺-, CD4⁺-, CD19⁺-лимфоциты и НКТ.

В ходе работы проанализированы процесс свободнорадикального окисления и его регуляция в условиях повышенного поступления в организм галогенорганических соединений. Выявлено повышение малонового диальдегида и гидроперекиси липидов в результате инициации перекисного окисления. Содержание MDA в плазме крови у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,001$) 1,2 раза превысил показатель в группе сравнения (Таблица 5.4.2).

Таблица 5.4.2 – Индикаторные показатели окислительно-восстановительных процессов у детей, проживающих на территории экспозиции хлороформа

Показатель	ФН	Группа сравнения ($n = 219$)			Группа наблюдения ($n = 286$)			p
		$M \pm \sigma$ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		$M \pm \sigma$ [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		
			выше	ниже		выше	ниже	
Окислительные процессы								
LPO, мкмоль/дм ³	0-350	352,9 ± 24,13 [194,4-511,1]	39,5	0	498,3 ± 26,36 [451,0-545,6]	43,2	0	0,001
MDA, мкмоль/дм ³	1,8-2,5	2,3 ± 0,05 [2,2-2,4]	5,3	0	2,79 ± 0,08 [2,6-2,9]	46,9	0	0,001
Антиоксидантные процессы								
GST, нг/см ³	110-290	137,5 ± 16,1 [43,9-231,1]	2,1	0	152,8 ± 20,1 [48,8-256,8]	11	0	0,651
GPx, нг/см ³	0-100	36,9 ± 1,47 [34,0-39,8]	42,3	38,2	82,3 ± 9,3 [63,9-100]	83,0	13,6	0,001
SOD, нг/см ³	45,9-98	31,8 ± 0,72 [30,4-33,2]	14,5	4,9	46,6 ± 5,89 [35,1-58,1]	28,4	11,4	0,002
Интегральный показатель состояния антиоксидантной активности								
АОА, %	36,2-38	37,94 ± 0,91 [20,1-39,7]	19,6	10,9	42,6 ± 1,79 [39,1-46,1]*	42,7	44,4	0,001

Примечание: * – $p < 0,05$ между группой наблюдения и ФН

Количество проб с превышением уровня MDA по сравнению с физиологической нормой составило 47 %, что практически в 9 раз больше ($p = 0,001$) относительно показателя в контроле (5,3 %). Уровень гидроперекиси липидов у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,001$) в 1,4 раза превысил анализируемый показатель в группе сравнения. SOD фермент первого

звена защиты, синтез которого увеличивается при активации перекисного окисления. В выполненных углубленных исследованиях установлено статистически значимое ($p = 0,002$) увеличение активности SOD у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, относительно значений, полученных у детей, потребляющих качественную питьевую воду, кратность превышения составила 1,5 раза. Количество проб сыворотки крови с повышенной активностью SOD в группе наблюдения в 2 раза больше по сравнению с контролем и составило 28,4 и 14,5 % соответственно. Идентифицировано, что активность GPx, обладающей антиапоптозным эффектом, в сыворотке крови детей с повышенным содержанием хлороформа статистически значимо ($p = 0,001$) в 2,2 раза выше показателя, идентифицированного у детей группы сравнения. Доля проб сыворотки крови с повышенной активностью GPx составила 83 % в группе наблюдения против 42 % проб в группе сравнения.

Благодаря способности восстанавливать гидроперекиси кардиолипина GPx участвует в регуляции выхода апоптогенных белков из митохондрий и, таким образом, ингибирует внутренний путь апоптоза. У детей, проживающих в условиях экспозиции, установлена тенденция ($p = 0,651$) повышения уровня GST по сравнению с результатами, полученными у детей, проживающих на условно «чистой» территории. В случае нарушения баланса в системе «окисление–антиокисление» реакция POL из механизма, являющегося регулирующим, становится ключевой составляющей в патогенезе целого ряда заболеваний воспалительного и невоспалительного характера [57]. Антиоксидантная активность плазмы у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,001$) отличалась как от физиологических значений, так и от показателя в контроле ($p = 0,001$). Доля проб с завышенным содержанием АОА относительно физиологической нормы в плазме крови детей группы наблюдения составила 42,7 %, что в 2 раза выше аналогичного показателя в группе сравнения – 19,6 % ($p = 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о дисбалансе в системе «окисление–антиокисление». Избыточная генерация ROS компенсируется активацией системы антиокисления. «Мягкий» оксидативный стресс может

действовать как сигнальный механизм, приводящий к адаптивным реакциям на стресс. Между тем, когда антиоксидантная защита превосходит образование ROS, нарушается модуляция клеточных сигнальных путей, связанных с апоптозом вследствие чего клетка гибнет по механизму некроза [333]. Окислительный стресс способен вызывать нарушение работы в клетках, что дополнительно вызывает развитие окислительных повреждений в митохондриях [168, 183]. Нарушение проницаемости митохондриальной мембраны в условиях окислительного стресса провоцирует критический энергодефицит в клетке и приводит к гибели клетки по пути некроза [114, 215]. Очевидно, к индикаторным показателям в условиях экспозиции хлороформа можно отнести: AOA, LPO, MDA, GPx, SOD.

Установлено, что у детей, потребляющих ненормированную питьевую воду по содержанию галогенорганических соединений, статистически значимо ($p = 0,049-0,001$) в среднем в 1,1 раза снижено содержание общего белка и альбуминов (Таблица 5.4.3).

Таблица 5.4.3 – Индикаторные показатели печеночного профиля у детей, проживающих на территории экспозиции хлороформа

Показатель	ФН	Группа сравнения ($n = 219$)	Группа наблюдения ($n = 286$)	p
		($M \pm \sigma$ [95% ДИ])	($M \pm \sigma$ [95% ДИ])	
Щелочная фосфатаза, Е/дм ³	71-645	251,3 ± 18,81 [220,3-282,3]	244,1 ± 6,81 [230,7-257,5]	0,402
Печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы, Е/дм ³	6,36- 7,14	5,78 ± 0,89 [3,7-7,8]	11,17 ± 1,00 [9,3-13,1]	0,001
Общий белок, г/дм ³	60-80	73,8 ± 1,09 [70,6-74,9]	70,6 ± 0,61 [59,3-71,9]	0,049
Альбумины, г/дм ³	38-54	45,2 ± 0,90 [44,4-46,1]	40,6 ± 0,47 [39,7-41,5]	0,001
Билирубин общий, мкмоль/дм ³	0-18,8	7,2 ± 0,99 [5,1-9,3]	8,95 ± 1,23 [8,1-9,8]	0,500
Билирубин прямой, мкмоль/дм ³	0-4,3	1,9 ± 0,40 [1,5-2,3]	7,49 ± 0,88 [2,9-9,2]	0,017
γ-ГТ, Е/дм ³	5-27	17,5 ± 1,11 [16,1-18,9]	19,67 ± 2,10 [13,4-25,9]	0,209
АЛТ, Е/дм ³	5-42	16,6 ± 3,39 [9,9-23,3]	15,4 ± 0,52 [14,4-16,4]	0,477
АСТ, Е/дм ³	6-37	24,3 ± 2,51 [23,6-29,2]	32,9 ± 1,09 [30,2-35,0]	0,003

У детей группы наблюдения доля проб со значительным сниженным содержанием общего белка и альбумина по сравнению с физиологической нормой составила 8,7 и 14,6 % соответственно против 2,1 и 4,6 % соответственно в группе сравнения (кратность снижения составила 2,1 и 3,2 раза соответственно) (Таблица 5.4.4).

Таблица 5.4.4 – Частота регистрации проб индикаторных показателей печеночного профиля с отклонением от физиологической нормы у детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформа

Показатель	ФН	Группа сравнения (n = 219) (М)	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		Группа наблюдения (n=286) (М)	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %	
			выше	ниже		выше	ниже
Печеночный изофермент щелочной фосфатазы, Е/дм ³	6,36-7,14	5,78	68,8	25,0	11,17	93,2	4,5
Общий белок, г/дм ³	60-80	73,79	0	2,1	70,61	0	8,7
Альбумины, г/дм ³	38-54	45,23	4,2	4,6	40,61	3,8	14,6
АЛТ, Е/дм ³	5-42	16,62	0,3	0	15,4	4,3	0
АСТ, Е/дм ³	6-37	24,25	12,0	0	32,87	25,9	0

Содержание билирубина прямого в сыворотке крови у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,017$) в 4 раза превышает значения, выявленные у детей группы сравнения. Частота регистрации проб с превышениями физиологической нормы прямого билирубина в сыворотке крови у детей, потребляющих некачественную воду по содержанию хлороформа, составила 87 % против 0 % в группе детей, потребляющих качественную питьевую воду. Обнаружено, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0,003$) в 1,2 раза повышена активность АСТ по сравнению с результатами, полученными у детей группы сравнения. У детей группы наблюдения активность АСТ повышена в 26 % против 12 % случаев в группе сравнения (кратность превышения составила 2,2 раза). Активность печеночной фракции изоферментов щелочной фосфатазы у детей, проживающих в условиях экспозиции, статистически значимо ($p = 0,001$) в 2 раза превысила аналогичный показатель, установленный у неэкспонированных детей. Доля проб сыворотки крови с повышенной активностью печеночной

фракции изоферментов щелочной фосфатазы составила 93,2 % в группе наблюдения против 68,8 % в группе сравнения (кратность превышения составила 1,4 раза).

Очевидно, к индикаторным показателям в условиях экспозиции хлороформа необходимо отнести: печеночную фракцию изоферментов щелочной фосфатазы, общий белок, альбумины, билирубин прямой, АСТ.

В ходе настоящего исследования проведена оценка цитокинового профиля всех обследуемых детей (Таблица 5.4.5).

Таблица 5.4.5 – Цитокиновый профиль у детей, проживающих в зоне экспозиции хлороформом

Показатель	ФН	Группа сравнения (<i>n</i> = 219)			Группа наблюдения (<i>n</i> = 286)			<i>p</i>
		<i>Me</i> [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		<i>Me</i> [95% ДИ]	Частота регистрации проб с отклонением от ФН, %		
			выше	ниже		выше	ниже	
IL1β, пкг/мл	0-11	2,47 [2,06-4,74]	1,4	0	3,52 [3,46- 4,26]	6,4	0	0,001
IL4, пкг/мл	0-4	0,93 [0,91-1,86]	8,5	0	1,69 [1,61-4,43]	11	0	0,001
IL6, пкг/мл	0-10	0,60 [0,45-2,46]	2,1	0	3,72 [3,11-9,56]	16,4	0	0,001
IL8, пкг/мл	0-10	0,77 [0,99-2,24]	1,4	0	1,16 [1,39-2,44]	2,1	0	0,710
IL10, пкг/мл	0-20	3,14 [2,84-5,15]	0	0	3,43 [3,22-7,18]	4,1	0	0,240
IFNγ, пкг/мл	0-15	1,7 [1,24-2,13]	0	0	1,46 [2,27- 3,28]	2,5	0	0,470
TNFα, пкг/мл	0-6	0,67 [0,84-3,25]	0	0	0,73 [0,94-1,44]	3,8	0	0,370

Обнаружено статистически значимое ($p = 0,001$) увеличение продукции цитокинов Th2 типа IL4, IL6 у детей группы наблюдения по сравнению с контрольными значениями, кратность превышения составила 2,2 и 4,3 раза соответственно. Установлено, что у детей, проживающих в условиях воздействия хлороформом, статистически значимо ($p = 0,001$) повышена экспрессия IL1β относительно значений, полученных у детей, проживающих на условно «чистой»

территории, кратность превышения составила 1,43 раза. Количество проб сыворотки крови с превышением ФН IL1 β , IL4, IL6, IL8, IL10, IFN γ и TNF α в группе наблюдения составили 6,4, 11,0, 16,4, 2,1, 4,1, 2,5 и 3,8 % соответственно против 1,4, 8,5, 2,1, 1,4, 0, 0 и 0 % соответственно в группе сравнения.

IL1 β повышает чувствительность клетки к FASL. Однако механизмы, посредством которых цитокин модулирует ответ на FASL, остаются неясными. Известно, что взаимодействие FAS и FASL может не только привести к апоптозу клетки, также стимуляция FAS / FASL-системы экспрессирует продукцию провоспалительного IL8. То есть одни и те же сигнальные пути используются для реализации различных клеточных программ. IL1 β повышает секрецию IL6, TNF [205]. Функциональные IL1R были обнаружены на зрелых клетках Th17 и Th2, их экспрессия на Th1-клонах не выявлена, что дополнительно доказывает, что в условиях повышенного содержания галогенорганических соединений преобладает поляризация Th2 [253]. Ряд авторов утверждает, что IL1 β и IL8 способны подавлять апоптоз полиморфноядерных лейкоцитов в результате паракринного эффекта [400].

В эксперименте доказано, что проапоптотический TNF α может косвенно (через p38 MAPK-индуцированный эффект) вызвать синтез хемокина IL8, последний также ингибирует апоптоз [220]. IL10 имеет решающее значение для поляризации Th2-типа иммунного ответа в естественных условиях. IL10 отвечает за подавление Th1-клеток, иммунорегуляцию, иммуносупрессию, снижение апоптоза. TNF α , IL1 β и IL8 могут спровоцировать скопление нейтрофилов, активность которых увеличивает продукцию ROS и модифицирует апоптоз иммунокомпетентной клетки. Известно, что активация AhR индуцируют увеличение продукции ROS при астме [336].

Установлено, что значительный вклад в повышение генерации продукции ROS принадлежит именно цитокинам Th2. В частности, IL4 активирует В-лимфоциты, которые в свою очередь способны повышать генерацию ROS [354]. Предполагается, что IL4 являться источником для дифференцирования клеток Th2. Противоапоптотический эффект IL6 заключается в снижении активности

каспаз, с индукцией антиапоптотического белка FLIP (белок, ингибирующий FLICE, FLICE inhibitory protein), изменение активности системы JAK / STAT [341]. TNF α повышает чувствительность клетки к FASL, при этом, не увеличивая экспрессию CD95⁺ [152]. Следует подчеркнуть, что изменение интенсивности продукции тех или иных цитокинов может быть как причиной, так и следствием антигенной нагрузки, реакцией организма на техногенную экспозицию. Известно, что в зависимости от дозы воздействия (например, TNF α) клетка погибает путем апоптоза (при низких концентрациях) или некроза (при высоких концентрациях) [11].

Многочисленными исследованиями показано, что центральную роль в регуляции Th1 / Th2-клеточного баланса играет цитокиновый профиль [341]. Однако в направленности поляризации Th1- и Th2-лимфоцитов существенное значение принадлежит процессу апоптоза. Повышение или снижение продукции тех или иных внутриклеточных факторов (цитокинов – интерлейкинов, интерферонов, TNF) приводит к изменению интенсивности апоптоза. Преобладание противоапоптотических медиаторов приводит к подавлению реализации апоптотической программы лимфоцитов. Высокий уровень IL4, IL6, IL10, рассматриваемые в контексте активности апоптоза, можно расценивать как явление компенсаторное, направленное на сбалансированность этого биологического процесса в условиях контаминантной нагрузки. Очевидно, к индикаторным показателям в условиях экспозиции хлороформа относятся: IL1 β , IL4, IL6, IL10.

Индикаторные показатели апоптоза у детей, проживающих в зоне экспозиции хлороформа

Используя метод проточной цитофлюориметрии, детектированы внутриклеточные и мембранные индикаторные показатели клеточной гибели.

Обнаружено, что при потреблении ненормированной питьевой воды по содержанию хлороформа, у детей статистически значимо ($p = 0,001$) в 1,75 раза выше содержание bcl-2 (Me [95% ДИ]: 1,12 [0,98-1,15], %) по сравнению с контрольными значениями (Me [95% ДИ]: 0,64 [0,38-0,93], %). Протеин p53 у

детей группы наблюдения (Me [95% ДИ]: 1,84 [1,31-2,17], %) регистрируется в диапазоне контрольных величин (Me [95% ДИ]: 2,00 [1,75-2,60], %) ($p = 0,600$). Статистически значимо ($p = 0,001$) в 1,66 раза снижено количество AnnexinV - FITC⁺PI⁻-клеток и статистически значимо ($p = 0,001$) в 2,42 раза повышено содержание Annexin V - FITC⁺PI⁺-клеток относительно цифр, зафиксированных в группе сравнения (Таблицы 5.4.6, 5.4.7, Рисунки 5.4.1-5.4.3).

Установлено, что у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, количество AnnexinV -FITC⁺PI⁺-лимфоцитов статистически значимо ($p < 0,05$) превышает физиологическую норму.

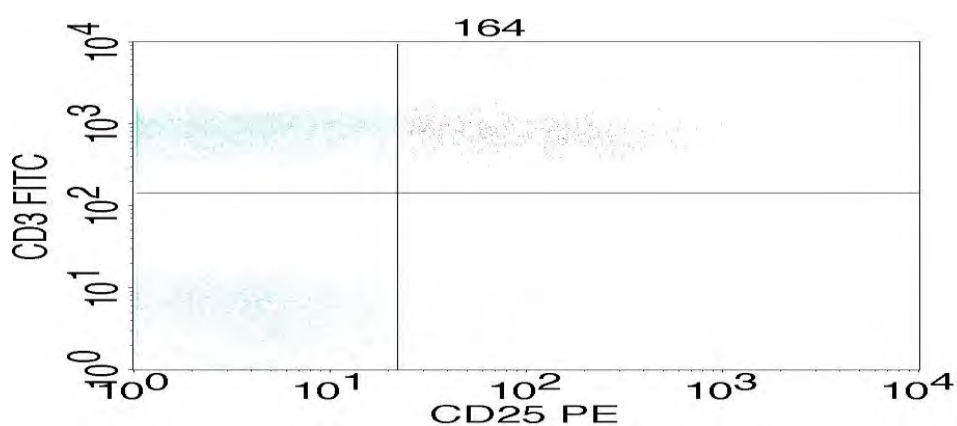


Рисунок 5.4.1 – Гистограмма, отражающая экспрессию мембранных молекул CD25⁺ у детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформом

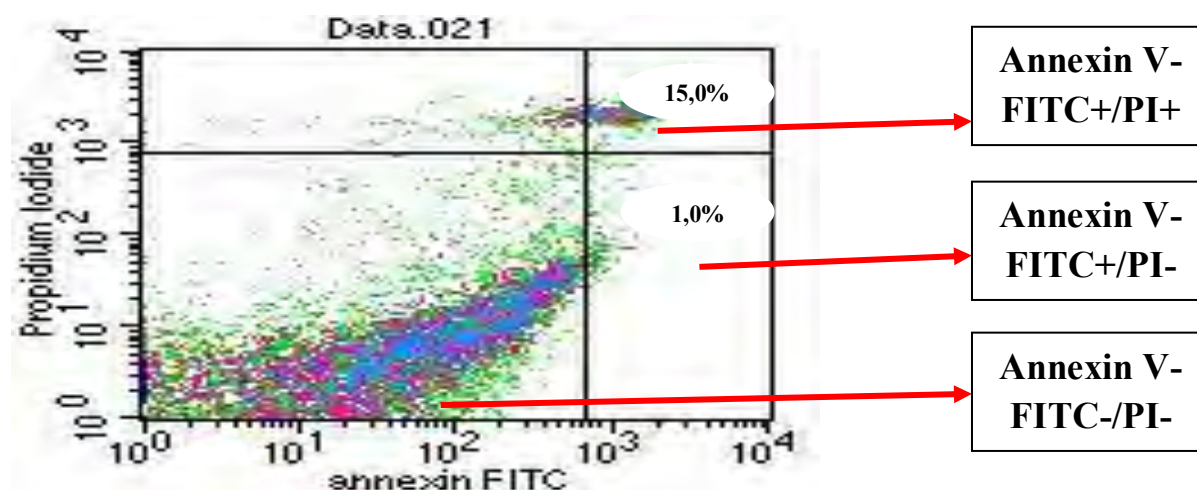


Рисунок 5.4.2 – Гистограмма, отражающая количество Annexin V-FITC⁺PI⁻ и Annexin V-FITC⁺PI⁺ -лимфоцитов у детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформом

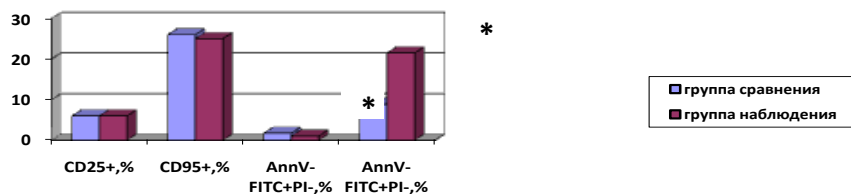


Рисунок 5.4.3 – Индикаторные показатели клеточной гибели у детей, проживающих на территории экспозиции хлороформом, Ме; * – различие между группой сравнения и группой наблюдения, ($p < 0,05$)

Оценка уровня экспрессии маркера ранней активации CD25⁺-рецептора и маркера поздней активации CD95⁺-рецептора показала, что анализируемые данные находятся в диапазоне контрольных значений.

Таблица 5.4.6 – Характеристика индикаторных показателей клеточной гибели у детей, проживающих в зоне воздействия хлороформа

Показатели	ФН	Группа контроля ($n = 219$)		Группа наблюдения ($n = 286$)		p
		Me (P ₂₅ , P ₇₅)	95% ДИ	Me (P ₂₅ , P ₇₅)	95% ДИ	
CD25 ⁺ , %	5-12	6,00 (5,00; 7,00)	5,69-6,89	6,00 (5,00; 7,00)	5,62-6,29	0,475
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,1-0,3	0,15 (0,12; 0,19)	0,14-0,18	0,16 (0,14; 0,22)	0,16-0,19	0,156
CD95 ⁺ , %	15-25	26,00 (21,00; 33,00)	25,02-29,2	25,00 (22,00; 30,00)	24,97- 27,97	0,801
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,4-0,7	0,63 (0,53; 0,77)	0,61-0,74	0,70 (0,59; 0,82)	0,62-0,83	0,250
Annexin V-FITC ⁺ PI ⁻ , %	1,5-2,5	1,78 (1,24; 2,40)	1,76-8,87	1,06 (0,78; 1,31)	0,97-1,18	0,001
Annexin V-FITC ⁺ PI ⁺ , %	7-11	8,87 (6,53; 12,32)	9,06- 10,71	21,49 (15,11; 26,28)	18,48- 22,50	0,001

Клетки, экспрессирующие bcl-2, обладают значительной устойчивостью к повышенному окислительному стрессу без прямого снижения уровней ROS [136]. Показано, что у SOD-дефицитных штаммов дрожжей частично снижен уровень bcl-2. Кроме повышения активности ряда ферментов, в частности SOD [139], bcl-2 также может улучшить митохондриальную функцию за счет снижения хронического окислительного стресса [135]. Показно: если в условиях гаптенной

стимуляции (экспозиция хлороформом) средний уровень содержания CD25⁺–лимфоцитов и CD95⁺–лимфоцитов достоверно не превышает контрольный показатель или наблюдается только незначительная тенденция к изменению содержания данных клеток, можно предполагать дестабилизацию адаптационных процессов регуляции клеточного звена иммунной системы в условиях экспозиции галогенорганическими соединениями (Таблица 5.4.7).

Таблица 5.4.7 – Частота регистрации проб индикаторных показателей клеточной гибели с отклонением от физиологической нормы у обследуемых детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформа (%)

Показатель	ФН	Группа сравнения (n = 219)			Группа наблюдения (n = 286)		
		Me	Частота регистрации проб с отклонением от ФН		Me	Частота регистрации проб с отклонением от ФН	
			выше	ниже		выше	ниже
CD25 ⁺ , %	5-12	6,00	0	12,8	6,00	2,5	15,4
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,1-0,3	0,15	2,1	14,9	0,16	3,3	9,5
CD95 ⁺ , %	15-25	26,00	46,3	0	25,00	47,5	2,9
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,4-0,7	0,63	4,2	0	0,70	8,4	1,0

В группе наблюдения количество проб с пониженным содержанием Annexin V-FITC⁺PI⁻-лимфоцитов относительно физиологической нормы составило 96 %, количеств проб с повышенным количеством Annexin V-FITC⁺PI⁺-лимфоцитов – 85 %. Результаты экспериментов указывают, что в условиях окислительного стресса некроз является основным типом клеточной гибели [233, 366].

Диапазоны ответных реакций иммунной системы на воздействие хлороформа

Оценка клеточной гибели с учетом уровня хлороформа в крови показала, что у детей II подгруппы (среднее значение хлороформа в крови 0,0068 [0,0052–0,014] мг/дм³) статистически значимо ($p = 0,003$) повышено количество Annexin V-FITC⁺PI⁺-лимфоцитов и статистически значимо ($p = 0,007$) снижено количество Annexin V-FITC⁺PI⁻-лимфоцитов по сравнению со значениями, полученными у детей I подгруппы (среднее значение хлороформа в крови 0,0022 [0,0008; 0,0027] мг/дм³) (Таблица 5.4.8, Рисунок 5.4.4).

Таблица 5.4.8 – Диапазоны индикаторных показателей клеточной гибели у детей, проживающих в зоне воздействия хлороформа

Показатели	I подгруппа (n=20)		II подгруппа (n=40)		p
	Me (P ₂₅ , P ₇₅)	95% ДИ	Me (P ₂₅ , P ₇₅)	95% ДИ	
Концентрация хлороформа в крови					
CD25 ⁺ , %	6,00 (5,00; 7,00)	5,50-6,66	6,00 (5,00; 7,00)	5,42-6,32	0,667
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,17 (0,14; 0,22)	0,15-0,20	0,15 (0,13; 0,22)	0,15-0,19	0,546
CD95 ⁺ , %	24,50 (21,57; 27,50)	22,03-27,80	25,00 (23,00; 30,00)	25,16-28,24	0,149
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,71 (0,58; 0,88)	0,62-0,82	0,76 (0,56; 0,90)	0,67-0,85	0,637
Annexin V-FITC ⁺ PI ⁻ , %	1,22 (1,04; 1,45)	1,05-1,44	0,90 (0,73; 1,24)	0,81-1,06	0,007
Annexin V-FITC ⁺ PI ⁺ , %	9,60 (8,26; 15,91)	9,48- 13,16	15,34 (11,93; 18,35)	13,67-16,75	0,003

Примечание: p – различие между I подгруппой и II подгруппой; * – различие между подгруппами и ФН

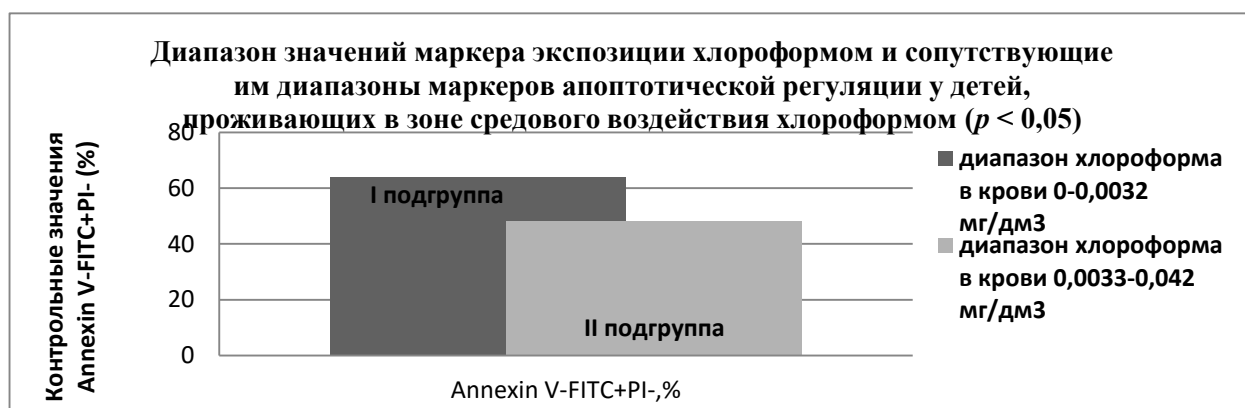


Рисунок 5.4.4. – Диапазон значений хлороформа в крови и диапазоны интегральных показателей клеточной гибели у детей, проживающих в зоне воздействия хлороформа

Анализ мембранных индикаторных показателей апоптоза выявил, что у детей в крови идентифицирован хлороформ в диапазоне от 0,0033 до 0,0420 мг/дм³, в 1,36 раза снижается количество Annexin V-FITC⁺PI⁻ -лимфоцитов и в 1,64 раза повышается процентное содержание клеток, позитивных по Annexin V и витальному красителю, по сравнению с обследуемыми детьми, в биосредах которых хлороформ идентифицирован на уровне от 0,00001 до 0,0032 мг/дм³.

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. Замедление аннексининдуцированного апоптоза в условиях воздействия галогенорорганических соединений может служить сигналом для иммунопролиферативных состояний. Таким образом, к индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции хлороформа следует отнести: bcl-2, Annexin V-FITC⁺PI⁻-лимфоциты и Annexin V-FITC⁺PI⁺-лимфоциты.

Установлено, что у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, выявлены изменения, характеризующие нарушения клеточной гибели. Эффект, оказываемый хлороформом на вариабельность индикаторных показателей иммунной системы, зависит от дозы и длительности воздействия. Поскольку обследуемые группы детей различались только степенью содержания хлороформа в биосредах (кровь), а наличие хлороформа в питьевой воде рассматривается как индикатор содержания в ней продуктов хлорирования [28], следует отметить, что именно хлороформу принадлежит ключевая роль в дисрегуляции клеточной гибели. При идентификации хлороформа в крови на уровне от 0 до 0,230 мг/дм³ обнаружены следующие изменения показателей иммунной системы: субпопуляционный дисбаланс, характеризующийся снижением уровня общей популяции Т-лимфоцитов и эффекторных клеток с хелперной активностью (снижение содержания CD3⁺-клеток и CD4⁺-клеток), повышением количества клеток, отвечающих за реализацию гуморального ответа (повышение уровня CD19⁺-лимфоцитов) и повышением количества НКТ-клеток (повышенная выработка интерлейкинов Th2-профиля); гиперпродукция цитокинов Th2 и IL1 β , что свидетельствует о преобладании антиапоптотических сигналов и активации гепатоцитов (повышение экспрессии IL4, IL6, IL1 β); ингибирование митохондриального механизма реализации апоптоза (повышение концентрации

bcl-2), активизация процессов свободнорадикального окисления с последующим накоплением продуктов пероксидации и интенсификации реакций антиокислительной защиты с участием неферментативного звена и ферментативного звена (повышение уровня LPO, MDA, AOA и активности GPx, SOD); снижение синтетической функции печени (снижение общих белков, альбуминов), явления холестаза (повышение активности печеночной фракции изоферментов щелочной фосфатазы, уровня прямого билирубина), нарушение целостности гепатоцитов (повышение активности АСТ), обуславливающее снижение детоксикационной функции печени; угнетение клеточной гибели (без участия FAS-рецепции) по пути апоптоза и активация гибели клетки путем некроза (повышение количества Annexin V-FITC⁺PI⁻-клетки и снижение – Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток). У детей по мере нарастания в биосредах концентрации хлороформа (диапазон концентрации от 0,0033 до 0,0420 мг/дм³) отмечается прогрессивное угнетение гибели клетки по пути апоптоза и повышение количество Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток (поздний апоптоз / некроз), что является дополнительным механизмом в регуляции жизненного цикла клетки в условиях воздействия техногенных химических веществ. Следовательно, даже низкодозовое хроническое поступление ксенобиотика (хлороформ) в организм может образовывать большое число свободных кислородных радикалов, что способствует формированию нарушения регуляции клеточной гибели в условиях окислительного стресса. Апоптоз обеспечивает клеточный гомеостаз, способствует клеточной (восстановительной) регенерации, некроз, как известно, обычно ведет к развитию соединительной ткани, то есть к заместительной регенерации в печени.

Таким образом, CD3⁺-лимфоциты, CD4⁺-лимфоциты, CD19⁺-лимфоциты, NKT, IL4, IL6, IL10, IL1 β , bcl-2, LPO, MDA, AOA, GPx, SOD, общие белки, альбумины, печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы, прямой билирубин, АСТ, Annexin V-FITC⁺PI⁻-клетки и Annexin V-FITC⁺PI⁺-клетки следует отнести к индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

Резюме по главе 5. В целом, у детей, проживающих в условиях воздействия химических факторов (экспозиция стронция и хлороформа), поступающих с питьевой водой, имеются значительные сдвиги в системе иммунитета в сравнении с физиологической нормой и контрольными значениями. Характеристика групп обследуемых детей, проживающих в условиях санитарно-гигиенического неблагополучия среды обитания (экспозиция стронция, хлороформа), свидетельствует о тенденции к более низкому уровню здоровья. Очевидно, индуцирующее влияние неблагоприятных средовых химических факторов на организм детей диктует необходимость углубленного изучения состояния иммунологического здоровья детского населения для своевременного выявления нарушений иммунного статуса, характеризующегося, в том числе модификацией апоптотической гибели, что в последующем обеспечит проведение адекватных, обоснованных лечебно-профилактических мероприятий.

Результаты исследования выявили общие **закономерности** нарушения, характерные для всех экспонированных групп: снижение экспрессии CD3-рецептора, отсутствие процессов ранней активации (по критерию экспрессии CD25-рецептора), повышение процессов свободнорадикального окисления и накопление продуктов перекисного окисления липидов, ингибирование апоптоза и переключение на альтернативный механизм клеточной гибели – некроз.

Вместе с тем, в каждой из экспонированных групп имеются свои **особенности** реализации клеточной гибели. При избыточном поступлении щелочно-земельных металлов (на примере стронция): снижение активности антиоксидантных ферментов, дефицит количества эффекторных клеток с цитотоксической активностью и Treg, гиперпродукция цитокинов Th1, ингибирование p53-зависимого и FAS-опосредованного апоптоза, повышенная экспрессия RANKL при снижении активности щелочной фосфатазы и костного изофермента щелочной фосфатазы, уровня остеокальцина, что свидетельствует об активности остеобластогенеза и замедлении процессов формирования костной ткани. При идентификации галогенорганических соединений (на примере хлороформа) выявлено: повышение активности антиоксидантных ферментов,

дефицит эффекторных клеток с хелперной активностью, активация гуморального звена иммунитета, повышенная экспрессия Th2-цитокинов, рост уровня антиапоптозного белка bcl-2, что свидетельствует об ингибировании внутреннего пути апоптоза, снижение синтетической функции печени, наличии явлений холестаза, нарушении целостности гепатоцитов.

К иммунологическим и биохимическим индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (**на примере стронция**) следует отнести: CD3⁺, CD8⁺, CD95⁺, CD4⁺25⁺127⁻, TNFR1, VEGF, RANKL, TNF α , bcl-2, p53, GPx, GST, SOD, LPO, MDA, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин, Annexin V-FITC⁺PI⁻-клетки и Annexin V-FITC⁺PI⁺-клетки. К иммунологическим и биохимическим индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции галогенорганических соединений (**на примере хлороформа**) следует отнести: CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, NKT, bcl-2, IL4, IL6, IL10, IL1 β , АСТ, АОА, GPx, SOD, LPO, MDA, печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы общий белок, альбумины, билирубин прямой, АСТ, Annexin V-FITC⁺PI⁻-клетки и Annexin V-FITC⁺PI⁺-клетки.

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЩЕЛОЧНО–ЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ И ГАЛОГЕНООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

6.1. Оценка генетического статуса детей, проживающих в условиях экспозиции щелочно–земельных металлов (на примере стронция)

Установлены негативные ассоциации полиморфизма генов детоксикации (*CYP1A1 Ile462Val*, *CPOX rs1131857*), характеризующиеся повышенной над группой сравнения распространенностью гетерозиготного варианта гена *CYP1A1* в 2 раза, а также минорного гомозиготного варианта гена *CPOX rs1131857*, при отсутствии патологического аллельного варианта *CC* в группе сравнения (Таблица 6.1.1). Для любой изоформы СУР существует свой спектр метаболизируемых субстратов. В то же время в метаболизме одного поллютанта могут принимать участие различные изоформы СУР с образованием одинаковых или разных метаболитов. Существует перекрывающаяся субстратная специфичность для ферментов семейств генов СУР1, СУР2, СУР3 и СУР4. Изучение полиморфизма гена *CYP1A1* и его связь с риском возникновения онкологических заболеваний привлекли внимание большого ряда исследователей. Индуцибельный фермент СУР1А1 в условиях воздействия ряда вредных факторов в высоких концентрациях обнаруживается во многих клетках организма, в том числе и в клетках иммунной системы. Важнейшей функцией СУР Р450 является активация кислорода. Нарушение баланса в системе детоксикации в условиях развивающегося оксидативного стресса может приводить к усугублению процесса, характеризующегося изменением регуляции клеточной гибели в условиях экспозиции. СРОХ (копропорфириноген оксидаза) представляет собой митохондриальный фермент, кодируемый геном *CPOX*.

Таблица 6.1.1 – Особенности генетического полиморфизма у детей, потребляющих воду с повышенным содержанием стронция (%)

Ген	Генотип	Группа сравнения (n = 100)		Группа наблюдения (n = 200)	
		Абс.	%	Абс.	%
<i>VEGFA</i> <i>G634C</i>	GG	62	62,2	98	49,1
	GC	32	31,8	84	41,9
	CC	6	6,0	18	9,0
	G	78	77,5	140	70,3
	C	22	22,5	60	29,7
<i>FAS</i> <i>C14405T</i>	CC	58	57,1	106	53,9
	CT	42	42,9	80	39,1
	TT	0	0	14	7,0
	C	79	78,5	146	73,2
	T	21	21,5	54	26,8
<i>TNF</i> <i>G4682A</i>	GG	82	82,3	126	63,0
	GA	9	8,7	74	37,0
	AA	9	9,0	0	0
	G	86	86,1	162	80,5
	A	14	13,9	38	19,5
<i>FOXP3</i> <i>T(-3499)C</i>	TT	80	80,1	162	81,0
	TC	20	19,9	26	13,0
	CC	0	0	12	6,0
	T	90	90,1	174	86,5
	C	10	9,9	26	13,5
<i>CPOX</i> <i>rs1131857</i>	AA	69	69,0	148	73,6
	CA	31	31,0	46	23,4
	CC	0	0	6	3,0
	A	84	83,7	172	86,1
	C	16	16,3	28	13,9
<i>CYP1A1</i> <i>Ile462Val</i>	GG	94	94,0	174	87,2
	GA	6	6,0	26	12,8
	AA	0	0	0	0
	G	97	96,5	93	92,6
	A	3	3,5	7	7,4
<i>MMP9</i> <i>Gln279Arg</i>	AA	41	41,1	70	35,0
	GA	45	44,9	86	43,0
	GG	14	14,0	44	22,0
	A	64	63,4	112	55,5
	G	36	36,6	88	44,5
<i>TP53</i> <i>rs17884159</i>	CC	51	50,5	72	36,1
	TC	38	38,5	92	45,9
	TT	11	11,0	36	18,0
	C	70	69,8	118	58,7
	T	30	30,2	82	41,3

Активность фермента проявляется в присутствии молекулярного кислорода. Очевидно, указанные гены определяют, в том числе, образование ROS, работу митохондрий, гепатоцитов и тем самым опосредованно влияют на функциональную активность иммунной системы.

В ходе настоящего исследования установлены негативные ассоциации полиморфизма гена *TP53 rs17884159*, характеризующиеся повышенной над группой сравнения распространенностью гетерозиготного варианта гена в 1,3 раза, что указывает на наличие негативной генетической вариабельности с предрасположенностью к онкологическим и аутоиммунным заболеваниям (Таблицы 6.1.2, 6.1.3). Возможно, полиморфные варианты гена p53 ингибируют клеточную гибель по пути апоптоза, вследствие чего не происходит запрограммированного удаления дефектных клеток, что может запускать патологический опухолевый и опухолеподобный процесс. При этом неблагоприятные аллельные варианты генов системы детоксикации могут существенно усиливать клеточный стресс, который в значительной степени реализуется через экспрессию гена p53.

Статистический анализ SNP-различий гена *TP53 rs17884159* между группами наблюдения и сравнения позволил установить, что «случаи» и «контроли» находятся в равновесии Харди-Вайнберга, позволяющем проанализировать данные с применением мультипликативной модели. В нашем случае различие генотипов *TP53 rs17884159* между выборками достоверно описывается как мультипликативной, так и аддитивной моделями.

Таблица 6.1.2 – SNP – различия гена *TP53 rs17884159* между группами наблюдения и сравнения (мультипликативная модель наследования – тест χ^2 -квадрат, $df = 1$) (экспозиция стронция)

Аллел	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
					значение	95 % ДИ
Аллель С	0,590	0,700	5,28	0,022	0,62	0,41–0,93
Аллель Т	0,410	0,300			1,62	1,07–2,45

Таблица 6.1.3 – SNP – различия гена *TP53 rs17884159* между группами наблюдения и сравнения (аддитивная модель наследования – тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов, $x_i = [0,1,2]$, $df = 1$) (экспозиция стронция)

Генотип	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
					значение	95 % ДИ
Генотип <i>C/C</i>	0,360	0,510	4,88	0,031	0,54	0,31–0,95
Генотип <i>C/T</i>	0,460	0,380			1,39	0,79–2,44
Генотип <i>T/T</i>	0,180	0,110			1,78	0,79–3,98

Установлено, что у детей с генотипом *TT* статистически значимо ($p < 0,05$) снижена экспрессия белка p53 в клетках по сравнению с детьми, имеющими другие генотипы (Таблица 6.1.4).

Таблица 6.1.4 – Генотип гена *TP53* и содержание клеток p53 (%) в крови в различных генетических моделях ($n = 130$, *crude analysis*)

Модель	Генотип	n	Ответ (среднее, %)	Различие средних (95 % ДИ)	p	AIC	BIC
Кодоминантная	<i>C/C</i>	34	0,62 (0,08)	0,00	0,049	69,8	78,3
	<i>C/T</i>	20	0,41 (0,07)	-0,21 (-0,43–0,02)			
	<i>T/T</i>	8	0,27 (0,08)	-0,35 (-0,67 – 0,04)			
Доминантная	<i>C/C</i>	34	0,62 (0,08)	0,00	0,020	68,6	74,9
	<i>C/T-T/T</i>	28	0,37 (0,06)	-0,25 (-0,045 – -0,04)			
Рецессивная	<i>C/C-C/T</i>	54	0,54 (0,06)	0,00	0,087	71,1	77,5
	<i>T/T</i>	8	0,27 (0,08)	-0,27 (-0,58 – 0,03)			
Сверхдоминантная	<i>T/T-C/C</i>	42	0,55 (0,07)	0,00	0,230	72,2	79
	<i>C/T</i>	20	0,41 (0,07)	-0,14 (-0,36 – 0,08)			
Log-аддитивная	-	-	-	-0,18 (-0,33 – 0,04)	0,014	67,9	74,3

Выявленные ассоциации усугубляются тем, что у детей, экспонированных стронцием, в 1,5 раза повышена частота минорной гомозиготы гена *MMP9 Gln279Arg*. Установлено участие MMP в жизненно важных функциях клетки – пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе. Установлено участие MMP в ремоделировании тканей, ангиогенезе, сдерживании роста опухолей.

Установлено, что металлопротеиназы выступают в качестве триггеров MAP-киназного пути, окислительного и нитрозативного стресса, каспаза-опосредованной клеточной смерти. Интерлейкины, интерфероны, фактор некроза опухоли α , фактор роста сосудистого эндотелия, остеокальцин – факторы, принимающие участие в регуляции активности MMP9. Наряду с другими MMP, MMP9 принимает участие в процессе формирования кости остеобластами и / или подавлении ее резорбции остеокластами. Идентифицировано участие MMPs в распаде ряда мембранных рецепторов, повышении содержания FASL, а также в продукции и деактивации хемокинов и цитокинов. Показано, что при перемещении Т-лимфоцитов через базальную мембрану эндотелиальных клеток желатиназе MMP9 отводится значимая роль. Деструкции костной ткани способствуют нейтрофилы посредством высвобождения TNF α , MMP2, MMP9.

Для полиморфизма генов *VEGFA G634C* характерно преобладание как минорной гомозиготы в 1,5 раза, так и гетерозиготного генотипа в 1,3 раза по сравнению с группой сравнения. Стимулируют экспрессию VEGF: эндогенные факторы – IL1, фибробластный ростовой фактор, эпидермальный ростовой фактор; экзогенные факторы – давление и концентрация кислорода, pH и некоторые другие. Общее влияние этих различных факторов заключается в опосредованной через VEGF стимуляции антиапоптотических белков, молекул клеточной адгезии и металлопротеиназ. Установлено, что у здоровых людей с генотипом CC уровень VEGF в сыворотке был выше, чем при наличии генотипов CG и GG. Исследовали влияние полиморфизма -634C/G гена VEGF на риск развития рака предстательной железы, установлена взаимосвязь C-аллеля с риском развития рака предстательной железы. Обнаружено, что аллель -634C достоверно чаще встречался у пациентов с ретинопатией, чем у пациентов без ретинопатии [416]. Очевидно, *VEGFA*, *MMP9*, *CYP1A1*, *CPOX* – гены, продукты которых опосредованно участвуют в иммунном ответе.

Повышена распространенность вариантного аллеля иммунорегуляторных генов *FAS C14405T* и *TNF G4682A* по отношению к группе сравнения в 1,3 и 1,4 раза соответственно. Супрессорная активность регуляторных клеток в большей

степени обуславливается экспрессией гена транскрипционного фактора forkhead box protein 3 (FOXP3), который необходим для нормального формирования и работы регуляторных клеток. Нарушение баланса продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов обуславливает снижение популяции регуляторных Т-клеток при иммунозависимых заболеваниях. В нашем исследовании отмечается повышение продукции TNF α и тенденция повышения IL17.

Анализ результатов изучения генетических показателей позволил идентифицировать наиболее чувствительную в отношении фактора – стронция комбинацию генов: *TP53 rs17884159*, *FAS C14405T*, *TNF G4682A*, *MMP9 Gln279Arg*, *CYP1A1*, *CPOX*, *VEGFA G634C*. Таким образом, *TP53 rs17884159* следует отнести к генетическим индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции щелочно–земельных металлов (на примере стронция).

6.2. Оценка генетического статуса детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа)

Ферменты детоксикации ксенобиотиков обеспечивают общую устойчивость организма к факторам внешней и внутренней среды. Нарушение баланса в метаболических путях за счет изменений активности ферментов, обусловленных генетическим полиморфизмом, может вызывать нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза. На первой стадии детоксикации ксенобиотиков происходит их активация посредством цитохромов Р-450 и ряда других ферментов. Образующиеся при этом промежуточные электрофильные метаболиты обладают токсическими свойствами. С целью достижения эффективной детоксикации химического вещества необходимо равновесие между ферментами первой и второй фазы, тем не менее, в определенных условиях этот баланс может нарушаться. Установлено, что для развития хлороформиндуцированной цитотоксичности печени и почек обязательным является участие цитохрома Р-450 [158]. Исходя из доминирования в клетке

тех или иных изоформ, модифицируется спектр метаболизма хлороформа и, в частности, соотношение продуктов активации и детоксикации. Цитотоксичность хлороформа зависит от скорости его метаболизма [158; 428]. В эксперименте на животных показано, что именно в зависимости от концентрации хлороформа в метаболизм последнего вступают различные изоформы суперсемейства цитохрома P-450 [214]. Различия на уровне экспрессии гена цитохрома P-450 не являются редкостью и определяются генетическими, патофизиологическими особенностями, факторами окружающей среды, одновременным воздействием нескольких ксенобиотиков, в метаболизме которых участвуют одни и те же изоформы ферментов [191].

В процессе генетического анализа исследовали полиморфизм генов ферментов 1-й и 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков как одних из важнейших маркеров в измененных условиях среды обитания (Таблица 6.2.1). Ген цитохрома P-450 *CYP1A1* обеспечивает метаболизм 1 фазы детоксикации и промежуточный обмен многих эндогенных метаболитов; гену *GSTA4* принадлежит главное место в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов. Фермент GST вовлечен во вторую фазу биотрансформации ксенобиотиков. По результатам исследования выявлена достоверно повышенная ($p < 0,05$) в 3,0 раза распространенность патологического аллеля гена цитохрома *CYP1A1 Ile462Val* (Таблицы 6.2.2, 6.2.3), а также в 4,0 раза гетерозиготного генотипа гена глутатион-S-трансферазы *GSTA4 rs3756980* у детей группы наблюдения относительно детей группы сравнения.

Глутатионтрансферазы играют ключевую роль в поддержании резистентности клеток к перекисному окислению жиров, свободным радикалам, алкилированию белков и в предупреждении поломок ДНК [13]. В результате оксидативных процессов образуется большое количество реактивных метаболитов – субстратов для GST, влияющего на индивидуальную чувствительность организма к эндогенным метаболитам оксидативного стресса. Некоторые GST имеют сигнальные функции, ведущие к изменению экспрессии

Таблица 6.2.1 – Особенности генетического полиморфизма у детей, потребляющих воду с повышенным содержанием хлороформа (%)

Ген	Генотип	Группа сравнения (n = 180)		Группа наблюдения (n = 100)	
		Абс.	%	Абс.	%
<i>TNF</i> <i>G4682A</i>	GG	151	83,6	69	69,1
	GA	22	12,4	26	25,7
	AA	7	4,0	5	5,2
	G	162	90,1	82	82,2
	A	18	9,9	18	17,8
<i>FAS</i> <i>C14405T</i>	CC	100	55,3	47	47,1
	CT	71	39,6	47	46,8
	TT	9	5,1	6	6,1
	C	134	74,5	71	70,8
	T	46	25,5	29	29,2
<i>CYP1A1</i> <i>Ile462Val</i>	AA	176	95,8	88	88,1
	GA	4	4,2	12	11,9
	GG	0	0	0	0
	A	176	97,7	94	93,4
	G	4	2,3	6	6,6
<i>MMP9</i> <i>Gln279Arg</i>	CC	129	71,6	44	43,7
	GC	51	28,4	47	47,2
	GG	0	0	9	9,1
	C	155	86,1	67	67,0
	G	25	13,9	33	33,0
<i>GSTA4</i> <i>rs3756980</i>	TT	158	87,6	78	78,0
	TC	7	4,2	16	16,0
	CC	15	8,2	6	6,0
	T	162	90,1	86	85,5
	C	18	9,9	14	14,5
<i>SOD2</i> <i>C14510A</i>	CC	93	51,8	47	47,1
	CA	50	28,1	28	27,9
	AA	37	20,1	25	25,0
	C	119	66,1	61	60,9
	A	61	33,9	39	39,1
<i>ZMP STE24 rs20766</i>	TT	151	84,0	81	80,7
	TC	29	16,0	13	13,2
	CC	0	0	6	6,1
	T	165	91,7	88	87,9
	C	15	8,3	12	12,1
<i>TERT</i> <i>C309G</i>	CC	86	47,7	3	3,1
	CG	51	28,2	97	96,9
	GG	43	24,1	0	0
	C	112	62,0	52	51,5
	G	68	38,0	48	48,5

Таблица 6.2.2 – SNP – различия гена *CYP1A1 Ile462Val* между группами наблюдения и сравнения (мультипликативная модель наследования – тест χ^2 -квадрат, $df = 1$) (экспозиция хлороформа)

Аллель	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
					значение	95% ДИ
Аллель <i>A</i>	0,940	0,980	4,17	0,040	0,32	0,10–1,01
Аллель <i>G</i>	0,060	0,020			3,13	0,99–9,87

Таблица 6.2.3 – SNP – различия гена *CYP1A1 Ile462Val* между группами наблюдения и сравнения (аддитивная модель наследования – тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов, $\chi^2 = [0,1,2]$, $df = 1$) (экспозиция хлороформа)

Генотип	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
					значение	95 % ДИ
Генотип <i>A / A</i>	0,880	0,960	4,35	0,040	0,31	0,10–0,98
Генотип <i>A / G</i>	0,120	0,040			3,27	1,02–10,52
Генотип <i>G / G</i>	0,000	0,000			1,00	0,02–50,89

других генов. Так, *GSTP1* регулирует активность Jun N-terminal kinase, а апоптозиндуцирующая киназа ASK1 регулируется *GSTM1* [427]. Частичная перекрестная субстратная специфичность некоторых глутатион-S-трансфераз, а именно, *GSTM*, *GSTP* и *GSTA*, гипотетически предполагают некоторую избыточную протективную активность ферментов глутатионового пула [13]. Четко обозначенных и общепринятых критериев, разграничивающих GST, нет. Однако к особенностям биохимии *GSTA* относятся их более высокая по сравнению с другими классами активность в отношении продуктов POL.

Полиморфизм генов *GST*, контролирующих их синтез, может приводить к повышению либо к снижению активности соответствующих ферментов, в результате провоцируя дисбаланс между ферментами I и II фаз детоксикации варианта, таким образом, принимая участие в модификации апоптогенного сигналинга [51].

Повышена распространенность гетерозиготного варианта гена теломеразы *TERT C309G* по отношению к группе сравнения. Установлено, что непосредственно *TERT* участвует в транскрипции генов «Wnt- β -catenin»-сигнальной системы, способной активировать пролиферацию клеток. Для

полиморфизма генов *ZMP STE24 rs20766* характерно снижение гетерозиготного генотипа в 1,2 раза по сравнению с группой сравнения. *ZMP STE* участвует в созревании ламина А, одного из важнейших компонентов ядерной оболочки. Известно, что нарушение образования ламина может вызвать развитие ряда иммуноассоциированных заболеваний. Для полиморфизма генов *TNF G4682A* характерно преобладание гетерозиготного генотипа в 2,2 раза по сравнению с группой сравнения.

Аллельный полиморфизм гена *MMP9 Gln279Arg* характеризуется наличием достоверных различий группы наблюдения с группой сравнения (повышение распространенности мутантного аллеля *MMP9 Gln279Arg* в 2,5 раза) (Таблицы 6.2.4, 6.2.5).

Таблица 6.2.4 – SNP – различия гена *MMP9 Gln279Arg* между группами наблюдения и сравнения (мультипликативная модель наследования – тест χ^2 -квадрат, $df=1$) (экспозиция хлороформа)

Аллель	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
					значение	95 % ДИ
Аллель C	0,675	0,860	19,18	<0,001	0,34	0,21–0,56
Аллель G	0,325	0,140			2,96	1,80–4,86

Повышена распространенность вариантного гомозиготного генотипа гена *SOD2 C14510A* по отношению к группе сравнения. Причем наблюдается достоверная связь содержания ключевых ферментов и ответственных за них кандидатных генов ($p < 0,05$).

Таблица 6.2.5 – SNP – различия гена *MMP9 Gln279Arg* между группами наблюдения и сравнения (аддитивная модель наследования – тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов, $xi = [0,1,2]$, $df=1$) (экспозиция хлороформа)

Генотип	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
					значение	95 % ДИ
Генотип C/C	0,440	0,720	20,21	<0,001	0,31	0,17–0,55
Генотип C/G	0,470	0,280			2,28	1,27–4,10
Генотип G/G	0,090	0,000			20,87	1,20–363,65

Недостаток SOD в организме приводит к снижению защитных функций организма и повреждению клеток свободными радикалами. Между тем

повышенная активность SOD способна спровоцировать избыток в организме H_2O_2 и, как следствие, привести к токсическому повреждению клеток. Активность *SOD2* может отличаться до 56 раз у носителей разных аллельных вариантов. У носителей минорных аллельных вариантов активность фермента выше на 33 % по сравнению с носителями СС-варианта [51]. SOD, инактивирующий супероксидный радикал, может предотвращать активационную индукцию синтеза матриксных MMP. Было показано, что воздействие ряда MMP стимулируют появление ROS, провоцируя дестабилизацию генома. Следовательно, *GSTA4*, *ZMP*, *TERT*, *MMP9*, *CYP1A1*, *SOD2* – гены, продукты которых опосредованно участвуют в иммунном ответе.

Углубленное генетическое обследование детского контингента, проживающего в условиях контаминации питьевой воды хлороформом, выявило генетические нарушения детоксикации контаминантов, ассоциированные с полиморфизмом генов детоксикации и оксигенации *CYP1A1 Ile462Val* (цитохром P-450), *GSTA4 rs3756980* (глутатион-S-трансфераза), *SOD2 C14510A* (супероксиддисмутаза), *ZMP STE24 rs20766* (цинк-металлопептидаза), *TERT C309G* (ген обратной теломеразной транскриптазы), *MMP9 Gln279Arg* (металлопротеиназа), характеризующих специфические различия между анализируемыми группами.

Таким образом, *CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg* следует отнести к генетическим индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

Обобщение результатов углубленных исследований позволило выявить у обследуемых детей общие закономерности и особенности нарушения клеточной гибели, обусловленные приоритетными компонентами природного (на примере стронция) и техногенного (на примере хлороформа) происхождения (Таблица 6.2.6).

Таблица 6.2.6 – Общие закономерности и особенности нарушения клеточной гибели в условиях негативного воздействия химических факторов

Показатель и вектор его направления	Стронций в питьевой воде	Хлороформ в питьевой воде
1	2	3
Территориальные особенности и особенности микрокомпонентного состава биосред детей		
Содержание приоритетного химического вещества в воде хозяйственно-питьевого назначения	Максимальная концентрация 8,4 мг/л (1,2 ПДК)	Сумма отношений концентраций галогенорганических соединений к ПДК превышена в 2,5 раза
В крови приоритетное химическое вещество	Повышение в 1,6 раза относительно референтных значений	Идентифицированы
Нарушения здоровья, ассоциированные с типом клеточной гибели, их причинно-следственная связь с приоритетным химическим фактором		
Повышение заболеваемости, ассоциированной с типом клеточной гибели, относительно территории сравнения	В 2 раза болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани	В 4,7 раза заболеваний гепатобилиарного тракта
Оценка риска формирования иммуноассоциированной патологии	<i>HI</i> до 2,18	<i>HI</i> до 1,54 <i>HQ</i> до 1,28
Повышение частоты заболеваний, в патогенезе которых ключевая роль принадлежит нарушению клеточной гибели	В 6 раз патологии опорно-двигательного аппарата (относительно группы сравнения)	В 2 раза болезней органов пищеварения (относительно группы сравнения)
Отклонение функциональных показателей относительно группы сравнения	Несоответствие костного возраста паспортному в 1,25 раза чаще; несоответствие коэффициента оссификации в 3,2 раза чаще	В 92 % случаев функциональных нарушений печени и желчного пузыря
Закономерности изменения клеточной гибели у детей, проживающих на территориях с различной степенью загрязнения питьевой воды компонентами природного происхождения и техногенного происхождения		
Снижение CD3 ⁺	В 1,2 раз	В 1,3 раза
CD25 ⁺	В диапазоне контрольных значений	
Повышение LPO	В 1,7 раза	В 1,4 раза
Повышение MDA	В 1,4 раза	В 1,2 раза
Снижение Annexin V-FITC+PI-	В 2,1 раза	В 1,7 раза
Повышение Annexin V-FITC+PI+	В 1,3 раза	В 2,4 раза

Окончание Таблицы 6.2.6.

1	2	3
Особенности изменения клеточной гибели у детей, проживающих на территориях с различной степенью загрязнения питьевой воды компонентами природного происхождения и техногенного происхождения		
Субпопуляционный дисбаланс	Снижение CD8 ⁺ в 1,3 раза	Снижение CD4 ⁺ в 1,2 раза
	Снижение CD95 ⁺ в 1,4 раза	Повышение CD19 ⁺ в 1,2 раза
	Снижение Treg в 1,3 раза	Повышение CD16 ⁺ CD56 ⁺ в 1,2 раза
Экспрессия TNFRI, %	Снижение в 4 раза	-
Дисбаланс внутриклеточных белков	Снижение bcl-2 в 4 раза	Повышение bcl-2 в 1,2 раза
	Снижение p53 в 2 раза	
Цитокиновый дисбаланс	Повышение TNF в 2,8 раза	Повышение IL1 β в 1,4 раза
	Снижение VEGF в 1,2 раза	Повышение IL4 в 2,2 раза Повышение IL6 в 4,3 раза Тенденция повышения IL10
Антиоксидантная активность плазмы	В диапазоне контрольных величин	Повышение в 1,4 раза
Активность GST	Снижение в 1,5 раза	В диапазоне контрольных величин
Активность GPx	Снижение в 1,2 раза	Повышение в 2,2 раза
Активность SOD	Снижение в 1,3 раза	Повышение в 1,5 раза
Показатели костного метаболизма / печеночные пробы	Повышение RANKL в 1,8 раза	Повышение билирубина прямого в 4 раза
	Снижение активности костного изофермента щелочной фосфатазы в 1,3 раза	Повышение активности печеночной фракции изоферментов щелочной фосфатазы в 1,2 раза
	Снижение остеокальцина в 1,1 раза	Снижение общего белка в 1,1 раза
	Снижение активности щелочной фосфатазы в 1,1 раза	Снижение альбуминов в 1,1 раза Повышение активности АСТ в 1,2 раза
Генетический полиморфизм	<i>TP53 rs17884159</i> генотип <i>TT</i> – снижение экспрессии p53	<i>CYP1A1 Ile462Val</i> <i>MMP9 Gln279Arg</i>

Резюме по главе 6. Установлено, что условия экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция) и галогенорганических соединений (на примере хлороформа) достоверно реализуют полиморфизмы генов. Анализ результатов изучения индикаторных генетических показателей позволил идентифицировать наиболее чувствительную в отношении изучаемых факторов

(стронций, хлороформ) и контингентов (детское население) комбинацию генов: гены цитохрома, *CPOX rs1131857*, васкулярно-эндотелиального фактора роста (*VEGFA G634C*), фактора некроза опухоли, *TP53 rs17884159*, *MMP9 Gln279Arg*, *SOD2 C14510A*, *FAS C14405T*, *TNF G4682A*, *ZMP STE24 rs20766*, *TERT C309G*, *GSTA4 rs3756980*, а также их ассоциацию с иммунологическими нарушениями.

Таким образом, *TP53 rs17884159* следует отнести к генетическим индикаторным показателям клеточной гибели в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция); *MMP9 Gln279Arg*, *CYP1A1 Ile462Val* – в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

ГЛАВА 7. ВЕРИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ И ИНДИКАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НАРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННЫХ СВЯЗЕЙ

На основании анализа состояния качества окружающей среды, особенностей формирования микрокомпонентного состава биологических сред и результатов углубленного клинико-функционального, инструментального и лабораторного обследования детского населения, проживающего в условиях воздействия химических факторов природного и техногенного происхождения, поступающих с питьевой водой, с целью уточнения и обоснования патогенетических механизмов развития заболеваний, ассоциированных с типом клеточной смерти, были оценены причинно-следственные связи.

7.1. Оценка причинно-следственных связей формирования нарушений клеточной гибели, обусловленных щелочно-земельными металлами (на примере стронция)

В группе наблюдения и сравнения был проведен анализ зависимости концентрации стронция в крови – индикаторный показатель: показатели иммунограммы, биохимические показатели с последующей интерпретацией полученных результатов (Таблицы 7.1.1–7.1.5, Рисунки 7.1.1–7.1.6).

Углубленный анализ индивидуальных значений иммунологических и биохимических индикаторных показателей нарушения клеточной гибели позволил рассчитать уровень относительного риска негативных тенденций

Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки (стронций в крови) с повышением образования LPO у детей группы наблюдения ($OR = 4,62$; 95% ДИ = 2,94-7,26; $p < 0,05$) (Таблица 7.1.1).

Таблица 7.1.1 – Показатели причинно-следственной связи нарушений индикаторных показателей клеточной гибели, окислительно-восстановительных процессов и метаболизма костной ткани с изучаемым фактором риска

Показатель	Направление изменения показателя	RR [95% ДИ]	OR [95% ДИ]
Индикаторные показатели окислительно-восстановительных процессов			
Окислительные процессы			
LPO $p < 0,05$	Повышение	2,93 [2,07-4,13]	4,62 [2,94-7,26]
MDA $p < 0,05$	Повышение	3,29 [2,52-4,29]	9,80 [6,34-15,16]
Антиоксидантные процессы			
GST $p < 0,05$	Понижение	5,10 [3,12-8,35]	7,93 [4,48-14,01]
GPx $p < 0,05$	Понижение	4,48 [3,06-6,57]	8,91 [5,47-14,51]
SOD $p < 0,05$	Понижение	1,95 [1,56-2,4]	3,53 [2,38-5,22]
Индикаторные показатели костного метаболизма			
Биохимические параметры крови в выявлении дефицита костной массы			
Ионизированный Ca	Повышение	1,48 [1,16-1,87]	1,92 [1,30-2,82]
Промоутер кальцификации			
RANKL $p < 0,05$	Повышение	1,54 [1,33-1,78]	3,31 [2,17-5,04]
Маркеры костной резорбции			
Тартрат-резистентная кислая фосфатаза	Повышение	3,76 [1,95-7,25]	4,39 [2,16-8,95]
Индикаторные показатели нарушения клеточной гибели			
CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	Понижение	1,49 [0,60-3,65]	1,51 [0,59-3,866]
p53, % $p < 0,05$	Понижение	1,71 [1,49-1,96]	9,47 [5,60-16,04]
TNF α , пг/см ³ $p < 0,05$	Повышение	1,73 [0,67-4,48]	1,77 [0,66-4,75]
AnnV-FITC ⁺ PI, % $p < 0,05$	Понижение	4,68 [3,26-6,73]	11,04 [6,8-17,79]

Переокисление липидов (одно из последствий свободнорадикального окисления) следует рассматривать как нормальный физиологический процесс, однако способный приобретать черты патологического процесса в определенных условиях. Интенсивность POL может служить одним из показателей наступления адаптации / дезадаптации в условиях стресса.

Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с образованием MDA, одного из информативных показателей, характеризующих интенсивность процессов свободнорадикального окисления в мембране клетки, у обследуемых группы наблюдения ($OR = 9,8$; 95% ДИ = 6,3-15,2; $p < 0,05$); с изменением

активности GST, GPx и SOD у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция ($OR = 3,5-8,9$; 95% ДИ = 2,3-14,5; $p < 0,05$). Установлена связь гаптенной нагрузки с повышением ионизированного кальция и уровня RANKL, свидетельствующих о возможных нарушениях состояния костной ткани, у детей, проживающих на территории наблюдения ($OR = 3,5-8,9$; 95% ДИ = 1,3-5,0; $p < 0,05$); с дефицитом уровня регуляторных клеток, p53, TNF α и Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток, ассоциированного со снижением передачи апоптотического сигналинга, у детей группы наблюдения ($OR = 1,5-11,0$; 95% ДИ = 0,6-17,8; $p < 0,05$) (Таблица 7.1.1).

Для установления причинно-следственных связей в нарушении формирования костной ткани и работы иммунной системы у обследуемых детей проведена разработка математических моделей и многоступенчатое вычисление показателя отношения шансов. Для выявления наличия и патогенетического характера связей индикаторных иммунологических, биохимических показателей с параметрами контаминации биосред выполнено статистическое моделирование на базе построения моделей логистической регрессии (Таблица 7.1.2). В целом в условиях избыточного поступления стронция в кровь отмечаются: оксидантные процессы на уровне клеточной мембраны, усугубляющие скорость резорбции костной ткани (повышение уровня MDA, $F = 35,1$; $R^2 = 0,30$); усиленная мобилизация кальция из костной ткани, в результате протекающих в организме остеорезорбтивных процессов (повышение ионизированного кальция в крови, $F = 8$; $R^2 = 0,17$); ингибирование остеосинтеза (снижение активности костной щелочной фосфатазы, $F = 38,7$; $R^2 = 0,44$); нарушение межклеточного взаимодействия (повышение экспрессии IL17 ($R^2 = 0,68$; $F = 108$) и снижение уровня VEGF ($R^2 = 0,55$; $F = 54,6$)); снижение количества клеток, осуществляющих супрессорные функции (снижение количества Treg ($R^2 = 0,25$; $F = 14,15$)). Установлено, что Treg, координирующие силу и длительность иммунного ответа через регуляцию функции Т-эффекторных клеток, характеризуются высокой чувствительностью и способностью изменять вектор направленности ответной иммунной реакции при концентрациях стронция в

крови на уровне реперных значений. Реперный уровень стронция по критерию снижения уровня регуляторных клеток составил 0,017 мг/дм³.

Таблица 7.1.2 – Параметры моделей зависимости «химическое вещество в крови – вероятность отклонения индикаторного показателя» у детей, экспонированных стронцием, поступающего с питьевой водой

Химический фактор	Показатель	Направление изменения показателя	b_0	b_1	R^2	F	p
Стронций в крови	Ионизированный Са, ммоль/дм ³	Повышение	0,79	6,21	0,17	7,89	0,009
	MDA, мкмоль/дм ³	Повышение	0,52	9,34	0,30	35,06	<0,001
	Костный изофермент щелочной фосфатазы, Е/дм ³	Снижение	-2,20	18,34	0,44	38,69	0,001
	VEGF, пг/см ³	Снижение	-0,91	2143,7	0,55	54,6	<0,001
	Treg, %	Снижение	0,49	0,42	0,25	14,15	0,001
	IL17, пг/см ³	Повышение	-4,55	18,58	0,68	108	0,001

Использование регрессионного анализа выявило снижение экспрессии Treg ($R^2 = 0,18$; $F = 5,5$; $p < 0,05$), CD95⁺ ($F = 4,41$; $R^2 = 0,14$; $p < 0,05$), TNFR1 ($F = 15,1$; $R^2 = 0,12$; $p < 0,05$), а также увеличение концентрации TNF α ($R^2 = 0,19$; $F = 5,9$; $p < 0,05$) при повышении в крови стронция (Рисунки 7.1.1, 7.1.2, Таблица 7.1.3).

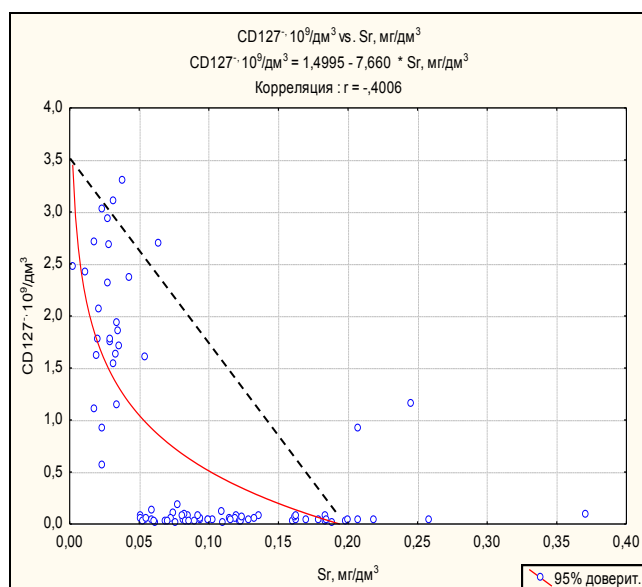


Рисунок 7.1.1 – Зависимость количества Treg от концентрации стронция в крови ($p < 0,05$)

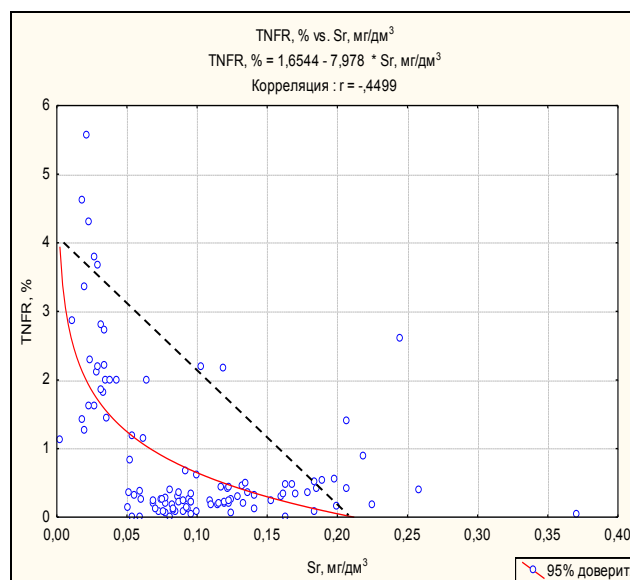


Рисунок 7.1.2 – Зависимость количества TNFR1 от концентрации стронция в крови ($p < 0,05$)

Таблица 7.1.3 – Параметры моделей зависимости «химический фактор в крови – индикаторный показатель нарушения клеточной гибели» у детей, экспонированных стронцием, поступающего с питьевой водой

Химический фактор	Индикаторный показатель	Направление изменения показателя	b_0	<i>Std. error</i>	<i>Beta</i>	<i>p</i>
Стронций в крови	TNFRI, %	Снижение	-0,83	0,10	-0,35	0,010
	FAS, $10^9/\text{дм}^3$	Снижение	1,71	0,12	-0,37	< 0,001
	Treg, %	Снижение	0,49	0,12	-0,42	< 0,001
	TNF α , пкг/мл	Повышение	0,28	0,09	0,43	< 0,001

Примечание: *Std. error* – стандартная ошибка; *Beta* – стандартизированный коэффициент регрессии

Полученные результаты доказывают, что при повышенной концентрации стронция в крови ингибируется рецепторопосредованный апоптоз. Результаты математического моделирования позволили выявить вероятность отклонения от нормы индикаторных показателей клеточной гибели у детского населения, экспонированного стронцием, поступающего с питьевой водой (Таблица 7.1.4).

Таблица 7.1.4 – Параметры моделей зависимости «химическое вещество в крови – вероятность отклонения индикаторного показателя клеточной гибели» у детей, экспонированных стронцием, поступающего с питьевой водой

Химический фактор	Индикаторный показатель клеточной гибели	Направление изменения показателя	b_0	b_1	R^2	F	p
1	2	3	4	5	6	7	8
Стронций в крови	TNFRI, %	Снижение	1,87	-23,35	0,68	497,10	0,001
	TNF α , пг/см 3	Повышение	2,01	-11,96	0,54	317,14	0,001
	p53, %	Снижение	1,34	-23,77	0,70	638,93	0,001
	Treg, %	Снижение	0,32	-3,55	0,68	596,61	0,001
	Treg, $10^9/\text{дм}^3$	Снижение	0,87	6,64	0,45	183,18	< 0,001
	IL17, пг/см 3	Повышение	0,49	-2,25	0,30	110,33	< 0,001
	CD95, %	Снижение	0,89	-14,02	0,80	2305	< 0,001
	CD95, $10^9/\text{дм}^3$	Снижение	2,00	-8,04	0,35	124,33	< 0,001
	ba χ , %	Повышение	1,23	-5,56	0,42	69,56	< 0,001
	VEGF, пг/см 3	Снижение	-0,11	-7,78	0,80	531,55	< 0,001
	Ampli-sRANKL, пг/см 3	Повышение	0,973	-8,67	0,80	1741	0,001
	AnnV-FITC $^+$ PI $^-$, %	Снижение	0,41	-1,42	0,10	12,94	0,001
	AnnV-FITC $^+$ PI $^+$, %	Повышение	0,19	3,02	0,80	1131	0,001

Реципрокные взаимоотношения между субпопуляциями Treg и Th17 подтверждаются разнонаправленной вероятностью отклонения от нормы содержания Treg и экспрессии IL17. Экспансия Th17-клеток играет ведущую роль в развитии широкого спектра иммуноассоциированных заболеваний. Арилуглеводородный рецептор, экспрессирующийся как в Treg, так и в Th17, может оказывать разное действие на дифференцировку этих клеток в зависимости от лиганда и его дозовой нагрузки [257; 341]. Важно, что апоптотические тельца на ранних этапах апоптоза покрыты элементами PS-содержащей внешней мембраны, а на поздних этапах – элементами эндоплазматических мембран. И если антигенная презентация ранних апоптотических телец вызывает образование иммунорегуляторных T-клеток (Treg), то контакт поздних апоптотических телец с дендритными клетками вызывает образование Th-17–клеток [71].

Анализ полученных результатов выявил противоположные вероятности отклонения от нормы для TNF α и TNFR1, что свидетельствует о дисбаланс в системе TNF α – TNFR1 и возможной перестройке механизма регуляции клеточной смерти в условиях воздействия стронция. Вероятность повышения уровня TNF α при воздействии анализируемого щелочно–земельного металла можно объяснить тем, что в условиях снижения способности к запуску апоптоза стимуляция лигандом TNF α приводит к переключению на альтернативный механизм клеточной смерти – некрозу, что наблюдается в настоящем исследовании. В системе «TNF α – TNFR1» в диапазоне стронция в крови от 0,0171 до 0,371 мг /дм³ происходит повышение уровня экспрессии лиганда и одновременно снижение экспрессии рецептора.

В физиологических условиях bax находится в цитоплазме. В ответ на различные проапоптотические стимулы bax перемещается на внешнюю мембрану митохондрий. Избыток цитозольного bax инициирует раскрытие мембранных каналов митохондрий, выход цитохрома c в цитозоль и активацию каспазного каскада. Однако чрезмерная экспрессия bax приводит к некротической гибели клетки, что подтверждается полученными результатами.

Ассоциация выявленных нарушений с измененным полиморфизмом гена p53 усугубляет комбинированный антиапоптотический эффект сочетания гаптенной нагрузки с вариантной наследственностью.

Аннексиновый тест – интегративный количественный показатель интенсивности клеточной гибели, суммирующий отдельные изменения молекул-регуляторов апоптоза и некроза. Прогнозируется вероятность снижения показателя Annexin V-FITC⁺PI⁻, характеризующего ранние изменения в клетке при апоптозе – экстернализация фосфатидилсерина – при повышении концентрации стронция в крови. Установлена вероятность повышения количества Annexin V-FITC⁺PI⁺-маркера клеточной гибели, определяющего нарушение целостности мембраны, в условиях повышения экспозиции стронция (Рисунки 7.1.3, 7.1.4).

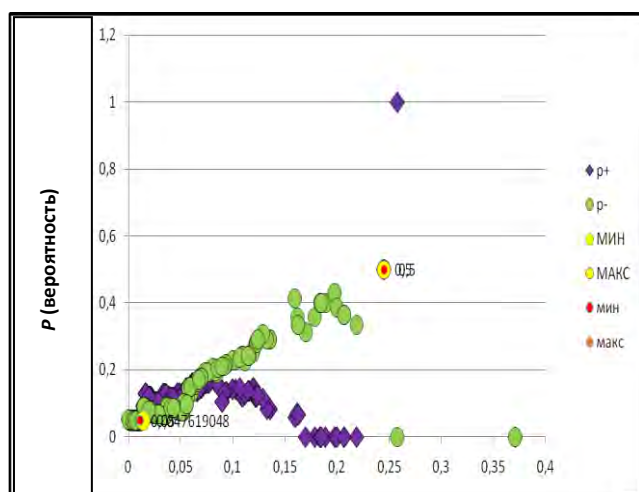


Рисунок 7.1.3 – Вероятность отклонения от нормы количества CD95⁺-клеток в зависимости от концентрации стронция в крови ($p < 0,05$)

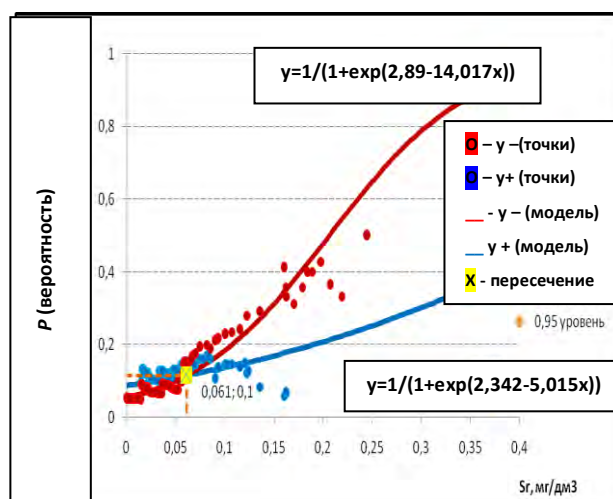


Рисунок 7.1.4 – Вероятность отклонения от нормы количества CD95⁺-клеток в зависимости от концентрации стронция в крови ($p < 0,05$) (сглаженный вариант)

На основе научной оценки причинно-следственных связей и построения математических моделей обоснованы индикаторные показатели клеточной гибели и патогенетические механизмы апоптозассоциированных нарушений при избыточном поступлении в организм стронция с питьевой водой. Реперный уровень стронция, в качестве лимитирующего по критерию снижения содержания Treg лимфоцитов, составил 0,0171 мг/дм³.

Механизмы реализации клеточной гибели на уровне лимфоцита в условиях избыточного поступления в организм стронция представлены на Рисунке 7.1.5 в виде гипотетической схемы.

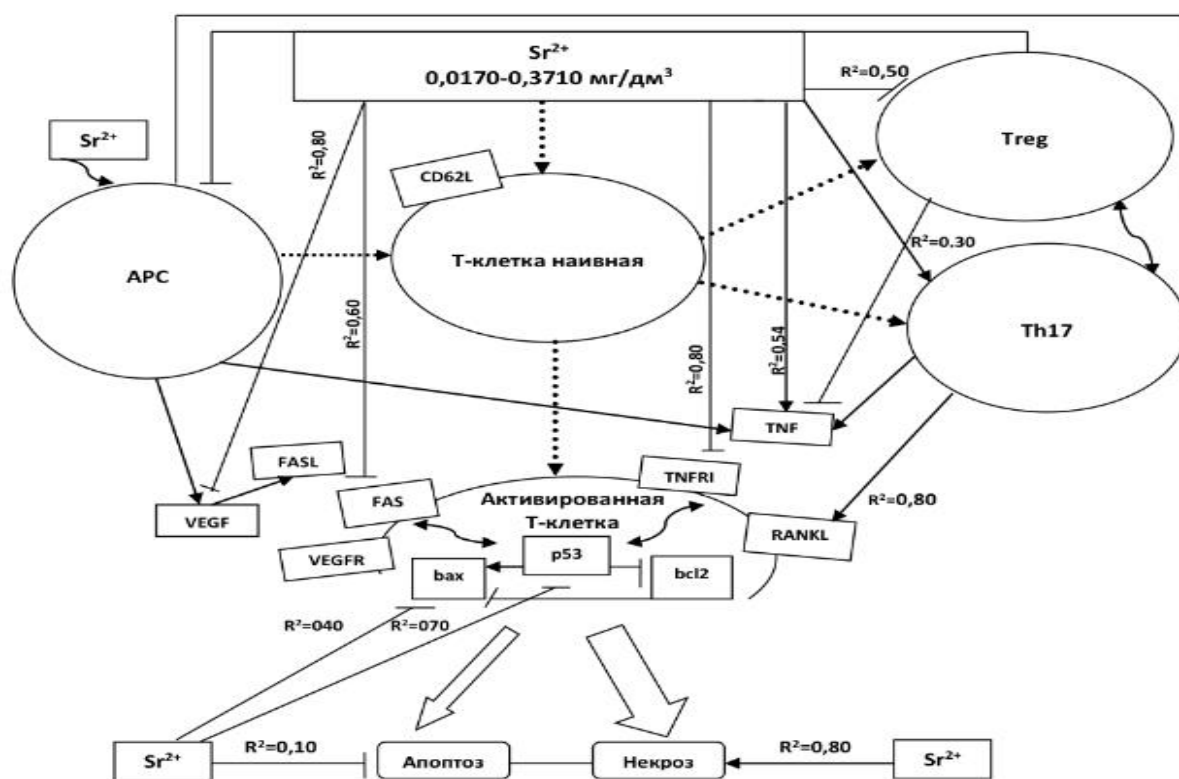


Рисунок 7.1.5 – Гипотетическая схема клеточной гибели в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция) (APC – антигенпрезентирующая клетка, \rightarrow – активация эффекта; \top – ингибирование эффекта)

При уровне концентрации стронция в крови по критерию снижения: до $0,061$ и до $0,058$ мг/дм³ для $CD95^+$ (по относительной и абсолютной величине), для Treg (по относительной и абсолютной величине) до $0,023$ и до $0,017$ мг/дм³, для процентного содержания TNFRI до $0,068$ мг/дм³, p53 – до $0,033$ мг/дм³ и Annexin V-FITC⁺PI⁻ – до $0,052$ мг/дм³; по критерию повышения: для IL17 – до $0,022$ мг/дм³, для TNF α – до $0,068$ мг/дм³; риск формирования нарушений клеточной гибели в целом по выборке отмечается как допустимый (малый риск). В то же время, начиная с уровня содержания стронция в крови $0,06$ мг/дм³ по критерию снижения регуляторных клеток, риск формирования нарушений клеточной гибели может достигать недопустимых значений (очень высокий риск) (Таблица 7.1.5).

Таблица 7.1.5 – Вероятность изменения индикаторных показателей клеточной гибели при различных диапазонах содержания стронция в крови

Химическое вещество в крови, мг/дм ³				
Индикаторный показатель	Малый риск	Средний риск	Высокий риск	Очень высокий риск
Стронций	0,062 -0,080	0,085-0,150	0,155-0,250	0,255-0,371
CD95 ⁺ , %	19,00-17,12	17,13-16,40	16,37-15,57	15,52-14,55
Стронций	0,059 -0,095	0,100-0,175	0,180-0,260	0,265-0,371
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,45-0,70	0,45-0,40	0,39-0,36	0,35-0,32
Стронций	0,069 -0,075	0,077-0,090	0,095-0,150	0,155-0,197
TNFR1, %	1,50-1,15	1,10-0,89	0,84-0,45	0,43-0,25
Стронций	0,024 -0,077	0,080-0,180	0,190-0,250	0,255-0,371
Treg, %	2,04-1,97	1,96-1,87	1,86-1,80	1,79-1,68
Стронций	0,018 -0,025	0,030-0,055	0,059-0,020	0,207-0,371
Treg, 10 ⁹ /дм ³	0,030-0,041	0,028-0,018	0,017-0,010	< 0,010
Стронций	0,034 -0,055	0,056-0,090	0,095-0,15	0,155-0,197
p53, %	1,50-1,88	1,87-1,04	0,99-0,55	0,52-0,33
Стронций	0,023 -0,060	0,070-0,090	0,095-0,200	0,250-0,371
IL17, пг/см ³	1,00-1,14	1,15-1,17	1,18-1,26	1,31-1,42
Стронций	0,069 -0,090	0,095-0,150	0,160-0,250	0,255-0,371
TNFα, пг/см ³	1,00-1,60	1,61-1,85	1,87-2,29	2,43-3,00
Стронций	0,069 -0,075	0,077-0,112	0,120-0,155	0,160-0,219
RANKL, пг/см ³	до 11,6	12,0-15,0	15,1-17,0	17,1-22
Стронций	0,053 -0,100	0,150-0,200	0,250-0,300	0,310-0,371
AnnV-FITC ⁺ PI ⁻ , %	2,00-1,54	1,50-1,43	1,42-1,36	1,35-1,30
Стронций	0,050-0,090	0,095- 0,180	0,190-0,220	0,230-0,371
AnnV-FITC ⁺ PI ⁺ , %	7,01-7,17	7,2-7,55	7,59-7,73	7,77-8,42

Основные патогенетические звенья иммунных нарушений и нарушение равновесия в процессе ремоделирования костной ткани с преобладанием темпа резорбции кости, ассоциированных с воздействием стронция, представлены на Рисунке 7.1.6.

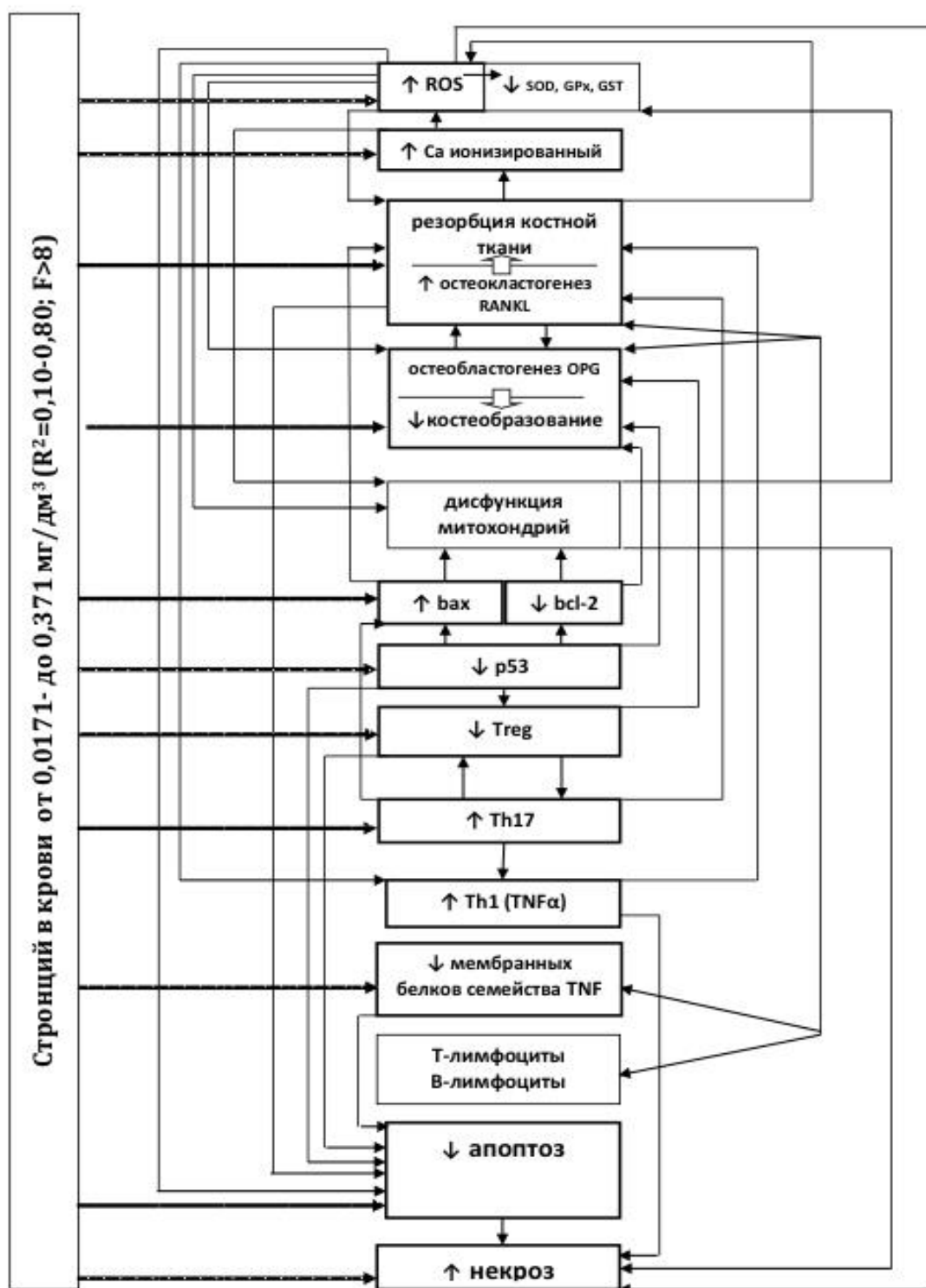


Рисунок 7.1.6 – Основные патогенетические звенья иммунных нарушений и ремоделирования костной ткани, ассоциированных с воздействием щелочно-земельных металлов (на примере стронция). ↓ или ↑ – направление изменение показателя

Таким образом, в условиях пероральной экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция) ведущими факторами формирования нарушения равновесия в процессе ремоделирования костной ткани с преобладанием темпа резорбции кости и иммунных нарушений у детей являются: повышение интенсивности резорбтивных процессов в скелете и снижение остеосинтеза (индикаторные показатели: RANKL, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин), снижение передачи апоптогенного сигнала, опосредованного членами семейства TNF (индикаторные показатели: FAS, TNFRI, TNF α), ингибирование внутриклеточной трансдукции сигнала клеточной гибели (индикаторные показатели: p53, bcl-2), дисбаланс системы Treg / Th17 (индикаторные показатели: регуляторные T-клетки), дефицит компонентов VEGF-сигнальной системы (индикаторные показатели: VEGF), ингибирование клеточной гибели по пути апоптоза и активация по механизму некроза (индикаторные показатели: Annexin V-FITC⁺PI⁻-клетки, Annexin V-FITC⁺PI⁺-клетки), активация процессов свободнорадикального окисления, накопление продуктов пероксидации, перенапряжение и истощение ресурсов антиоксидантной защиты (индикаторные показатели: LPO, MDA, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, глутатионтрансфераза).

7.2. Оценка причинно-следственных связей формирования нарушений клеточной гибели, обусловленных галогенорганическими соединениями (на примере хлороформа)

Для обоснования индикаторных показателей клеточной гибели проводили моделирование зависимостей вероятности отклонения лабораторного показателя ответа относительно физиологической нормы в зависимости от концентрации химического вещества техногенного происхождения в крови (галогенорганические соединения).

Анализ вероятностных связей между содержанием в биосредах детей хлороформа и показателями ответных реакций продемонстрировал, что

установленные закономерности проявляются при идентификации хлороформа в крови на уровне от 0,00001 до 0,2300 мг/дм³ (Таблица 7.2.1, Приложение В).

Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с повышением образования LPO у детей группы наблюдения ($OR = 1,19$; 95% ДИ = 0,84-1,73; $p < 0,05$). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с образованием MDA у обследуемых детей, потребляющих гиперхлорированную воду ($OR = 16,67$; 95% ДИ = 8,71-31,91; $p < 0,05$). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с повышением активности GST, GPx и SOD у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием хлороформа ($OR = 2,3-6,6$; 95% ДИ = 1,5-14,1; $p < 0,05$). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с повышением АОА у детей группы наблюдения ($OR = 3,01$; 95% ДИ = 2,0-4,6; $p < 0,05$).

Повышенное содержание галогенорганических соединений в биосредах детей оказывает негативное воздействие на гепатобилиарную систему, патогенетически связанную с иммунной системой. Активность печеночной фракции щелочной фосфатазы идентифицируется при патологических состояниях печени, которые сопровождаются явлением холестаза. Повышение активности печеночной фракции изоферментов щелочной фосфатазы при холестазе обусловлено индукцией фермента *de novo* в клетках печени, примыкающих к желчным протокам. Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с повышением активности АСТ и печеночной фракции изоферментов щелочной фосфатазы у детей, потребляющих гиперхлорированную воду ($OR = 6,3-13,3$; 95% ДИ = 3,6-26,1; $p < 0,05$). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с ингибированием синтетической функции гепатоцитов у детей, потребляющих ненормированную воду по содержанию хлороформа ($OR = 3,6-4,1$; 95% ДИ = 1,5-10,9; $p < 0,05$).

Таблица 7.2.1 – Показатели причинно-следственной связи нарушений интегральных показателей окислительно-восстановительных процессов, печеночного профиля и клеточной гибели с изучаемым фактором риска

Показатель	Направление изменения показателя	RR [95% ДИ]	OR [95% ДИ]
Индикаторные показатели окислительно-восстановительных процессов			
Окислительные процессы			
LPO ^{p < 0,05}	Повышение	1,12 [0,90-1,38]	1,21 [0,84-1,73]
MDA ^{p < 0,05}	Повышение	9,33 [5,18-16,81]	16,67 [8,71-31,91]
Антиоксидантные процессы			
GST	Повышение	4,90 [1,94-12,37]	5,39 [2,07-14,08]
GPx ^{p < 0,05}	Повышение	1,95 [1,66-2,29]	6,56 [4,36-9,85]
SOD ^{p < 0,05}	Повышение	1,94 [1,34-2,81]	2,31 [1,47-3,64]
Интегральный показатель состояния антиоксидантной активности			
АОА	Повышение	2,17 [1,61-2,93]	3,05 [2,03-4,58]
Индикаторные показатели печеночного профиля			
АСТ ^{p < 0,05}	Повышение	13,07 [7,05-24,02]	13,26 [6,73–26,10]
АЛТ	Повышение	9,99 [1,31-75,52]	10,38 [1,35–79,79]
Печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы ^{p < 0,05}	Повышение	1,35 [1,23-1,49]	6,33 [3,64-10,93]
Общий белок ^{p < 0,05}	Понижение	3,83 [1,49-9,84]	4,10 [1,54-10,89]
Альбумины ^{p < 0,05}	Понижение	3,22 [1,65-6,27]	3,59 [1,76-7,35]

Оценка причинно-следственных связей у детей с повышенным содержанием в крови хлороформа выявила активацию антиоксидантной защиты организма и нарушение процессов детоксикации в ответ на поступление токсиканта. Установлены статистически значимые причинно-следственные связи между уровнем в крови хлороформа, 1,2-дихлорэтана, дибромхлорметана, дихлорбромметана, тетрахлорметана и вероятностью изменения активности внутриклеточных ферментов GPx, SOD и антиоксидантной активности (индикаторные показатели: GPx, SOD, АОА ($R^2 = 0,10-0,93$; $F = 10-465$; $p = 0,001$)) (приложение В). Выявленные связи ассоциированы с полиморфизмом генов детоксикации и оксигенации: *CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg*, *SOD2 C14510A*. Подтверждением активации процессов свободнорадикального окисления в организме ввиду возникновения агрессивных метаболитов при биотрансформации галогенорганических соединений является доказанная вероятностная достоверная связь между содержанием в крови продукта

метаболизма хлороформа, дихлорбромметана, дибромхлорметана, тетрахлорметана с биохимическими показателями POL (индикаторные показатели: повышение уровня гидроперекиси липидов и малонового диальдегида в плазме крови $R^2 = 0,10-0,65$; $F = 11-435$; $p = 0,001$).

Повышенное содержание хлороформа, 1,2-дихлорэтана и тетрахлорметана в биосредах детей способствует нарушению целостности гепатоцитов и в дальнейшем возможное снижение детоксикационной функции печени (повышение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови) ($R^2 = 0,10-0,26$; $F = 16-79$; $p = 0,001$). На основе построения математических моделей логистической регрессии установлены статистически значимые вероятностные причинно-следственные связи между содержанием хлороформа, дибромхлорметана, дихлорбромметана в крови и повышением билирубина общего ($R^2 = 0,11-0,68$; $F = 11-467$; $p = 0,001-0,002$); между концентрацией 1,2-дихлорэтана, дибромхлорметана, тетрахлорметана в биосредах и снижением общих белков, альбуминов ($R^2 = 0,10-0,82$; $F = 9-641$; $p = 0,001$) (индикаторные показатели: билирубин, белки, альбумины).

В условиях активного протекания свободнорадикальных процессов в клеточной мембране резко уменьшается количество фосфатидилсерина [340]. Перекисное окисление липидов (POL) способствует изменению экспрессии поверхностных мембранных рецепторов, а также может вызвать в митохондриях нарушение активности ферментов матрикса и дисфункцию компонентов дыхательной цепи. На многих клеточных моделях показано, что повышенная генерация ROS способна вызвать апоптоз или некроз, а внутренний биоэнергетический резерв является определяющим фактором для клеточного ответа; для процесса детоксикации и апоптоза необходима мобилизация энергии [70, 153]. В случае необратимой дисфункции митохондрий и энергетического кризиса «сильные смертельные» стимулы вызывают некроз клетки.

Существенное истощение уровня восстановленного GSH способствует изменению экспрессии TNF α T-лимфоцитами [175]. Хлорсодержащие соединения вызывают образование ROS и окислительное напряжение, что ведет к активации

Nrf2 / ARE и индукции GST [221]. Активация Nrf2 / ARE повышает экспрессию SOD и GPx (антиоксидантов), ряд ферментов семейства цитохрома P-450 (ферментов I фазы детоксикации), GST (ферментов II фазы детоксикации) [25]. GST могут стимулировать экспрессию генов связанных с *NF-kB* и *AP1* [277]. *NF-kB* участвует в активации транскрипции многочисленных цитокиновых (TNF α , IL6) и иммунорегуляторных генов. GST защищают от апоптоза, ингибируя две протеинкиназы: Ask 1 и JNK [427]. Фактор транскрипции AP1 потенцирует синтез GPx. Предполагаемыми участниками в цепи передачи сигналов, приводящих к активации SOD и экспрессии ее генов на уровне транскрипции, являются ROS [234; 403] и глутатион [215]. Повышенный уровень ROS, стимулируя протеинкиназу C, повышает уровень IL6 [332]. Взаимодействие IL6 со специфическим рецептором активирует сигнальную систему JAK / STAT.

Доказательством нарушения регуляции клеточной гибели является установленная вероятностная причинно-следственная связь между содержанием в крови: хлороформа, дихлорбромметана, дибромхлорметана, тетрахлорметана, 1,2-дихлорэтана в крови и повышением экспрессии CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺ CD56⁺, CD25⁺ и bcl-2, ($R^2 = 0,10-0,85$; $F = 16-1178$; $p = 0,001$); дихлорбромметана, дибромхлорметаном в биосредах и повышением количества CD95⁺-клеток ($R^2 = 0,33-0,55$; $F = 11-401$; $p = 0,001$); между концентрацией тетрахлорметана, дихлорбромметана, дибромхлорметана, 1,2-дихлорэтана в крови и снижением уровня CD3⁺, CD4⁺ ($R^2 = 0,10-0,63$; $F = 6-404$; $p = 0,001$) (индикаторные показатели: CD19⁺, CD16⁺ CD56⁺, CD3⁺, CD4⁺) (Рисунок 7.2.1).

В условиях антигенной нагрузки необходим прирост в периферической крови количества лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации – CD25-антиген, что обеспечивает быстрое размножение и последующую дифференцировку наивных Т-клеток до зрелых форм.

Одну из ключевых ролей в регуляции иммунного ответа играет процесс программированной клеточной смерти, запускаемый через так называемые «рецепторы смерти».

При длительном поступлении галогенорганических соединений модифицируется активационный профиль активации (маркеры ранней активации и маркеры поздней активации).

У детей, потребляющих гиперхлорированную воду установлена статистически значимая вероятностная причинно-следственная связь между содержанием хлороформа, тетрахлорметана, дихлорбромметана, дибромхлорметана, 1,2-дихлорэтана в крови и повышением экспрессии IL1 β , IL4, IL6, IL8, IL10, INF γ , TNF α ($R^2 = 0,14-0,76$; $F = 14-320$; $p = 0,001$) (Рисунок 7.2.2).

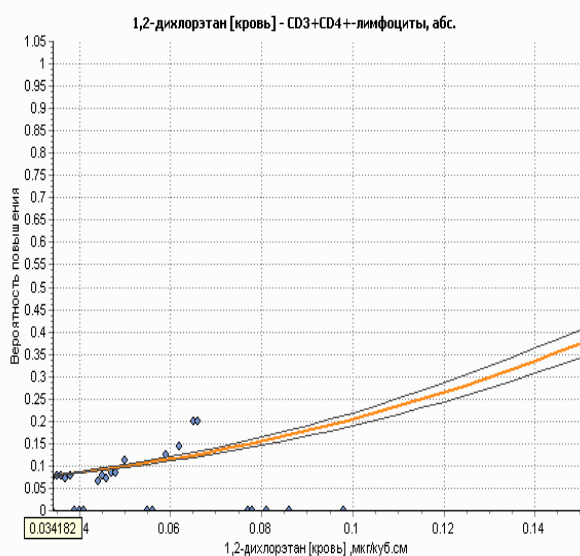


Рисунок 7.2.1 – Зависимость снижения количества CD4⁺-лимфоцитов в организме от концентрации галогенорганических соединений в крови

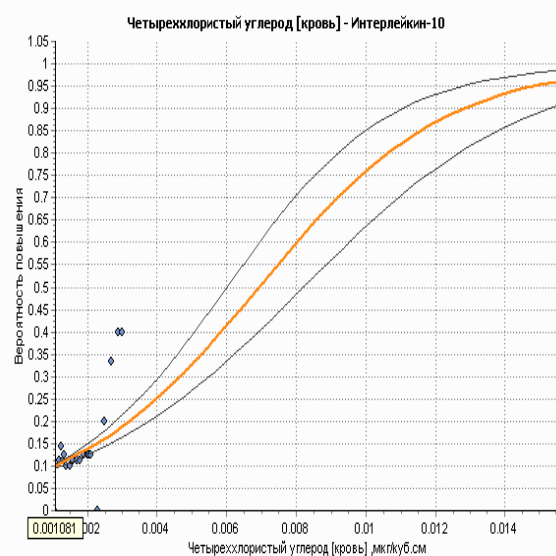


Рисунок 7.2.2 – Зависимость повышения IL10 в организме от концентрации галогенорганических соединений в крови

Характер действия TNF α зависит от его уровня и внутренних программ клетки. Так, низкие концентрации цитокина (TNF $\alpha \cdot 10^{-9}$ M) вызывают усиление продукции ROS, активацию лейкоцитов, усиление фагоцитоза, при более высоких концентрациях цитокина (TNF $\alpha \cdot 10^{-6}$ M) отмечается лейкоцитоз, увеличение уровней стероидных гормонов, увеличение синтеза острофазных белков. Нарушению клеточной гибели в условиях воздействия хлороформа сопутствует нарушение активности цитокинов семейства TNF и характеризуется наличием негативной генетической вариабельности гена *TNF G4682A*.

По системе математических моделей обоснованы референтные уровни содержания химических веществ в крови детей группы риска, которые могут быть рассмотрены в качестве критериев оценки безопасности воздействия.

Использование регрессионного анализа выявило снижение экспрессии по относительной величине CD3 ($b_0 = 68,84 \pm 1,62$; $b_1 = -0,93$; $R^2 = 0,86$; $F = 101,7$; $p < 0,001$) и CD4 ($b_0 = 37,208 \pm 1,445$; $b_1 = -0,91$; $F = 75,13$; $R^2 = 0,82$; $p = 0,001$) при повышении концентрации хлороформа в биосредах.

Анализ связи параметров иммунной системы с повышенным содержанием в крови продуктов гиперхлорирования воды показал, что механизм вероятного апоптогенного эффекта связан преимущественно с непосредственным воздействием на процессы пероксидации, оксигенации, конъюгации через ряд ферментных систем, контролирующих и осуществляющих данные процессы (система глутатиона, супероксиддисмутаза).

При концентрации хлороформа в крови на уровне от $0,00001 \text{ мг/дм}^3$ до $0,2300 \text{ мг/дм}^3$ происходит изменение активности «внутреннего» пути апоптоза реализуемое главным образом через модуляцию активности митохондрий (активные формы кислорода, супероксиддисмутаза, система глутатиона).

Показано, что нарушение реализации клеточной гибели обусловлено в первую очередь повышенным содержанием хлороформа в крови. Установлены и патогенетически обоснованы достоверные связи между индикаторными показателями ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD16^+CD56^+$, $CD19^+$, bcl-2, IL1 β , IL4, IL6, IL10, GPx, SOD, AOA, LPO, MDA, АСТ, АЛТ, общий билирубин, билирубин прямой, альбумины, общий белок, печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы) и содержанием галогенорганических соединений в крови, разрывающиеся в условиях отсутствия экспозиции.

На основе построения математических моделей логистической регрессии, описывающих значимые вероятностные причинно-следственные связи «химический фактор в крови – индикаторный показатель», обоснованы реперные уровни содержания галогенорганических соединений в крови. Для хлороформа реперный уровень по критерию повышения АСТ составил $0,009 \text{ мг/дм}^3$, для LPO –

0,061 мг/дм³, для TNF α – 0,002 мг/дм³, для bcl-2 – 0,003 мг/дм³; для 1,2-дихлорэтана по критерию повышения CD8⁺-маркера – 0,093 мг/дм³, для TNF α – 0,007 мг/дм³ и по критерию снижения для CD4⁺, 10⁹/дм³ – 0,034 мг/дм³, для CD3⁺, 10⁹/дм³ – 0,007 мг/дм³, для общего белка – 0,045 мг/дм³; для дихлорбромметана по критерию снижения CD3⁺, 10⁹/дм³ – 0,001 мг/дм³; для тетрахлорметана по критерию повышения для IL10 – 0,001 мг/дм³; для IL10 – 0,001 мг/дм³, для SOD – 0,001 мг/дм³, для TNF α – 0,003 мг/дм³.

По результатам комплексных исследований к индикаторным показателям, характеризующим экспозицию галогенорганических соединений (на примере хлороформа), следует отнести: АСТ, АЛТ, общий билирубин, билирубин прямой, белок общий, альбумины, печеночную фракцию изоферментов щелочной фосфатазы, CD3⁺, CD4⁺, CD16⁺CD56⁺, CD19⁺, bcl-2, IL1 β , IL4, IL6, IL10, GPx, SOD, AOA, LPO, MDA, Annexin V-FITC⁺PI⁻, Annexin V-FITC⁺PI⁺; ген *CYP1A1 Ile462Val*, ген *MMP9 Gln279Arg*.

Гипотетическая схема, суммирующая возможные механизмы регуляции хлороформом клеточной гибели представлена на Рисунке 7.2.3. Основные патогенетические звенья гепатобилиарных нарушений и иммунных нарушений, ассоциированных с воздействием хлороформом, представлены на Рисунке 7.2.4.

Таким образом, на основе комплексного научного анализа установлено, что пероральная экспозиция продуктами гиперхлорирования питьевой воды формирует дисбаланс между интенсивностью реакций, связанных с генерацией перекисных соединений, и активностью систем их детоксикации, что модифицирует реализацию клеточной гибели, а именно замедляет клеточную гибель по пути апоптоза и повышает гибель клетки по механизму некроза.

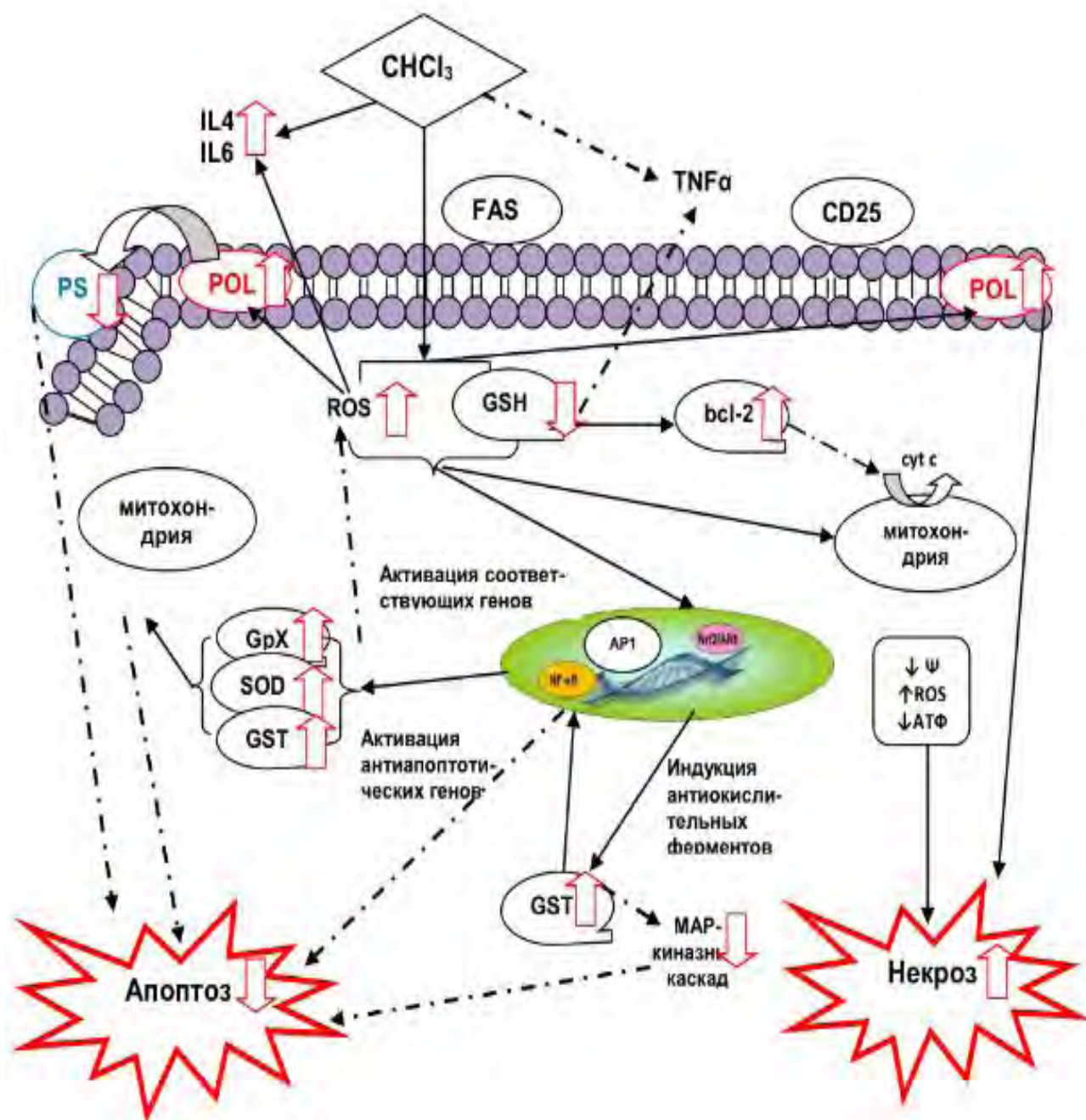


Рисунок 7.2.3 – Гипотетический механизм действия галогенорганических примесей (на примере хлороформа) на регуляцию апоптотической гибели клетки (ROS – активные формы кислорода; GSH – глутатион; GST – глутатионтрансфераза; ARE – антиоксидант-респонсивный элемент; AP1 – активирующий протеин 1; POL – перекисное окисление липидов; PS – фосфатидилсерин; cyt c – цитохром c; Ψ – потенциал митохондриальный, → – потенцирование эффекта; – ⊥ ингибирование эффекта)

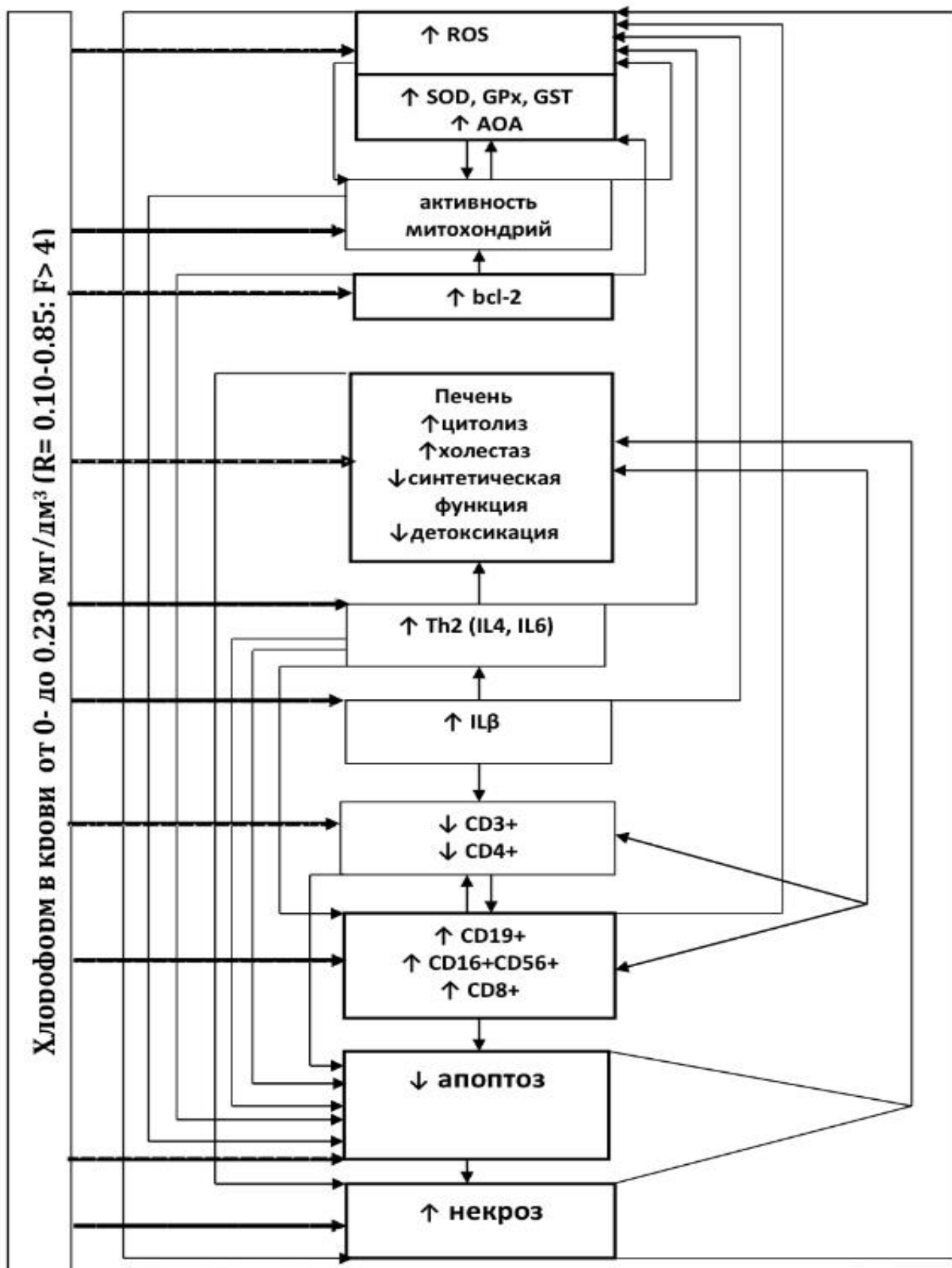


Рисунок 7.2.4 – Основные гепатобилиарные нарушения, патогенетически связанные с иммунной системой, и, ассоциированные с воздействием галогенорганических соединений (на примере хлороформа) (↓ или ↑ – направление изменения показателя)

Резюме по главе 7. Оценка причинно-следственных связей формирования нарушений клеточной гибели, выполненная на основании анализа состояния качества окружающей среды, особенностей формирования микрокомпонентного состава биологических сред и результатов углубленного клинико-функционального, инструментального и лабораторного обследования детей, проживающих в условиях экспозиции химических факторов природного (на примере стронция) и техногенного (на примере хлороформа) происхождения, поступающих с питьевой водой, верифицирует индикаторные показатели нарушения апоптотической гибели клетки, представленные в настоящем исследовании.

ГЛАВА 8. МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ХИМИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

8.1. Экспериментальные модели в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция)

Экспериментальная модель в условиях in vitro

Экспериментально доказано, что стронций в концентрации 7 мг / дм³, соответствующей ПДК для воды водных объектов, статистически значимо ($p < 0,001$) ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели по пути некроза по критерию содержания фосфатидилсерина, выявляемого в тесте с аннексином (Таблица 8.1.1, Рисунок 8.1.1).

Таблица 8.1.1 – Характеристика показателей иммунного статуса обследованных детей с учетом контаминантной нагрузки стронцием ($Me [P_{25}; P_{75}]$)

Показатель	Проба без добавления стронция ($n = 49$)	Проба с добавлением стронция ($n = 49$)	p
CD95 %	12,5 [11,0; 14,0]	8,0 [7,10; 11,0]	< 0,001
p53, %	0,42 [0,40; 0,62]	0,25 [0,15; 0,40]	< 0,001
AnnV-FITC ⁺ PI ⁻ , %	0,89 [0,60; 1,19]	0,19 [0,18; 0,35]	< 0,001
AnnV-FITC ⁺ PI ⁺ , %	9,16 [8,47; 10,98]	12,33 [10,42; 15,01]	0,021

Примечание: здесь и других таблицах главы р – различие между контрольной и опытной пробой.

Обнаружено статистически значимое ($p < 0,001$) снижение в 1,6 раза экспрессии CD95-маркера и в 1,7 раза уровня белка p53 в опытных пробах (после добавления стронция). После внесения в опытные образцы крови стронция в концентрации 7 мг/дм³ отмечается статистически значимое ($p < 0,001$) снижение в 4,68 раза количества Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток и статистически значимое ($p = 0,021$) повышение количества Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток в 1,35 раза.

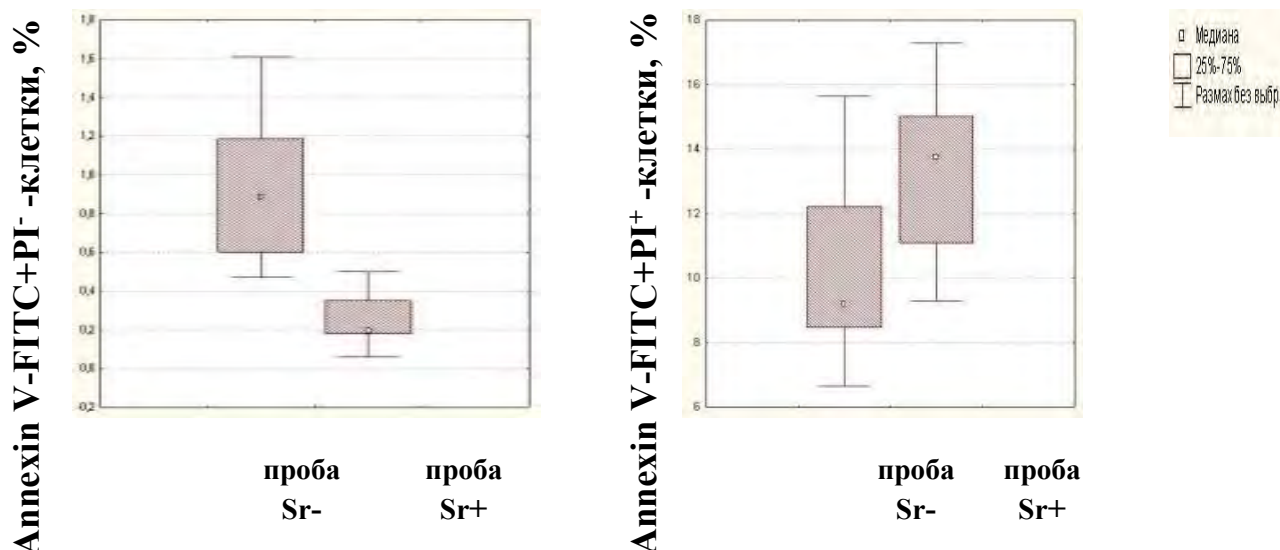


Рисунок 8.1.1 – Результаты эксперимента в системе *in vitro* ($p < 0,05$ по критерию U–критерию Манна–Уитни); Sr- – проба без добавления стронция (контрольная проба); Sr+ – проба с добавлением стронция (опытная проба)

Следует отметить, что во всех анализируемых пробах после внесения стронция в суспензию лейкоцитов отмечается повышение процентного содержания Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток от 10 до 50 % от исходного уровня.

Экспериментальная модель в условиях *in vivo*

Хроническое низкодозовое поступление с питьевой водой стабильного стронция модифицирует способность иммунной системы мышей адекватно реагировать на стимуляцию, вызванную антигеном. Результаты эксперимента *in vivo* на лабораторных животных выявили, что значительное количество клеток периферической крови показывают более значимую по сравнению с клетками селезенки экспрессию CD62L⁺-антигена (Таблица 8.1.2).

Исследование уровня CD62L на иммунокомпетентных клетках периферической крови у мышей опытной группы не установило статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой. Цитофлуориметрический анализ экспрессии CD62L-маркера на взвеси спленоцитов показал, что у мышей опытной группы статистически значимо ($p = 0,047$) в 2 раза повышается количество CD62L⁺-клеток по сравнению с

результатами, идентифицированными у интактных животных (Рисунки 8.1.2, 8.1.3).

Установлено, что при поступлении в организм животных стронция статистически значимо ($p = 0,047$) в 2 раза снижается коэффициент, характеризующий состояние 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). Снижение критерия $CD62L^+$ кровь / $CD62L^+$ селезенка в условиях субхронической интоксикации стронцием более чем в 2 раза является ранним критерием иммунотоксического эффекта анализируемого щелочно-земельного металла.

Таблица 8.1.2 – Показатели индуцированной стронцием экспрессии $CD62L^+$ -рецептора в эксперименте ($Me [P_{25}; P_{75}]$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 8$)	Опытная группа ($n = 16$)	p
Кровь, $CD62L^+$	21 [19; 31]	24 [20,5; 26]	0,910
Селезенка, $CD62L^+$	2 [1,5; 3]	4 [3; 5]	0,047
$CD62L^+$ кровь / $CD62L^+$ селезенка	12,83 [8; 20]	5,75 [4,33; 8]	0,047

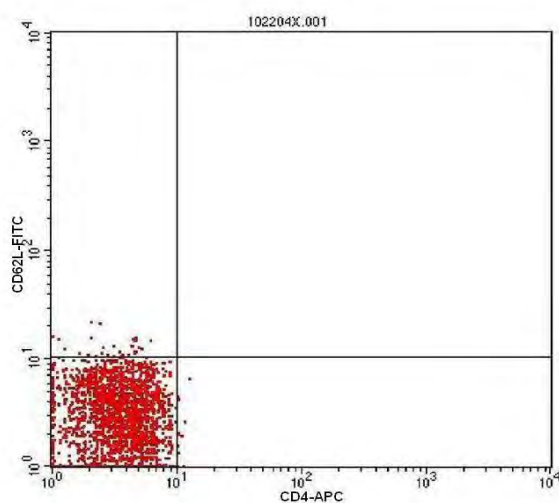


Рисунок 8.1.2 – Изотипический контроль (система *in vivo*)

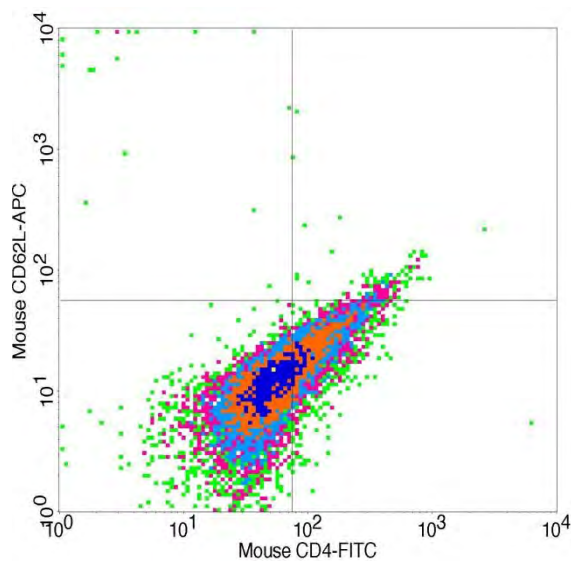


Рисунок 8.1.3 – Гистограмма, отражающая экспрессию мембранных молекул $CD62L$ на взвеси спленоцитов (система *in vivo*)

В исследовании доказано, что угнетение активационных процессов, фенотипически связанных с шейдированием селективного рецептора, приводит к относительному увеличению количества наивных иммуноцитов, а значит к пролонгации их жизненного цикла, то есть к замедлению клеточной гибели (апоптоза).

Таким образом, установлено, что в системе *in vitro* стронций в концентрации 7 мг/дм³, соответствующей ПДК для воды водных объектов, замедляет FAS-зависимый и p53-регулируемый апоптоз. Концентрация стронция, не превышающая недействующий уровень, вызывает снижение процессов активации иммунокомпетентных клеток на уровне вторичных лимфоидных органов. Щелочно-земельные металлы (на примере стронция) оказывают воздействие на активационную способность клеток, что обусловлено способностью металлов модифицировать экспрессию ряда белков (например селектина), тем самым трансформировать следующий за этим каскад молекулярных событий, характерных для иммуносупрессии. Следовательно, CD95⁺, p53, Annexin V-FITC⁺PI⁻-клетки, Annexin V-FITC⁺PI⁺-клетки являются индикаторными показателями клеточной гибели в условиях избыточного поступления щелочно-земельных металлов (на примере стронция) в организм.

8.2. Экспериментальные модели в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа)

Экспериментальная модель в условиях in vitro

Анализ результатов эксперимента позволил установить, что при внесении в культуру клеток 0,06 мг/дм³ хлороформа статистически значимо ($p = 0,02$) в 1,4 раза повышается уровень bcl-2, статистически значимо ($p = 0,02$) в 1,2 раза снижается количество Annexin V-FITC⁺PI⁻-клеток и статистически значимо ($p = 0,046$) в 1,3 раза повышается количество Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток в сравнении с результатами, полученными в пробе без добавления хлороформа (Таблица 8.2.1).

Таблица 8.2.1 – Характеристика показателей иммунного статуса обследованных детей с учетом контаминантной нагрузки хлороформом ($Me [P_{25}; P_{75}]$)

Показатель	Проба без добавления хлороформа ($n = 60$)	Проба с добавлением хлороформа ($n = 60$)	p
Диапазон концентрации	Хлороформ 0,00001-0,230 мг/дм ³		
CD25 ⁺ , %	6 [5; 7]	6 [6; 7]	0,740
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,16 [0,14; 0,22]	0,2 [0,17; 0,24]	0,610
CD95 ⁺ , %	25 [22; 30]	25 [22; 28]	0,940
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,73 [0,59; 0,92]	0,86 [0,67; 1,04]	0,890
p53, %	1,84 [1,31; 2,17]	1,83 [1,27; 2,00]	0,800
bcl-2, %	1,00 [0,98-1,07]	1,40 [1,23-1,88]	0,020
AnnV-FITC ⁺ PI ⁻ , %	1,06 [0,78; 1,31]	0,89 [0,58; 1,2]	0,020
Ann V-FITC ⁺ PI ⁺ , %	21,49 [15,11; 26,28]	27,22 [12,1; 33,2]	0,046

Анализ индивидуальных результатов оценки уровня Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток показал, что в 50 пробах (83 %) внесение в суспензию лейкоцитов хлороформа вызывало дальнейшее повышение количества клеток, позитивных по PI, в среднем на 20 % от исходного уровня.

Таким образом, результаты эксперимента продемонстрировали, что добавление хлороформа в концентрации 0,06 мг/дм³ в культуру лимфоцитов в условиях имеющейся экспозиции привело к достоверному снижению Annexin V-FITC⁺PI⁻ и достоверному повышению Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток. Обнаружено, что добавление хлороформа повышает уровень белка bcl-2, контролирующего и регулирующего события митохондриального апоптоза, не изменяет активационный статус Т-лимфоцита (CD25⁺), не влияет на уровень p53 и не оказывает влияние на FAS-зависимый процессинг.

Полученные результаты показывают, что в диапазоне изучаемой концентрации хлороформа наблюдается переключение клеточной гибели по пути некроза на фоне нарушения барьерной функции митохондриальных мембран. Доказано, что bcl-2, Annexin V-FITC⁺PI⁻, Annexin V-FITC⁺PI⁺ являются индикаторными показателями клеточной гибели в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

В ходе углубленного анализа результатов исследования выполнено научно-методическое обоснование индикаторных показателей раннего выявления нарушений клеточной гибели и их критериальных уровней в условиях экспозиции щелочно-земельными металлами (на примере стронция): CD3⁺, CD8⁺, FAS, TNFRI, Treg, TNF α , VEGF, RANKL, p53, bcl-2, аннексиновый тест, GST, GPx, SOD, LPO, MDA, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин; маркеры чувствительности – TP53 rs17884159 (Таблица 8.2.2).

Таблица 8.2.2 – Диапазоны значений стронция в крови и соответствующие ему диапазоны индикаторных показателей клеточной гибели у детей, проживающих в условиях экспозиции стронция ($\uparrow \downarrow$ – вектор направления индикаторного показателя)

Химический фактор	Концентрация в крови, мг/дм ³	Индикаторный показатель	Критерий показателя,
			диапазон
1	2	3	4
Стронций	Биохимические индикаторные показатели		
	0,0170-0,3710	LPO, мкмоль/дм ³ \uparrow	296,81-412,22
		MDA, мкмоль/дм ³ \uparrow	2,89-3,55
		GST, нг/см ³ \downarrow	91,73-149,35
		GPx, нг/см ³ \downarrow	24,62-35,04
		SOD, нг/см ³ \downarrow	33,67-47,46
	0,069 -0,075	RANKL, пг/см ³ \uparrow	до 11,6
	0,077-0,112		12,0-15,0
	0,120-0,155		15,1-17,0
	0,160-0,219		17,1-22
	0,0170-0,3710	Щелочная фосфатаза, Е/дм ³ \downarrow	267,74-324,14
		Остеокальцин, нг/мл \downarrow	44,64-60,43
		Костный изофермент щелочной фосфатазы, Е/дм ³ \downarrow	76,41-115,33
Стронций	Мембранные индикаторные показатели		
	0,0170-0,3710	CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ \downarrow	1,39-2,25
		CD8 ⁺ , % \downarrow	20,87-28,59
	0,0170-0,3710	CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ \downarrow	1,39-2,25
		CD8 ⁺ , % \downarrow	20,87-28,59
	0,0170-0,3710	CD8 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ \downarrow	0,47-0,83
	0,062 -0,080	CD95 ⁺ , % \downarrow	19,00-17,12
	0,085-0,150		17,07-16,40
	0,160-0,250		16,37-15,57
0,255-0,371	15,52-14,55		

Окончание Таблицы 8.2.2.

1	2	3	4
Стронций	0,059 -0,095	CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ ↓	0,45-0,70
	0,100-0,175		0,45-0,40
	0,180-0,260		0,39-0,36
	0,265-0,371		0,35-0,32
	0,069 -0,075	TNFRI, % ↓	1,50-1,39
	0,077-0,090		1,10-0,89
	0,095-0,150		0,84-0,45
	0,155-0,197		0,43-0,25
	0,018 -0,025	Treg, 10 ⁹ /дм ³ ↓	0,030-0,041
	0,030-0,055		0,028-0,018
	0,0594-0,020		0,017-0,010
	0,207-0,371		< 0,010
	0,053 -0,100	Annexin V FITC ⁺ PI ⁻ , % ↓	2,0-1,54
	0,150-0,200		1,50-1,43
	0,250-0,300		1,42-1,36
	0,310-0,371		1,35-1,30
	0,050-0,090	Annexin V FITC ⁺ PI ⁺ , % ↑	7,01-7,17
	0,095-0,180		7,2-7,55
	0,190-0,220		7,59-7,73
	0,230-0,371		7,77-8,42
Стронций	Межклеточные индикаторные показатели		
	0,3640	VEGF, пг/см ³ ↓	124,31
	0,069 -0,090	TNFα, пкг/мл ↑	1,00-1,60
	0,095-0,150		1,60-1,85
	0,160-0,250		1,87-2,29
	0,278-0,371		2,43-3,00
	Внутриклеточные индикаторные показатели		
	0,034 -0,055	P53, % ↓	1,50-1,88
	0,056-0,090		1,83-1,04
	0,095-0,15		0,99-0,55
	0,155-0,197		0,52-0,33
	0,0170-0,3710		bcl-2, % ↓
Маркеры чувствительности			
0,0170-0,3710	<i>TP53 rs17884159</i>	Полиморфизм	
	Генотип <i>TT</i>	Снижение уровня p53	

Результаты выполненного исследования послужили основой разработки и апробации системы индикаторных показателей для своевременного выявления нарушений клеточной гибели, в условиях воздействия галогенорганических соединений (на примере хлороформа) включающей: мембранные (CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, CD8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ аннексиновая метка), межклеточные (IL4, IL6, IL10, IL1β), внутриклеточные (bcl-2), биохимические (AOA, GPx, SOD, MDA, LPO, общий белок, альбумины, АСТ, АЛТ, билирубин общий, билирубин прямой,

печеночная фракция изофермента щелочной фосфатазы) и генетические маркеры (*CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg*) (Таблица 8.2.3).

Таблица 8.2.3 – Диапазоны значений хлороформа в крови и соответствующие им диапазоны индикаторных показателей клеточной гибели у детей, проживающих в условиях экспозиции хлороформа (↑ ↓ – вектор направления индикаторного показателя)

Химический фактор	Концентрация в крови, мг/дм ³	Индикаторный показатель	Критерий показателя,
			диапазон
1	2	3	4
Галогенорганические соединения (хлороформ)	Биохимические индикаторные показатели		
	0,00001-0,230	LPO, мкмоль/дм ³ ↑	451,01-545,6
		MDA, мкмоль/дм ³ ↑	2,63-2,95
		АОА, % ↑	39,1-46,1
		GPx, нг/см ³ ↑	63,97-100,63
		SOD, нг/см ³ ↑	35,06-58,14
		Печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы, Е/дм ³ ↑	9,25-13,1
		Общий белок, г/дм ³ ↓	59,26-71,85
		Альбумины, г/дм ³ ↓	39,67-41,55
		Билирубин прямой, мкмоль/дм ³ ↑	2,96-7,0
		АСТ, Е/дм ³ ↑	30,23-35,02
	Мембранные индикаторные показатели		
	0,00001-0,230	CD3 ⁺ , % ↓	69,50-68,00
		NKT, % ↑	11,56-18,86
		NKT, 10 ⁹ /дм ³ ↑	0,33-0,41
		CD4 ⁺ , % ↓	35,70-38,21
		CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ ↓	1,00-1,19
		CD19 ⁺ , % ↑	14,96-16,92
		CD19 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ ↑	0,42-0,51
Галогенорганические соединения (хлороформ)	0,00001-0,230	Annexin V FITC+PI ⁻ , % ↓	0,97-1,18
	0,00001-0,0032		1,06-1,44
	0,0033-0,0420		0,81-1,06
	0,00001-0,230	Annexin V FITC+PI ⁺ , % ↑	18,48-22,50
	0,00001-0,0032		13,67-16,75
	0,0033-0,0420		25,01-28,24
	Межклеточные индикаторные показатели		
	0,00001-0,230	IL4, пкг/мл ↑	1,61-4,43
		IL1β, пкг/мл ↑	3,46- 4,26
		IL6, пкг/мл ↑	3,11-9,56
		IL10, пкг/мл	3,22-7,18
	Внутриклеточные индикаторные показатели		
0,00001-0,230	bcl-2, %↑	0,98-1,15	
Маркеры чувствительности			
0,00001-0,230	<i>CYP1A1 Ile462Val</i>	Полиморфизм	
	<i>MMP9 Gln279Arg</i>	Полиморфизм	

Резюме по главе 8. В целом результаты эксперимента в системе *in vitro* и *in vivo* доказали модифицирующее влияние щелочно-земельных металлов (на примере стронция) и галогенорганических соединений (на примере хлороформа) на регуляцию клеточной гибели в условиях экспозиции, что согласуется с результатами исследований, представленными в предыдущих главах. Подчеркнуто решающее значение некроза в индукции эффективного иммунного ответа на химические соединения. Сравнительный анализ результатов экспериментальной экспозиции гаптенами позволяет отметить более выраженный характер нарушений клеточной гибели по пути апоптоза в условиях нагрузки щелочно-земельными металлами на примере стронция. Доказано, что CD95⁺, p53, Annexin V-FITC⁺PI⁻, Annexin V-FITC⁺PI⁺ являются индикаторными показателями клеточной гибели в условиях экспозиции стронцием, а bcl-2, Annexin V-FITC⁺PI⁻, Annexin V-FITC⁺PI⁺ – хлороформа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Здоровая семья и здоровье нации – основные приоритеты развития Российской Федерации. Между тем сегодня трудно говорить о здоровье, так как большая часть населения страны все еще употребляет воду, которая не соответствует нормам, что диктует необходимость существенного повышения качества питьевой воды (Послание Президента Федеральному Собранию, 1 марта 2018 г.).

В условиях негативного влияния гаптенов различного происхождения, поступающих с питьевой водой, иммунная система играет одну из ключевых ролей в обеспечении и поддержании гомеостаза организма, а также в формировании согласованных реакций его отдельных систем в ответ на внешние воздействия [44, 74, 80, 104, 105, 107]. Изменение иммунитета химическими факторами внешней среды может привести к увеличению риска развития ряда заболеваний, причинами которых часто являются нарушения регуляции клеточной гибели [27, 69, 70, 101, 162, 286, 301, 430]. Работы ряда авторов показали, что у детей, проживающих в условиях загрязнения окружающей среды и потребляющих некачественную питьевую воду, увеличивается частота случаев возникновения заболеваний, в патогенезе которых важное место принадлежит дисфункции иммунной системы, проявляющейся в нарушении клеточной гибели [5, 6, 18, 21, 22, 92, 107, 199, 232]. В сравнении с взрослыми, дети, организм которых находится в процессе развития, особенно активного во внутриутробном периоде и в первые годы жизни, зачастую намного более восприимчивы к негативному воздействию на организм загрязненной питьевой воды [2, 26, 44, 70, 112].

Многочисленные исследования российских и зарубежных ученых доказали, что раннее выявление и прогнозирование функциональных нарушений иммунной системы в условиях негативного средового воздействия химических факторов

позволяет снизить рост иммуноассоциированной заболеваемости [26, 27, 56, 122, 124, 399–401; 406]. Между тем несвоевременное выявление и, как следствие, отсутствие лечения на начальных стадиях заболеваний с иммунологическим компонентом в патогенезе обуславливают хронизацию и тяжелое течение болезни, резистентность к традиционной терапии и высокий риск развития осложнений.

Распространенность иммуноассоциированных заболеваний, обусловленных некачественной питьевой водой, у детей разных возрастных групп свидетельствует о необходимости установления общих закономерностей и особенностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему детского организма. Все вышесказанное определило цель и задачи исследования. Основной целью настоящего исследования явилось научно-методическое обоснование комплексного подхода к гигиеническому анализу закономерностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей (на примере Пермского края).

Анализ российских и зарубежных научных литературных источников и современные проблемы заболеваний, ассоциированных с воздействием химических факторов риска (щелочно–земельные металлы, галогенорганические соединения), в патогенезе которых иммунная система играет ключевую роль, позволил установить, что:

- постоянно продолжающееся загрязнение окружающей среды химическими примесями в сочетании с нестабильной социально-экономической ситуацией приводит к ухудшению здоровья детского населения, как в регионах Российской Федерации, так и во всем мире в целом [2, 4, 6, 14, 48, 57, 83, 92, 388, 418], многочисленные исследования зарубежных и отечественных авторов последних лет доказывают связь между средовыми факторами и состоянием здоровья населения [21, 23, 72, 99, 102, 104, 211, 237, 311, 391];

- в доступной литературе отсутствуют сведения об особенностях и закономерностях влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему детей;

- существует ограниченное количество информации о территориальных особенностях и общих закономерностях развития иммуноассоциированных заболеваний у детей в условиях хронического низкодозового загрязнения окружающей среды химическими компонентами природного (щелочно–земельные металлы) и техногенного (галогенорганические соединения) происхождения;

- остаются малоизученными механизмы развития заболеваний, в патогенезе которых ключевая роль принадлежит нарушению апоптоза, реализующиеся в условиях хронической экспозиции щелочно–земельных металлов и галогенорганических соединений;

- в научной литературе практически отсутствуют сведения об исследованиях по экспериментальной верификации модифицирующего влияния химических гаптенов различного происхождения на клеточную гибель;

- в литературе недостаточно представлена доказательная база установления причинно-следственных связей патологических состояний, при которых иммунные механизмы имеют доминирующее значение, с приоритетными химическими факторами окружающей среды;

- необходим отсутствующий в литературных источниках всесторонний анализ механизмов гибели клетки в условиях средовой экспозиции щелочно–земельных металлов и галогенорганических соединений, что сделает возможным осуществление раннего выявления апоптозассоциированной патологии у детей при избыточной водной гаптенной нагрузке спектром химических веществ природного и антропогенного происхождения.

В соответствии с целью работы предложена концептуальная модель научно-методического обоснования комплексного подхода к гигиеническому анализу закономерностей влияния гаптенов, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей, включающая блоки: гигиенического анализа заболеваемости детей с учетом действия приоритетных факторов окружающей среды; углубленного химико-аналитического и клиничко-лабораторного обследования детей; анализа вероятностных причинно-следственных связей;

экспериментального моделирования механизмов нарушения клеточной гибели в условиях экспозиции; научного обоснования принципов раннего выявления апоптозассоциированных заболеваний.

В работе для достижения поставленной цели использован комплекс высокоинформативных санитарно-гигиенических, статистических и общенаучных методов исследования, методология оценки риска, клинико-анамнестических, химико-аналитических и клинико-лабораторных методов исследования, которые позволяют расширять научные сведения и получать новые.

Гигиенические исследования качества среды обитания, проведенные в 2010–2017 гг. в субъектах Российской Федерации, показывают существенную пространственную и временную гетерогенность распределения показателей качества питьевой воды.

Оценка состояния воды хозяйственно-питьевого назначения селитебных территорий РФ в целом за период 2013–2017 гг. свидетельствует об увеличении доли проб с превышением ПДК с 2,68 до 3,54 % (повышение в 1,32 раза). На территории Пермского края за данный период доля проб питьевой воды с превышением гигиенических нормативов возросла в 1,25 раза. Следует отметить, что на всей территории РФ на стабильно высоком уровне остаётся содержание в питьевой воде химических веществ природного и техногенного происхождения, потенциально способных оказывать негативное действие на костно-мышечную систему и гепатобилиарный тракт. Доли нестандартных проб щелочно-земельных металлов (на примере стронция) в 2017 г. составила 7,61 %, что в 2,1 раза выше, чем в 2013 г. (3,7 %); галогенорганических соединений (на примере хлороформа) в 2017 г. – 8,82 %, а в 2014 г. показатель ненормативных проб по содержанию данного вещества составлял 11,31 %. С 2013 по 2017 г. удельный вес нестандартных проб питьевой воды по содержанию стронция природного происхождения на территории Пермского края вырос в 6,8 раза. В 2017 г. в Пермском крае в 1,67 % проб питьевой воды фиксировалось содержание стронция на уровне от 2 до 5 ПДК (4-е ранговое место). В 2017 г. в трех субъектах РФ отмечен рост числа ненормативных проб химических веществ техногенного

происхождения (хлороформ) (от 2 до 5 ПДК), потенциально способных негативно влиять на функциональную активность печени. Высокий удельный вес (более 12 %) проб питьевой воды, не соответствующей гигиеническим нормативам по содержанию хлороформа (от 2 до 5 ПДК), зарегистрирован в Волгоградской области (36,3 % – 1-е ранговое место), Челябинской области (15,2 % – 2-е ранговое место) и Пермском крае (12,1 % – 3-е ранговое место). В Новгородской, Архангельской (Северо-Западный федеральный округ), Ярославской, Московской (Центральный федеральный округ) областях и Пермском крае (Приволжский федеральный округ) обнаружены пробы питьевой воды с превышением допустимых норм хлороформа в 5 раз.

Результаты гигиенической оценки свидетельствуют о негативной тенденции в состоянии качества питьевой воды на отдельных территориях РФ. В целом по Российской Федерации за период 2013–2017 гг. удельный вес нестандартных проб питьевой воды по содержанию щелочно-земельных металлов (на примере стронция природного происхождения) возрос более чем в 2 раза, при этом максимальное повышение – до 7 раз отмечается на территории Пермского края. Также на территории Пермского края в 2017 г. зафиксировано превышение ПДК галогенорганических соединений (хлороформа) в питьевой воде до 5 раз.

Анализ качества питьевого водоснабжения на территории Пермского края указывает на загрязнение воды химическими веществами различного происхождения. В 2016 г. по сравнению с 2015 г. в крае доля проб воды в источниках централизованного водоснабжения, не соответствующих гигиеническим требованиям по санитарно-химическим показателям, возросла в 1,1 раза за счет подземных вод. Важно указать на отрицательную динамику показателей химической безопасности воды подземных источников водоснабжения за последние три года: в 2014 г. доля нестандартных проб составляла 11,6 %, а в 2017 г. – 17,4 %, отмечается рост нестандартных проб в 1,5 раза. Природно-обусловленный повышенный уровень в питьевой воде стронция (более 2 ПДК) в период 2014–2017 гг. отмечается в г. Кунгуре. Высокий уровень нестандартных проб воды по микробиологическим показателям, отобранных из

поверхностных водоисточников, в 2016–2017 гг. отмечается в г. Краснокамске (до 33,3 %). В Пермском крае с 2014 по 2017 г. стабильно регистрируются повышения нестандартных проб по содержанию химических веществ, образующихся в воде при хлорировании. В 2014 г. из всех исследованных проб 32 % (по содержанию хлороформа) и 3 % (по содержанию дихлорметана) превышали предельно допустимый уровень, однако в 2017 г. из всех исследованных проб – 44 % (по содержанию хлороформа) и 5 % (по содержанию дихлорметана). За анализируемый период времени удельный вес нестандартных исследований питьевой воды систем ЦХПВ (перед подачей в водопроводную сеть и в разводящей сети) по содержанию хлороформа увеличился на 12 %. Результаты анализа проб воды свидетельствуют о превышении нормативов по содержанию химических веществ природного и техногенного происхождения на территории Пермского края.

Исследования качества окружающей среды, выполненные на примере территорий Пермского края, выявили значимую неоднородность распределения показателей качества питьевых вод. Так, на территории, где используется вода подземных источников, показатель нестандартных проб по содержанию стронция в воде составил 16,7 %. Максимальная концентрация стронция в питьевой воде составила 8,4 мг/л (1,2 ПДК), а кратность превышения содержания стронция в пробах воды относительно территории сравнения – более 10 раз. Одной из причин ухудшения качества питьевой воды являются факторы природного характера, связанные с гидрохимическими особенностями подземных вод, а именно с повышенным содержанием в питьевых водах стабильного стронция [110]. Установлена закономерная тенденция увеличения содержания стронция с глубиной [5].

На территории, где производится гиперхлорирование водопроводной воды, содержание галогенорганических соединений в питьевой воде было превышено до двух раз, их оценка по критерию суммы отношений обнаруженных в воде разводящей сети концентраций показала превышение допустимого уровня до 2,5 раза. Полученные результаты подтверждаются данными литературных

источников. Так, согласно наблюдения ряда авторов, гиперхлорирование водопроводной воды при существующем микробиологическом уровне загрязнения воды источника водоснабжения органическими веществами является причиной образования и поступления в питьевую воду высокотоксичных галогенорганических соединений (хлороформ) [311, 399, 400].

Особенности гаптенной нагрузки способствовали формированию особенностей микрокомпонентного состава биосред у обследуемого детского населения. У детей, потребляющих питьевую воду ненормированного качества по содержанию щелочно-земельных металлов, статистически значимо ($p < 0,05$) в 1,6 раза повышено содержание стронция по сравнению с референтным уровнем и в 11,3 раза – относительно величин, зарегистрированных у детей группы сравнения. У детей, проживающих в условиях экспозиции, доля проб с повышенным уровнем стронция по сравнению со значениями, полученными у детей группы сравнения, составила 100 %. Необходимо отметить, что при повышении стронция в воде на 1 мг / л, его концентрация в крови возрастает на 0,015 мкг / дм³.

Результаты химико-аналитических исследований демонстрируют, что в крови у всех обследованных детей, потребляющих гиперхлорированную воду, идентифицирован хлороформ. По данным обследования детей группы сравнения безопасным уровнем галогенорганических соединений в крови является их отсутствие. Следует подчеркнуть, что повышенный уровень в крови хлороформа зависит от его средней суточной дозы, поступающей в организм с питьевой водой ($y = 0,02 + 12,854x$, $p = 0,025$).

Согласно полученным результатам и сведениям литературных источников содержание стронция и хлороформа в крови у экспонируемого населения следует рассматривать в качестве маркеров экспозиции (воздействия) [57, 399]. Поскольку количество проб крови с повышенным содержанием других идентифицированных компонентов, не являющихся маркерами воздействия, составляло менее 5 % от числа всех исследованных проб в группах наблюдения и группах сравнения, их влияние в дальнейших исследованиях не учитывалось [77]. Факт того, что

обследуемые дети, проживающие в условиях стронциевой геохимической провинции (экспозиция стронция) и на территории, где используется гиперхлорированная вода (экспозиция хлороформа), имели различия с детьми соответствующих групп сравнения только степенью содержания в биосредах приоритетных химических веществ, дает возможность утверждать, что возникающие нарушения в функциональной активности иммунной системы, включающей дисбаланс регуляции клеточной гибели, обусловлены именно средовыми компонентами – стронцием и хлороформом.

Выполненный гигиенический анализ состояния окружающей среды позволяет выделить и обосновать выбор приоритетных территорий (на примере Пермского края), а также химических веществ природного (на примере стронция) и техногенного (на примере хлороформа) происхождения для дальнейшего исследования.

Результаты, полученные в данном исследовании, соответствуют сведениям, представленным в литературном обзоре, отражают общемировые тенденции, но вместе с тем характеризуют немаловажные территориальные особенности [18, 22, 57, 63, 65, 79, 92, 311].

В данном исследовании выполнены статистический анализ уровня, структуры, динамики заболеваемости и оценка риска формирования заболеваний органов и систем, патогенетически связанных с иммунной системы, в условиях негативного воздействия химических факторов питьевой воды (щелочно–земельные металлы и галогенорганические соединения). Проанализированы болезни и нозологии, этиологически связанные с воздействием некачественной питьевой воды: заболевания костно-мышечной системы (стронций) и заболевания гепатобилиарного тракта (хлороформ) [45, 57].

Анализ заболеваемости детского населения РФ за 2006–2017 гг. по данным статистических материалов «Заболеваемость населения России» Министерства здравоохранения Российской Федерации свидетельствует, что значимый вклад в формирование показателя общей и первичной заболеваемости детей (0–14 лет) вносят отдельные классы болезней, в том числе иммуноассоциированные:

болезни органов пищеварения, болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Необходимо подчеркнуть, что костно-мышечная система находится в тесной взаимосвязи с системой иммунитета общностью происхождения и функций [156, 246, 391, 422]. Гепатобилиарный тракт тесно координирует с окружающими его органами и системами, среди которых важнейшей является иммунная система [112, 211]. Очевидно, формирование патологических процессов в костно-мышечной системе или печени может спровоцировать нарушение функций всего организма.

Результаты настоящего исследования демонстрируют существенные различия общей и первичной заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани среди детского населения в разных регионах РФ. Следует отметить, что только за два года (с 2006 по 2008 г.) уровень общей заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани в целом по России увеличился с 8029,8 до 8187,7 сл. на 100 тыс. детского населения (темп прироста составил 2 %), а в Приволжском федеральном округе – с 8988,6 до уровня 9227,7 сл. на 100 тыс. детского населения (2,7 %), т.е. значительно превышен общероссийский показатель. Уже в 2014–2016 гг. темп прироста в Северо-Западном федеральном округе составил 18,7 %, Приволжском федеральном округе – 4,4 %, Сибирском федеральном округе – 7,2 %.

Анализ динамики первичной заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани среди детского населения в период 2006–2008 гг. показывает повышение регистрации данной патологии в целом по Российской Федерации с 3843,9 до уровня 4004,6 сл. на 100 тыс. детского населения (4,2 %), на территории Приволжского федерального округа – с 4264,5 до 4658,1 сл. на 100 тыс. детского населения (9,2 %), что в 2,2 раза выше общероссийского уровня. В период 2014–2016 гг. – распространённость болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани у детей (0–14 лет), проживающих в Пермском крае, на 10-20 % превышает средний уровень по стране.

Анализ динамики патологии желудочно-кишечного тракта среди детского населения Российской Федерации с 2006 по 2016 г. свидетельствует о снижении первичной заболеваемости с 8508,5 до 7128,4 сл. на 100 тыс. детского населения (темпы убыли 16,2 %), общей заболеваемости – с 15221,6 до 13133,1 сл. на 100 тыс. детского населения (темпы убыли 13,7 %). В то же время сегодня болезни органов пищеварения в структуре общей заболеваемости продолжают занимать ведущее место. Важно подчеркнуть, что общая тенденция к их росту отмечается в отдельных регионах страны. Так, в период 2006–2016 гг. высокий уровень заболеваемости и значительные темпы прироста заболеваний органов пищеварения зарегистрированы в Пермском крае – с 15943,4 до 19731,0 сл. на 100 тыс. детского населения (прирост составил 24 %). Результаты оценки официальных статистических данных демонстрируют, что уровень общей заболеваемости детского населения РФ болезнями печени за 2012–2016 гг. увеличился с 40,9 до 44,0 сл. на 100 тыс. детского населения (5,8 %). Результаты гигиенической оценки заболеваемости детского населения, ассоциированной с особенностями формирования территориальной средовой гаптенной нагрузки, показывают, что в период с 2012 по 2016 г. в отдельных регионах РФ темпы прироста заболеваемости болезнями печени в 34 раза превышал общероссийский (Дагестан (Северо-Кавказский федеральный округ) – повышение с 100,9 до 128,5 сл. на 100 тыс. детского населения (27,4 %), Курганская область (Уральский федеральный округ) – с 137,0 до 254,9 сл. на 100 тыс. детского населения (86 %), Хакасия (Сибирский федеральный округ) – с 69,9 до 208,6 сл. на 100 тыс. детского населения (198,4 %)). В 2010–2015 гг. до 5 раз отмечаются превышения общероссийских показателей общей и впервые выявленной патологии печени на территории Пермского края.

В ходе настоящего исследования выполнено разделение субъектов Российской Федерации по уровню заболеваемости детского контингента болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани / болезнями гепатобилиарного тракта и уровню санитарно-эпидемиологического благополучия. Пермский край (Приволжский федеральный округ) относится к

территории с очень высоким риском нарушения здоровья детского населения (превышение общероссийских показателей общей / впервые выявленной патологии костно-мышечной системы и соединительной ткани и печени, ассоциированных с иммунной системой) в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция) и галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

Выполненные исследования демонстрируют, что первичная и общая заболеваемость среди детского населения ПК болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани, болезнями органов пищеварения также значительно отличается. Так, на территории стронциевой геохимической провинции с 1992 по 2014 г. показатели общей и впервые установленной заболеваемости болезнями костно-мышечной системы выросли в 4 и 2 раза соответственно. В период 1992–2007 гг. анализируемые показатели на данной территории в отдельных случаях до 5 раз превышали среднекраевые. По сравнению с 1992 г. на территории стронциевой геохимической провинции в 2014 г. значительно увеличилась заболеваемость детей болезнями костно-мышечной системы – с 40,37 до 144,37 на 1000 детского населения (257,6 %), в том числе впервые выявленной с 39,32 до 76,42 сл. на 1000 детского населения (94,4 %). По классу болезней органов пищеварения в 1992–2016 гг. регистрируется наибольший рост общей и впервые выявленной заболеваемости на территории, где используется гиперхлорированная вода, – более чем в 2 раза (темп прироста составил 99,7 и 91,7 % соответственно), что при этом в 3 раза превышает соответствующие показатели по Пермскому краю в целом. Заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани в структуре первичной и общей заболеваемости детского населения стронциевой геохимической провинции в 2014 г. занимали 3-е ранговое место, тогда как в 2007 г. – 7-е ранговое место. На территории, где используется гиперхлорированная вода, заболевания органов пищеварения в структуре первичной и общей заболеваемости детского населения в 2014 г. занимали 2-е ранговое место, а в 2010 г. – 5-е место. Распространенность болезней костно-

мышечной системы и соединительной ткани, а также заболеваний желудочно-кишечного тракта у детей, проживающих на данных территориях, имеют тенденцию к повышению.

Стабильно более высокие уровни заболеваемости по обращаемости детского населения по поводу болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00–M99), в развитии которых ключевая роль принадлежит иммунной системе, были выявлены на территории стронциевой геохимической провинции, что может быть обусловлено повышенным содержанием стронция в питьевой воде. На территории, где используется питьевая вода ненормированного качества по содержанию стронция, в 2 раза чаще, чем на территории относительного санитарно-гигиенического благополучия, регистрируются заболевания костно-мышечной системы. Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с развитием заболеваний у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани ($OR = 3,08$; 95% ДИ = 2,09-4,085; $p < 0,05$). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки у детей, проживающих на территории наблюдения, с развитием вальгусной деформации не классифицированной в других рубриках ($OR = 2,36$; 95% ДИ = 1,04-5,34; $p < 0,05$).

При пероральном поступлении в организм стронция критическим органом / системой является костная система, при хроническом поступлении галогенорганических соединений с питьевой воды – печень. У детского населения, проживающего на территории стронциевой геохимической провинции, неприемлемый неканцерогенный риск развития патологии костно-мышечной системы до 61 % обусловлен стронцием.

Ведущими заболеваниями, определяющими состояние здоровья детского населения, проживающего на территории, характеризующейся повышенным уровнем микробиологического загрязнения поверхностных вод, что требует обеззараживания воды хлором и его соединениями [311], являются заболевания желудочно-кишечного тракта. Распространенность заболеваний органов

пищеварения у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием галогенорганических соединений, за последние десять лет выросла на 12 % и регистрируется на неизменно высоком уровне. Как показано исследованиями на территории, где используется гиперхлорированная питьевая вода, обращаемость за медицинской помощью при возникновении заболеваний гепатобилиарного тракта в 4,7 раза выше, чем на территории, где потребляется качественная питьевая вода по содержанию хлороформа. Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с нарушением целостности гепатоцитов у детей, потребляющих гиперхлорированную воду ($OR = 13,5$; 95% ДИ = 7,48-24,41; $p < 0,05$).

При хроническом поступлении галогенорганических соединений с питьевой воды формируются неприемлемые неканцерогенные риски развития патологии гепатобилиарного тракта на уровне до 1,54 *HI*. Среди факторов, влияющих на качество воды на территории, где используется гиперхлорированная вода, ведущее место по величине коэффициента опасности (*HQ*) занимает хлороформ (*HQ* до 1,28).

Выявленные нарушения здоровья у обследуемых детей являются адекватными внешнесредовой нагрузке и соотносятся с установленными научными сведениями, полученными в проведенных эпидемиологических исследованиях, в том числе и по патогенезу развития ассоциированных патологических процессов [112, 123, 185, 319, 374, 406, 418, 421, 422].

Результаты, полученные в ходе гигиенического анализа состояния качества окружающей среды приоритетных территорий, изучения особенностей заболеваний костно-мышечной системы и гепатобилиарного тракта у детей, проживающих на приоритетных территориях, проведенной оценки риска здоровью детского населения, верифицируют сведения ранее выполненных гигиенических и эпидемиологических исследований.

Результаты гигиенической оценки заболеваемости детского населения Российской Федерации, ассоциированной с особенностями формирования территориальной средовой гаптенной нагрузки, значительно дополняют и

углубляют имеющиеся данные [22, 45, 57, 58, 61, 63, 65, 78, 85]. Так, было показано, что наиболее приоритетной патологией, в патогенезе которой значимая роль принадлежит дисфункции иммунной системы, у детского населения, проживающего на территориях с особенно неудовлетворительными показателями качества питьевой воды по содержанию химических веществ природного (на примере стронция) и техногенного (на примере хлороформа) происхождения, являются заболевания костно-мышечной системы соединительной ткани и заболевания желудочно-кишечного тракта соответственно.

Согласно современным представлениям иммунная система функционирует в тесной связи с окружающими ее органами, выполняет регуляторную деятельность [66, 104–107]. Продемонстрирована важнейшая роль иммунной системы в патогенезе возникновения и развития патологии костно-мышечной системы [112, 211, 246, 391, 422] и гепатобилиарной системы [155, 211, 406, 421]. По количеству дополнительных случаев заболеваний костно-мышечной системы и соединительной ткани, ассоциированных с качеством питьевой воды, к приоритетным территориям относятся те, на которых потребляется подземная вода с повышенным содержанием щелочно-земельных металлов (на примере стронция). Поступление в организм галогенорганических соединений (на примере хлороформа) с питьевой водой способствует развитию целого ряда негативных эффектов со стороны гепатобилиарного тракта, патогенетически связанного с иммунной системой. Неудовлетворительное санитарно-гигиеническое состояние поверхностных и подземных источников водоснабжения – один из ведущих факторов ухудшения качества питьевой воды на территории Пермского края.

Наличие причинно-следственных связей иммуноассоциированной заболеваемости с воздействием химических гаптен, поступающих в организм с питьевой водой, совпадают с данными современной научной литературы [14, 16, 43–45, 57, 65, 81, 82, 102, 145, 158, 182, 214, 216].

У детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, выявлены клинические особенности иммуноассоциированных нарушений (группа наблюдения). На основании анализа данных карт

индивидуального развития и результатов клинического обследования установлено, что среди детей группы наблюдения, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, патология опорно-двигательного аппарата встречалась в 6 раз чаще, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с формированием у детей с повышенным по отношению к референтному уровню содержанием стронция в крови формированием болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани ($OR = 12,65$; 95% ДИ = 7,94-20,17; $p < 0,05$), уплощенной стопы ($OR = 3,04$; 95% ДИ = 1,55-5,99; $p < 0,05$) и нарушения осанки ($OR = 13,26$; 95% ДИ = 7,57-23,25; $p < 0,05$). У детей, потребляющих питьевую воду ненормированного качества по содержанию стронция, установлена и параметризирована вероятностная причинно-следственная связь развития болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани с повышенным содержанием в крови стронция ($R^2 = 0,2$; $F = 9,0$; $p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что у детей, проживающих на территориях с неудовлетворительным качеством питьевой воды по санитарно-химическим показателям, преобладают заболевания опорно-двигательного аппарата, иммунопатологические механизмы при которых имеют доминирующее значение.

У детей, проживающих в условиях экспозиции галогенорганических соединений, поступающих с питьевой водой, выявлены клинические особенности иммуноассоциированных нарушений (группа наблюдения). Оценка состояния здоровья детей на основании анализа карт индивидуального развития ребенка выявила, что у 35,6 % обследованных детей территории наблюдения приоритетным видам патологии являются функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта. В ходе клинико-функционального обследования детей установлено, что в группе наблюдения и группе сравнения в качестве основного диагноза регистрировались болезни органов пищеварения (K00–K93; 63 и 37 % соответственно; $p < 0,05$). В ходе ультразвукового исследования органов брюшной полости только у 7,8 % детей, потребляющих гиперхлорированную воду, не выявлено какой-либо патологии со стороны

печени, в то время как в группе детей, потребляющих качественную питьевую воду, у 77,6 % детей не выявлено патологии гепатобилиарного тракта. Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с развитием у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, дискинезии пузырного протока и желчного пузыря ($OR = 2,78$; 95% ДИ = 1,93-4,01; $p < 0,05$). Очевидно, у детей, проживающих в условиях воздействия хлороформа, частота возникновения нарушений здоровья по ряду заболеваний гепатобилиарного тракта, вовлекающих иммунные механизмы, выше чем на территории сравнения.

Углубленное иммунологическое обследование позволяет выявить основные особенности и общие закономерности изменения индикаторных показателей клеточной гибели у детей с учетом территориальной гаптенной нагрузки, ассоциированной с загрязнением питьевой воды.

В ходе настоящего исследования обнаружены изменения индикаторных показателей, характерные для всех экспонированных групп (**закономерности**): снижение экспрессии CD3-рецептора, выполняющего сигналпередающую функцию и отвечающего за транспорт TCR к клеточной поверхности, посредством которого происходит распознавание процессированных антигенов и запуск иммунного ответа, в том числе и апоптоза; дефицит рецептора интерлейкина-2 (CD25), вовлеченного в раннюю активацию клеток; повышение процессов свободнорадикального окисления и накопление продуктов перекисного окисления липидов, потенцирующие изменения передачи и восприятия апоптогенного сигнала; ингибирование аннексинассоциированного апоптоза и переключение на альтернативный механизм клеточной гибели – некроз.

Вместе с тем в каждой из экспонированных групп, в зависимости от специфичности гаптенной нагрузки (щелочно-земельными металлами или галогенорганическими соединениями), имеются **особенности** изменений иммунологических и биохимических индикаторных показателей, характеризующие механизмы клеточной гибели.

При повышенном содержании стронция в крови обследуемых детей было найдено: снижение ресурсов антиоксидантной системы (снижение активности

ферментного звена), дефицит количества эффекторных клеток с цитотоксической активностью и регуляторных лимфоцитов, Th1-смещение цитокинового профиля, замедление экспрессии внутриклеточных антиапоптотических сигнальных белков, ослабление p53-зависимого контроля; снижение экспрессии рецепторов апоптоза семейства TNF, характеризующее угнетение рецепторопосредованного механизма реализации клеточной гибели, а также гиперэкспрессия рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B сигнальной системы активации остеокластов при снижении активности щелочной фосфатазы и костного изофермента щелочной фосфатазы, уровня остеокальцина, что свидетельствует об активности остеобластогенеза и замедлении процессов формирования костной ткани.

Результаты оценки причинно-следственных связей являются основой для научного обоснования на примере транскрипционного фактора p53 критериев оценки показателей клеточной гибели, ассоциированной с контаминацией стронцием: так, диапазону содержания стронция в крови 0,034-0,055 мг/дм³ соответствует диапазон транскрипционного фактора p53 1,50-1,88 % (малый риск), диапазону стронция в крови 0,056-0,09 мг/дм³ – диапазон p53 1,83-1,04 % (средний риск), диапазону стронция в крови 0,095-0,15 мг/дм³ – диапазон p53 0,99-0,55 % (высокий риск), диапазону стронция в крови 0,155-0,197 мг/дм³ – диапазон p53 0,52-0,33 % (чрезвычайно высокий риск).

В целом результаты собственных исследований, а именно выявленные ассоциации ремоделирования костной ткани с особенностями иммунной регуляцией, согласуются с современными литературными данными [176, 211, 246, 269, 320, 391, 326, 422]. Полученные данные предполагают особую значимость апоптоза в механизмах иммунорегуляции и в сопряженных с ней процессах формирования костной массы в условиях присутствия щелочно-земельных металлов (на примере стронция). В работе были предложены и обоснованы индикаторные показатели, характеризующие нарушения клеточной гибели, ассоциированные с избыточным поступлением в организм щелочно-земельных металлов (на примере стронция): CD3⁺, CD8⁺, FAS, CD25⁺127⁻, TNFR1, TNF α , bcl-

2, p53, VEGF, RANKL; LPO, MDA, GST, GPx, SOD, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин, Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клетки, Annexin V-FITC⁺PI⁻ - клетки.

Избыточное содержание галогенорганических соединений (на примере хлороформа) в крови обследуемых детей характеризовалось: интенсификацией активности реакций антиокислительной защиты, снижением уровня эффекторных клеток с хелперной активностью, активацией гуморального звена иммунитета, гиперпродукцией цитокинов Th₂, повышением экспрессии антиапоптотических внутриклеточных белков семейства BCL-2, ингибированием митохондриального механизма реализации регулируемой клеточной гибели, снижением синтетической функции печени, явлениями холестаза, нарушением целостности гепатоцитов.

Сопоставление полученных результатов, характеризующих нарушения апоптоза при экспозиции галогенорганических соединений, с современными научными сведениями отечественных и зарубежных авторов, позволяет сделать вывод, что иммунная система функционирует в тесной взаимосвязи с гепатобилиарной системой [211, 266, 406, 421], а феномен апоптоза – это ключевое звено в развитии ряда заболеваний печени [140, 217, 284, 344]. Потребление питьевой воды с повышенным содержанием галогенорганических соединений способствует формированию нарушению работы печени, которая совместно с иммунной системой участвует в поддержании структурного и функционального гомеостаза организма. Полученные результаты позволяют предложить в качестве индикаторных показателей нарушения клеточной гибели в условиях избыточного поступления в организм галогенорганических соединений (на примере хлороформа): LPO, MDA, AOA, GPx, SOD, IL4, IL6, IL10, IL1 β , bcl-2, общий белок, альбумины, АСТ, АЛТ, билирубин общий, билирубин прямой, печеночная фракция изофермента щелочной фосфатазы, CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, NKT, Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клетки, Annexin V-FITC⁺PI⁻ - клетки.

Риск нарушения адаптационных возможностей организма, в том числе и возможность реализация генетически запрограммированной клеточной гибели по

определенному сценарию в условиях экспозиции находится в зависимости от конкретного химического вещества, воздействующего на организм. Химические соединения, выступающие в роли гаптен, способны нарушать компенсаторные свойства организма. Одним из важнейших адаптационных механизмов, обеспечивающих поддержание постоянства внутренней среды в условиях химической нагрузки, является иммунная система [106, 112]. Воздействие химических факторов различной степени выраженности создает условия для возникновения устойчивых предпосылок формирования дисфункции иммунной системы у детей, что может проявляться в нарушении клеточной гибели [21]. Однако степень дисфункции иммунной системы зависит не только от характера и продолжительности воздействия химического фактора, но и от компетентности организма, его потенциальных, резервных возможностей.

Таким образом, сведения современной отечественной и зарубежной научной литературы, представленные в предыдущих главах, полностью подтверждают результаты собственных исследований. Вместе с тем в ходе настоящего исследования установлены новые данные о территориальных особенностях и общих закономерностях формирования иммуноассоциированной патологии у детей в условиях поступления гаптен с питьевой водой, более детально и углубленно изучены клинико-патогенетические механизмы развития заболеваний, ассоциированных с типом клеточной гибели, при экспозиции химических компонентов природного (на примере стронция) и техногенного (на примере хлороформа) происхождения. Выполненные углубленные исследования позволяют выявить общие закономерности и особенности изменения клеточной гибели у детей, проживающих на территориях с различной степенью загрязнения питьевой воды компонентами природного и техногенного происхождения.

Генетический анализ детализирует особенности генетического статуса детей, потребляющих некачественную питьевую воду (экспонированные группы). Восприимчивость организма к воздействию химических факторов в значительной мере зависит от генетических особенностей, определяющих состояние внутриклеточных белков, белков внеклеточного матрикса, белков эндотелия

сосудов и др. К ведущим полиморфизмам, реализующим взаимодействие факторов окружающей среды и процессов иммунологического гомеостаза, относятся полиморфизмы патогенетических генов, в том числе транскрипционного фактора 53 (*TP53*). Ген *p53* – онкосупрессор, его продукт белок *p53* контролирует ответ клетки на повреждения клетки химическими агентами, в том числе и щелочно (донозологическая диагностика) земельными металлами. У детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция, выявлен измененный генетический полиморфизм *TP53 rs17884159*. Показано, что у детей с генотипом *TT* снижена экспрессия белка *p53* в клетках по сравнению с детьми, имеющими другие генотипы. Полученные результаты указывают на наличие негативной генетической вариабельности с предрасположенностью к онкологическим заболеваниям и аутоиммунной патологии, в патогенезе которых ключевая роль принадлежит нарушению реализации апоптоза, включая и *p53*-регулируемый.

Гибель клетки в результате воздействия хлороформа зависит от многих причин: поглощение и распределение в органе-мишени, генерации токсических метаболитов фосгена и HCl , детоксикации этих продуктов, клеточного повреждения метаболитами, которые не детоксицированы, а также устранения клеточного повреждения. При достаточно низких дозах детоксикация и репарация являются защитными, а не цитотоксическими эффектами. Когда величина воздействия значительно возрастает, будет достигнута точка, где защитные возможности клетки будут превышены, и наиболее чувствительные клетки в органе-мишени (печень) начнут погибать. Негативный эффект оказывает и длительность экспозиции хлороформом. Использование кинетической модели доказало, что именно скорость метаболизма хлороформа является преобладающим фактором, когда гепатоцит вступает в апоптоз / некроз [158]. У детей, потребляющих гиперхлорированную воду, выявлен измененный генетический полиморфизм *CYP1A1 Ile462Val* (гена I фазы детоксикации) и *MMP9 Gln279Arg* (стимулятор появления ROS), а также их ассоциация с контаминацией биосред хлороформом и специфическим иммунологическим

ответом. Представленные результаты подтверждают активизацию процессов свободнорадикального окисления, провоцирующих нарушение равновесия в системе «окисление–антиокисление» с последующим истощением антиоксидантной системы, дисбаланс в многоуровневой системе детоксикации ксенобиотиков. Показана роль генетического полиморфизма в регулировании процессов биотрансформации и координировании апоптогенного сигнала [51].

Представленные данные подтверждают результаты ранее проведенных гигиенических, клинико-лабораторных исследований. Результаты, полученные при выполнении исследования, обеспечивают раннее выявление генетической основы развития различных патологических процессов, в формировании которых иммунной системе принадлежит важнейшая роль, а также осуществление эпидемиологического прогнозирования генетической устойчивости / чувствительности населения, проживающего в различных субъектах РФ, к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая гаптены природного и техногенного происхождения, поступающие с питьевой водой. Результаты, полученные в данной работе, обосновывают включение *TP53 rs17884* в условиях экспозиции щелочно–земельных металлов (на примере стронция), а *CYP1A1 Ile462Val* и *MMP9 Gln279Arg* в условиях экспозиции галогенорганических соединений (на примере хлороформа) в качестве индикаторных показателей нарушения клеточной гибели при избыточном поступлении химических веществ природного и техногенного происхождения в организм.

Анализ связей между индикаторными показателями клеточной гибели и химическими веществами в крови патогенетически обосновывает механизмы реализации клеточной гибели, обусловленные конкретным химическим веществом. Научно подтверждены безопасные уровни гаптен в крови на основе анализа причинно-следственных связей показателей иммунного, биохимического статуса с содержанием апоптогенных химических факторов в крови.

Детектированные изменения иммунологических, биохимических, генетических индикаторных показателей, верифицированные экспериментально, а также полученными адекватными математическими моделями свидетельствуют о

возможности использования ряда показателей иммунного и биохимического статуса в качестве индикаторных показателей для ранней индикации гаптенассоциированных нарушений иммунной системы, характеризующейся дисрегуляцией процесса реализации клеточной гибели. В ходе настоящего исследования проведено обоснование индикаторных показателей иммунных эффектов, а также их критериальных уровней в условиях средовой экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция) и галогенорганических соединений (на примере хлороформа).

Так, в условиях избыточного поступления стронция в организм отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с накоплением продуктов пероксидации и последующим истощением компенсаторных ресурсов ($OR = 3-10$; 95% ДИ = 2,3-15,0; $p < 0,05$). Нарушение баланса в системах генерации и детоксикации ROS приводит к каскаду событий, идущих на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и системном уровне. Отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с повышением мобилизация кальция из тканей костей, в результате протекающих в организме остеорезорбтивных процессов, а также снижения процесса костеобразования при повышении стронция в крови ($OR = 2-4$; 95% ДИ = 1,3-9,0; $p < 0,05$). Углубленный анализ причинно-следственных связей указывает на то, что стронций в изучаемых концентрациях повышает экспрессию цитокинов Th1-лимфоцитов и снижает Treg, дозозависимо модифицирует рецепторопосредуемый апоптоз и p53-зависимый апоптоз иммунокомпетентной клетки, приводя к переключению апоптотической программы клетки на некроз ($OR = 2-11$; 95% ДИ = 1-18; $p < 0,05$), ($R^2 = 0,10-0,80$; $F > 10$; $p < 0,05$).

На основе построения математических моделей логистической регрессии, описывающих значимые вероятностные причинно-следственные связи «химический фактор в крови – индикаторный показатель», проведено обоснование недействующих уровней содержания стронция в крови. Для стронция реперный уровень по критерию снижения Treg – 0,017 мг/дм³.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют, что у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция, происходит дисбаланс в системе «костеобразование–костная резорбция», нарушается передача апоптогенного сигнала на уровне межклеточного (индикаторные показатели: цитокины), мембранного (индикаторные показатели: рецепторный аппарат), внутриклеточного (индикаторные показатели: внутриклеточные белковые факторы) взаимодействия. Полученные результаты указывают, что нарушение реализации гибели клетки может быть обусловлено не только прямым воздействием токсиканта, но и спектром опосредованных механизмов, в том числе и генетических, реализация которых сопряжена с экспозицией приоритетного загрязнителя.

Результаты оценки причинно-следственных связей и выявления тропности влияния щелочно–земельных металлов послужили основой для научно-методического обоснования и разработки системы иммунологических, биохимических и генетических индикаторных показателей нарушения клеточной гибели в условиях избыточного поступления в организм с питьевой водой стронция.

На основании собственных исследований и анализа источников литературы предложена модель формирования особенностей метаболизма, молекулярных механизмов ремоделирования костной ткани (сопряженные во времени процессы локальной резорбции и формирования кости) и регуляция этих процессов под контролем факторов, связанных с иммунной системой.

В то же время в условиях избыточного поступления галогенорганических соединений в организм с питьевой водой отношение шансов показывает связь гаптенной нагрузки с активизацией процессов свободнорадикального окисления с накоплением продуктов пероксидации и активацией реакций антиокислительной защиты с участием неферментативного и ферментативного звена, снижением синтетической функции печени и повышением холестаза, нарушением целостности гепатоцитов ($OR = 2-17$; 95% ДИ = 1-80; $p < 0,05$), ($R^2 = 0,10-0,70$; $F > 20$; $p < 0,05$); субпопуляционным дисбалансом, повышенной выработкой

цитокинов Th2-профиля, ингибированием митохондриального механизма реализации апоптоза, угнетением клеточной гибели по пути апоптоза и активацией гибели клетки путем некроза ($R^2 = 0,10-0,70$; $F > 20$; $p < 0,05$).

На основе построения математических моделей логистической регрессии, описывающих значимые вероятностные причинно-следственные связи «химический фактор в крови – индикаторный показатель», выполнено обоснование недействующих уровней содержания галогенорганических соединений в крови. Для хлороформа реперный уровень по критерию повышения биохимических, иммунологических индикаторных показателей составил: для АСТ – $0,009 \text{ мг/дм}^3$, для LPO – $0,061 \text{ мг/дм}^3$, для TNF α – $0,002 \text{ мг/дм}^3$, для bcl-2 – $0,003 \text{ мг/дм}^3$.

По результатам оценки причинно-следственных связей и установления тропности галогенорганических соединений разработано научно-методическое обоснование тест-системы для идентификации ранних нарушений в иммунной системе, реализующихся в трансформации механизмов регуляции апоптоза, и включающей перечень иммунологических, биохимических и генетических индикаторных показателей, характеризующих особенности гаптенной нагрузки хлороформом.

Новые научные сведения, полученные в ходе эксперимента, значительно конкретизируют, уточняют и углубляют современные представления о путях и механизмах реализации клеточной гибели в условиях химического влияния. Результаты, полученные в ходе моделирования механизмов нарушения клеточной гибели в системе *in vitro* и *in vivo*, указывают на значимую роль стронция и хлороформа в модификации летальной программы клетки в условиях экспозиции.

В настоящей работе показано, что стронций в концентрации 7 мг / дм^3 , соответствующей ПДК для воды водных объектов, с высокой степенью достоверности ($p < 0,05$) ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели по пути некроза. Экспозиция стронция *in vitro* характеризовалась статистически значимым ($p < 0,05$) снижением экспрессии CD95-маркера, уровня белка p53 и количества Annexin V-

FITC⁺PI⁻ -клеток, а также статистически значимым ($p < 0,05$) повышением процентного содержания Annexin V-FITC⁺PI⁺ -клеток. Найдено, что длительное поступление с питьевой водой малых доз стронция нарушает способность иммунной системы мышей отвечать на антигенную стимуляцию. Результаты эксперимента *in vivo* показали, что на клетках периферической крови экспрессия CD62L⁺-маркера статистически значимо ($p < 0,05$) выше, чем на клетках селезенки. Снижение уровня CD62L на уровне вторичных лимфоидных органов является необходимым условием для реализации первичного иммунного ответа (следствие активационных процессов) [168].

Исследования *in vitro* свидетельствуют, что добавление хлороформа в концентрации 0,06 мг/дм³ статистически значимо ($p < 0,05$) снижает уровень Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клеток и статистически значимо ($p < 0,05$) повышает количество Annexin V-FITC⁺PI⁺ -клеток, статистически значимо ($p < 0,05$) повышает уровень bcl-2, контролирующего и регулирующего события митохондриального апоптоза, не изменяет активационный статус Т-лимфоцита (CD25⁺), не влияет на уровень p53 и не оказывает влияние на FAS-зависимый процессинг. Полученные результаты демонстрируют, что в диапазоне изучаемой концентрации хлороформа наблюдается переключение клеточной гибели по пути некроза на фоне нарушения барьерной функции митохондриальных мембран.

Результаты эксперимента в системе *in vitro* и *in vivo* верифицируют влияние стронция и хлороформа на регуляцию клеточной гибели в условиях экспозиции. Данные эксперимента согласуются с современными российскими и зарубежными научными сведениями и результатами собственных исследований, описывающих механизмы клеточной гибели, обусловленные химическими веществами природного и техногенного происхождения, представленными в соответствующих главах настоящего исследования.

Таким образом, основой механизмов формирования нарушений клеточной гибели в условиях избыточного содержания стронция и идентификации хлороформа в крови являются следующие иммунологические события:

- интенсификация процессов перекисного окисления липидов с накоплением первичных и вторичных продуктов липидной пероксидации, а также образование реактивного кислорода, обеспечивающего модуляцию апоптоза, ротацию липидного и белкового компонентов клеточных мембран и выполняющего функцию вторичного посредника при реализации лигандрецепторных взаимодействий; компенсаторное увеличение активности ферментативного звена антиоксидантной защиты в присутствии хлороформа и снижение активности ферментативного звена в условиях экспозиции стронцием; изменение передачи апоптогенного сигнала и дезорганизация работы митохондрий лимфоцитов в результате нарушения баланса между генерацией и удалением ROS;

- ослабление процессов регистрации и редукции антигенного сигнала с мембраны в клетку и способности лимфоцита отвечать на апоптогенный стимул;

- нарушение ранних активационных процессов, обеспечивающих адекватную дифференцировку наивных Т-лимфоцитов до зрелых форм;

- ингибирование передачи апоптогенного сигнала на уровне клеточной мембраны с участием белков семейства TNF и ингибирование внутриклеточных p53-регулируемых процессов при избытке стронция;

- нарушение межклеточной сигнализации, обеспечивающей интегральный клеточный ответ на антигенную стимуляцию, характеризующееся повышением сигналов, формирующих девиацию иммунного ответа в сторону Th1, при экспозиции стронцием и Th2-зависимой поляризацией Т-клеток в условиях негативного влияния хлороформа;

- дисбаланс белков семейства BCL-2, обеспечивающих контроль факторов митохондриозависимого апоптоза, проявляющийся активацией экспрессии bcl-2 в условиях экспозиции хлороформом и снижением уровня антиапоптозного белка при повышенном содержании стронция;

- стимуляция продукции белков острой фазы (позитивная – металлсвязывающие белки (SOD) и негативная – альбумины) с предпосылками формирования печеночно-клеточной недостаточности в условиях экспозиции

вещества техногенного происхождения с высокой тропностью к печени (хлороформ);

- активация остеокластогенеза и ингибирование остеобластогенеза в присутствии избыточного содержания гаптена, обладающего высокой тропностью к костной ткани (стронций);

- реализация полиморфизма гена, участвующего в p53-зависимом апоптозе при избытке стронция; реализация полиморфизма генов обеспечивающих детоксикацию и участвующих в пролиферации, миграции и дифференциации клеток при идентификации в крови хлороформа (гены цитохрома и металлопротеиназы);

- ингибирование регулируемого типа клеточной смерти и активация нерегулируемой гибели клетки, что характеризуется значимым снижением количества Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клеток при повышенной концентрации в биосредах гаптенов природного происхождения (на примере стронция) и значимым повышением содержания Annexin V-FITC⁺PI⁺ -клеток в присутствии в крови гаптенов техногенного происхождения (на примере хлороформа), которые в норме не должны обнаруживаться.

Проведено научное обоснование методологических подходов и системы индикаторных показателей раннего выявления и критериев нарушения клеточной гибели, модифицированной хронической водной гаптенной нагрузкой щелочно-земельными металлами (на примере стронция) и галогенорганическими соединениями (на примере хлороформа). Определение клеточной гибели (апоптоз / некроз) как системы индикаторных показателей позволило провести количественную оценку апоптоза, интегрирующую отдельные изменения иммунных компартментов: функции регуляторных и эффекторных клеток, сигнальных молекул, генетических и биохимических показателей, и констатировать преимущественное переключение реализации гибели лимфоцитов по пути некроза в условиях поступления гаптенов (на примере стронция и хлороформа) с питьевой водой.

В ходе углубленного анализа результатов исследования выполнено научно-методическое обоснование индикаторных показателей раннего выявления нарушений клеточной гибели и их критериальных уровней в условиях экспозиции щелочно-земельными металлами (на примере стронция): CD3⁺, CD8⁺, FAS, TNFR1, Treg, TNF α , VEGF, RANKL, p53, bcl-2, аннексиновый тест, GST, GPx, SOD, LPO, MDA, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин; маркеры чувствительности – *TP53 rs17884159*.

Результаты выполненного исследования послужили основой разработки и апробации системы индикаторных показателей для своевременного выявления нарушений клеточной гибели, в условиях воздействия галогенорганических соединений (на примере хлороформа) включающей: мембранные (CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, CD8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ аннексиновая метка), межклеточные (IL4, IL6, IL10, IL1 β), внутриклеточные (bcl-2), биохимические (АОА, GPx, SOD, MDA, LPO, общий белок, альбумины, АСТ, АЛТ, билирубин общий, билирубин прямой, печеночная фракция изофермента щелочной фосфатазы) и генетические маркеры (*CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg*).

Установленные в результате изучения состояния иммунной системы детского населения особенности и закономерности клеточной гибели верифицированы в процессе экспериментальных исследований, установления зависимостей воздействия химических гаптенных с развитием заболеваний, в патогенезе которых доминирующее значение отводится иммунитету. Представленные новые научные сведения уточняют, углубляют, суммируют и систематизируют известные базовые патогенетические механизмы формирования иммуноассоциированных нарушений у детей при влиянии гаптенных, поступающих с питьевой водой. Научные результаты собственных исследований полностью совпадают с данными современной отечественной и зарубежной научной литературы, существенно дополняют, углубляют и расширяют (выявленные новые связи, зависимости, подходы, методология) имеющиеся научные представления о механизмах и регуляции клеточной гибели при гаптенной экспозиции (щелочно-земельных металлов и галогенорганических

соединений). Предложена методология и научно обоснован комплексный подход к гигиеническому анализу закономерностей влияния гаптенон, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей.

ВЫВОДЫ

1. Концептуальная модель идентификации нарушений клеточной гибели, включающая иммунологические и генетические индикаторные показатели, позволила обосновать научные основы гигиенического анализа закономерностей влияния гаптенных, поступающих с питьевой водой, на иммунную систему у детей, конкретизировать и доказать научные представления о патогенезе клеточной гибели в условиях экспозиции щелочно-земельных металлов и галогенорганических соединений.

2. Гигиеническая оценка качества питьевой воды, выполненная на территории Российской Федерации в период 2010–2017 гг., позволила установить, что в 12 регионах доля нестандартных проб по содержанию природного стронция, обладающего тропностью к костной ткани и связанными с ней органами и системами, достигала 43 %; в 26 регионах доля нестандартных проб по содержанию галогенорганических соединений, потенциально способных оказывать негативное воздействие на печень, ассоциированную с иммунной системой, достигала 67 %. Гигиеническая оценка качества воды централизованных источников водоснабжения на территории стронциевой геохимической провинции позволила выявить, что доля нестандартных проб по содержанию стронция в воде составлял 16,7 %, концентрация стронция в питьевой воде достигала 1,2 ПДК, что выше аналогичной концентрации на территории сравнения в 10,9 раза; на территории, где используется гиперхлорированная вода, хлор остаточный свободный выше ПДК идентифицирован в 62,5 % пробах, хлор остаточный связанный – в 12,5 % пробах.

3. Анализ особенностей формирования состояния качества микрокомпонентного состава биологических сред у детей позволил выявить повышенный уровень содержания стронция в крови детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, по отношению к референтным (в 1,6 раз) и

контрольным (в 11,3 раза) значениям ($p = 0,001$). Анализ причинно-следственных связей позволил построить адекватные модели зависимости между концентрацией стронция в питьевой воде и концентрацией стронция в крови детей. Установлено, что на исследуемой территории с приоритетными компонентами загрязнения питьевой воды галогенорганическими соединениями, хлороформ идентифицирован в крови у всех обследованных детей, концентрации которого в норме не должны обнаруживаться. Получены параметризованные модели «доза хлороформа – концентрация хлороформа в крови».

4. Гигиенический анализ заболеваемости позволил установить, что темп прироста уровня общей заболеваемости у детей (0-14 лет) за 2014–2016 гг. болезнями: костно-мышечной системы и соединительной ткани в целом по РФ составил 1,4 %, болезнями печени – 5,8 %. Установлена связь гаптенной нагрузки с развитием заболеваний у детей, проживающих в условиях экспозиции стронция, болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани ($OR = 3,1$; 95 % ДИ = 2,1–4,1; $p < 0,05$). Длительное пероральное поступление стронция с питьевой водой формирует у экспонированного детского населения неприемлемый неканцерогенный риск развития болезней опорно-двигательного аппарата ($HI = 2,18$, где наибольший вклад в индекс опасности вносит стронций – до 61 %). Установлена связь гаптенной нагрузки у детей, потребляющих гиперхлорированную воду, с развитием дискинезии пузырного протока и желчного пузыря (K82.8) ($OR = 2,8$; 95 % ДИ = 1,9–4,0; $p < 0,05$). Установлено, что хроническое поступление галогенорганических соединений у экспонированного детского населения формирует индекс и коэффициент опасности для гепатобилиарной системы на уровне HI до 1,54; HQ до 1,28).

5. По результатам углубленной комплексной сравнительной оценки иммунного статуса обследуемых детей выявлены общие **закономерности** изменения клеточной гибели, обусловленные, как щелочно–земельными металлами, так и галогенорганическими соединениями, поступающими с питьевой водой: активация процессов свободно-радикального окисления с накоплением продуктов пероксидации (при повышенном содержании стронция в крови уровень LPO

превысил контрольные значения на 65 % и MDA – на 38 %, при идентификации хлороформа – LPO на 40 % и MDA – на 25 %); сдвиг в субпопуляционном составе лимфоцитов (дефицит CD3⁺-клеток относительно контрольных значений до 18 %); ареактивность процессов ранней активации по уровню экспрессии CD25-рецептора; ингибирование апоптоза с переключением на альтернативный механизм клеточной гибели по пути некроза (Ann V-FITC⁺PI⁻; Ann V-FITC⁺PI⁺). Установлены **особенности** механизма реализации апоптоза индуцированного стронцием, характеризующиеся изменениями передачи апоптогенного стимула через рецепторы семейства TNF и p53-опосредованного пути проведения апоптогенного сигнала; **особенностями** апоптоза ассоциированного с хлороформом, является ингибирование митохондриальных апоптотических событий.

6. Выполнение углубленной комплексной сравнительной оценки иммунного статуса обследуемых детей при содержании стронция в крови выше референтного уровня 0,1235 [0,1188-0,1474] мг/дм³ позволила выявить **особенности** изменения показателей, участвующих в реализации апоптоза, характеризующиеся снижением: в среднем в 1,3 раза активности GST, GPx, SOD, щелочной фосфатазы, костного изофермента щелочной фосфатазы, уровня остеокальцина, абсолютного числа Treg и CD8⁺-лимфоцитов, количества CD95⁺-клеток, содержания VEGF; экспрессии TNFR1 и bcl-2 в 4 раза; уровня p53 и количества Ann V-FITC⁺PI⁻-клеток в 2,1 раза по сравнению с результатами, идентифицированными в группе сравнения ($p < 0,05$). Установлено повышение, относительно контрольных значений, экспрессии RANKL в 1,7 раза и TNF α в 2,8 раза, а также количества Ann V-FITC⁺PI⁺-клеток в 1,3 раза ($p < 0,05$).

7. При комплексном анализе иммунных нарушений, обусловленных недопустимой концентрацией хлороформа в крови 0,0058 [0,00089-0,0138] мг/дм³, выявлены **особенности** показателей, характеризующиеся снижением: в 1,2 раза процентного содержания CD4⁺-клеток; в 1,7 раза количества Ann V-FITC⁺PI⁻-клеток ($p < 0,05$); повышением: содержания билирубина прямого в сыворотке крови в 4 раза; активности печеночной фракции изофермента щелочной

фосфатазы в 2 раза; количества CD19⁺-клеток и НКТ в 1,2 раза; в 1,8 раза уровня bcl-2; количества Annexin V-FITC⁺PI⁺-клеток в 2,4 раза; продукции цитокинов Th2 типа IL4, IL6 с кратностью превышения 2,2 и 4,3 раза соответственно; в 1,43 раза экспрессии провоспалительного цитокина IL1 β и в 1,2 раз активности АСТ по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$). Обнаружено повышение активности SOD и GPx с кратностью превышения 1,5 раз и 2,2 раза соответственно относительно величин, зафиксированных в группе сравнения ($p < 0,05$), что характеризует условия окислительного стресса как приоритетные в переключении реализации клеточной гибели на механизм некроза.

8. По результатам проведенного научного обоснования и оценки **причинно-следственных связей** установлена зависимость **повышения** уровней ионизированного кальция, MDA, TNF α , RANKL, Ann V-FITC⁺PI⁺ ($R^2 = 0,2-0,8$; $F = 8-1741$; $p < 0,05$) от содержания в крови **стронция**, выявлена статистически значимая вероятность **снижения** показателей FAS, Treg, TNFRI, p53, VEGF, Annexin V-FITC⁺PI⁻, костного изофермента щелочной фосфатазы ($R^2 = 0,2-0,7$; $F = 5,4-638$; $p < 0,05$), что характеризует гаптенопосредованное угнетение процессов иммунорегуляции и ингибирование рецептор-зависимого и p53-регулируемого апоптогенного сигнала в клетке.

9. Выявлена зависимость, указывающая на снижение экспрессии CD3⁺, CD4⁺ общих белков, альбуминов ($R^2 = 0,4-0,8$; $F = 137-640$; $p < 0,05$) в присутствии **галогенорганических соединений** в крови; установлено повышение активности внутриклеточных ферментов GPx, SOD, а также количества MDA, LPO, CD19⁺, CD16⁺CD56⁺, bcl-2, IL1 β , IL4, IL6, IL10, АСТ, билирубина общего ($R^2 = 0,1-0,8$; $F = 8,7-1255$; $p < 0,05$) при повышении концентрации галогенорганических соединений в биосредах, что подтверждает гаптенассоциированную активацию процесса свободно-радикального окисления и напряжение функционального состояния системы антиоксидантной защиты организма на фоне субпопуляционного клеточного и цитокинового дисбаланса.

10. На основе научного обоснования, оценки причинно-следственных связей и построения математических моделей предложены недействующие (реперные)

уровни стронция в крови, изменяющие показатели клеточной гибели. Реперный уровень стронция в качестве лимитирующего по критерию снижения содержания Treg лимфоцитов составил 0,017 мг/дм³. На основе построения математических моделей обоснован реперный уровень содержания хлороформа в крови, который составил 0,003 мг/дм³ по критерию снижению CD4⁺; по критерию повышения TNF α – 0,002 мг/дм³; по критерию повышения bcl-2 – 0,003 мг/дм³; по критерию повышения АСТ – 0,009 мг/дм³.

11. Верификация в эксперименте особенностей нарушений клеточной гибели позволила смоделировать условия изменений летальной программы лимфоцита и экспериментально доказать, что стронций *in vitro*, в концентрации 7 мг/дм³, не превышающей недействующую концентрацию, снижает в 1,7 раза FAS-зависимый и p53-опосредованный апоптоз, ингибирует апоптоз по критерию Ann V-FITC⁺PI⁻ в 4,7 раза и стимулирует гибель клетки по пути некроза в 1,3 раза ($p < 0,05$). Установлено, что при внесении в культуру клеток хлороформа в концентрации 0,06 мг/дм³ происходит статистически значимое в 1,2 раза ингибирование апоптоза без угнетения CD95⁺-опосредованного и p53-опосредованного механизма клеточной гибели, одновременно в 1,4 раза повышается экспрессия bcl-2, а также количество клеток, гибнущих по механизму некроза (позитивных по PI) в среднем в 1,3 раза от исходного уровня ($p < 0,05$).

12. Научно обоснована система индикаторных показателей и их критериальных параметров в условиях влияния **стронция**, к которым относятся мембранные (CD3⁺, CD8⁺, FAS, TNFR, Treg, аннексиновая метка), транскрипционные (bcl-2, p53), межклеточные (VEGF, RANKL, TNF α) и биохимические (LPO, MDA, GST, Gpx, SOD, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин) индикаторные показатели, а также генетические маркеры (*TP53 rs17884159*). Установлено, что экспозиция стронция замедляет рецептор-зависимый (FAS, TNFR) и p53-регулируемый апоптоз, тем самым обуславливает особенности реализации апоптоза в условиях негативного воздействия щелочноземельных металлов.

13. Разработана и предложена тест-система индикаторных показателей для выявления нарушений клеточной гибели в условиях воздействия **хлороформа** включающая: CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, NKT, аннексиновую метку, IL4, IL6, IL10, IL1β, bcl-2, AOA, GPx, SOD, MDA, LPO, общий белок, альбумины, АСТ, АЛТ, билирубин общий, билирубин прямой, печеночную фракцию изофермента щелочной фосфатазы и *CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg*. Установлены достоверные ассоциации экспозиции хлороформа с активацией антиоксидантной системы (SOD, GPx) и элементами ингибирования митохондриального апоптоза, что характеризует особенности развития клеточной гибели в условиях влияния галогенорганическими соединениями.

14. Результаты исследования выявили, что хлороформ и стронций, идентифицированные в крови детей на уровне, превышающем реперные, референтные и контрольные значения, ингибируют апоптоз в ранней его фазе и включают развитие некроза, как преимущественный механизм и особенности патогенеза гибели клетки, что отражает закономерности клеточной гибели при хронической гаптенной нагрузке компонентами природного (щелочно-земельными металлами) и техногенного (галогенорганическими соединениями) происхождения.

15. Научно обоснованы рекомендации для раннего выявления нарушений клеточной гибели, обусловленной водной гаптенной нагрузкой, что позволяет использовать систему иммунологических и генетических индикаторных показателей для совершенствования системы индикации иммунорегуляторных нарушений и минимизации негативных последствий со стороны иммунной системы.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Для органов и организаций Роспотребнадзора. При анализе медико-гигиенической ситуации необходимо учитывать, что на территориях, где используется питьевая вода, не соответствующая гигиеническим нормативам по санитарно-химическим показателям, формируются риски дополнительных случаев заболеваний (заболевания костно-мышечной системы и гепатобилиарного тракта), в основе которых лежит нарушение клеточной гибели, тип нарушения которой опосредован воздействием конкретного химического вещества. В качестве критериев оценки могут быть применены реперные концентрации химических веществ в крови и обусловленные ими нарушения клеточной гибели.

Использование системы иммунологических и генетических индикаторных показателей и маркеров чувствительности нарушения клеточной гибели, ассоциированных с повышенной контаминантной нагрузкой биосред, позволит аргументированно разработать подходы к выявлению лиц с риском формирования дисфункции иммунной системы; способствовать разработке перспективных подходов к раннему выявлению донозологических состояний у населения, проживающего в неудовлетворительных санитарно-гигиенических условиях.

Использование комплекса иммунологических и генетических индикаторных показателей и критериев нарушения клеточной гибели, причинно-следственных связей в условиях гаптенной нагрузки необходимо для установления, предупреждения, устранения или уменьшения вредного влияния факторов среды обитания на здоровье человека.

Для медицинских организаций. Для своевременного выявления и установления степени выраженности нарушений функциональной активности иммунной системы, в частности, изменения клеточной гибели, при экспозиции щелочно-земельных металлов (на примере стронция), рекомендованы следующие индикаторные показатели клеточной гибели: мембранные (Annexin V-позитивные

лимфоциты, CD3⁺, CD8⁺, CD95⁺, CD4⁺25⁺127⁻, TNFR1), межклеточные (VEGF, RANKL, TNF α), внутриклеточные (bcl-2, p53), биохимические (LPO, MDA, GST, GPx, SOD, щелочная фосфатаза, костный изофермент щелочной фосфатазы, остеокальцин) и генетические маркеры чувствительности (*TP53 rs17884159*).

Для целенаправленной ранней индикации и прогнозирования функциональных нарушений иммунной системы (клеточной гибели) в условиях негативного средового воздействия галогенорганических соединений (на примере хлороформа) рекомендован перечень иммунологических, биохимических и генетических индикаторных показателей: CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, NKT, аннексиновая метка, bcl-2, IL1 β , IL4, IL6, IL10, AOA, LPO, GPx, SOD, MDA, печеночная фракция изоферментов щелочной фосфатазы, общие белки, альбумины, общий билирубин, билирубин прямой, АСТ, АЛТ, гены *CYP1A1 Ile462Val*, *MMP9 Gln279Arg*.

Для организаций и учреждений высшего образования. На основе углубленных и расширенных данных о механизмах программированной клеточной гибели, ее особенностях при экспозиции химических факторов осуществлять подготовку студентов медико-биологических специальностей и профессиональную переподготовку специалистов здравоохранения и специалистов в области охраны окружающей среды и экологической безопасности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Представленные результаты диссертационной работы делают возможным изложить основные направления исследования с перспективой их дальнейшего развития:

- дальнейшая разработка и последующее расширение номенклатуры химических веществ природного и техногенного происхождения, потенциально способных оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье детей, а именно на развитие заболеваний печени и костно-мышечной системы и соединительной ткани, патогенетически связанных с иммунной системой;
- дальнейшее совершенствование методов раннего выявления нарушений здоровья с учетом наиболее чувствительных групп населения с применением новейших методов иммунодиагностики и методов иммуногенетического мониторинга;
- переход от фиксации тех или иных вариантов иммунодефицитных состояний, вызванных химическими факторами, к своевременному их выявлению;
- укрепление доказательной базы для установления причинно-следственных связей патологических состояний, при которых иммунные механизмы имеют доминирующее значение, с приоритетными химическими факторами окружающей среды;
- моделирование и прогнозирование с дальнейшей верификацией в системе *in vitro* / *in vivo*, механизмов развития патологического процесса в условиях экспозиции химических веществ различного генеза;
- совершенствование системы применения маркеров экспозиции и индикаторных показателей эффекта для своевременного выявления и доказательства вреда здоровью при выполнении санитарно-эпидемиологических расследований, исследований, гигиенических оценок и экспертиз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОА – антиоксидантная активность

АЛТ – alanine aminotransferase, аланинаминотрансфераза

АСТ – aspartate aminotransferase, аспартатаминотрансфераза

ДДУ – детские дошкольные учреждения

ИФА – иммуноферментный анализ

МКБ – Международная классификация болезней

МКАТ – моноклональные антитела

МНС – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

НМХС – низкомолекулярные химические соединения

ОМС – обязательное медицинское страхование

ПДК – предельно допустимые концентрации

ПК – Пермский край

ПКС – программированная клеточная смерть

ФН – физиологическая норма

ФО – федеральный округ

ACD – accidental cell death, случайная гибель клеток

AhR – aryl hydrocarbon receptor, арил-гидрокарбоновые рецепторы

AIF – apoptosis inducing factor, фактор индукции апоптоза

Araf-1 – apoptotic peptidase activating factor 1, возбуждающий фактор апоптозной протеазы-1

AP1 – activator protein 1, фактор транскрипции, активирующий протеин-1

ARfC – референтный уровень острого воздействия

ARE – antioxidant responsive element, антиоксидант-респонсивный элемент

Ask 1 – apoptosis signal-regulating kinase 1, сигналрегулирующая апоптоз киназа 1

cAMP – cyclic adenosine monophosphate, циклический аденозинмонофосфат

CaR – Ca-чувствительный рецептор

DAG – diacylglycerol, диацилглицерол

DISC – death-inducing signaling complex, комплекс, индуцирующий смерть

DSH – Dishevelled, белок Дишевеллд

DWR – нормативы качества питьевой воды США

ERK 1/2 – extracellular signalregulated kinases, киназы, регулируемые внеклеточными сигналами

FGFR – fibroblast growth factor receptor, рецепторы фактора роста фибробластов

FITC – fluorescein isothiocyanate, флюоресцеина изоционат

FLIP – FLICE inhibitory protein, белок, ингибирующий FLICE

Frizzled, Fz – рецептором Фрайззлед

GM-CSF – colony stimulating factor granulocyte-macrophage, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

GPx– glutathione peroxidase, глутатионпероксидаза

GSH – glutathione, глутатион

GSK3 – glycogen synthase kinase-3, киназа 3 гликогенсинтазы

GSNO – S-нитрозоглутатион

GSSG – окисленный GSH

GST – glutathione transferase, глутатионтрансфераза

IP3 – inositol 1,4,5-trisphosphate, инозитол-1,4,5-трисфосфата

JAK – Janus kinase, Янус-киназы

JNK – c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-терминальная киназа

LPO – lipid hydroperoxide, гидроперекись липидов

MDA – malonic dialdehyde, малоновый диальдегид

MAPK – mitogen-activated protein kinase, митогенактивируемая протеинкиназа

MEK – MAP kinase kinase, киназа киназы MAP

mtGSH – митохондриальный глутатион

mTOR – mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина

NAD – nicotinamide adenine dinucleotide, никотинамидадениндинуклеотид

NCCD – Nomenclature Committee on Cell Death, Номенклатурный комитет по клеточной смерти

NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор κB

nGSH – ядерный глутатион

Nrf2 –NF-E2-related factor, NF-E2-связанный фактор 2

PARP – poly [ADP-ribose] polymerase, поли(АДФ-рибоза) полимеразы-1

PGAM5 – phosphoglycerate mutasefamily member 5, фосфоглицерат-мутаза 5

PI – propidium iodide, пропидиум иодид

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа phosphoinositide 3-kinases

PIP₂ – phosphatidyl inositol bisphosphate, фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат

PKC – protein kinase C, протеинкиназа C

PLC – phospholipase C, фосфолипаза C

POL – перекисное окисление липидов

PTEN – phosphatase and tensin homolog, липидная фосфатаза

RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа-B

RCD – regulated cell death, регулируемая гибель клеток

RIP1 – receptor -interacting protein 1, взаимодействующий с рецептором белок 1

RIPK3 – receptor-interacting protein kinase 3, рецептор протеинкиназы 3

ROS – активные формы кислорода

RfC – референтная концентрация при ингаляции

RfD – референтная доза, установленная в зарубежных странах

RfDR – максимальная недеятствующая доза по данным отечественных исследователей

RTK – receptor tyrosine kinases, трансмембранный тирозинкиназный рецептор

SOD – superoxide dismutase, супероксиддисмутаза

TCF / LEF – T cell factor / lymphoid-enhancer factor, Т-клеточный фактор и лимфоидный усиливающий фактор

Ψ – трансмембранная разность потенциалов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимова, Т.А. Основы экоразвития: учебное пособие / Т.А. Акимова, В.В. Хаскин / под ред. В.И. Видяпина. – М.: Изд-во Российская экономическая академия, 1994. – 312 с.
2. Альбицкий, В.Ю. Часто болеющие дети. Клинические и социальные аспекты: пути оздоровления / В.Ю. Альбицкий, А.А. Баранов. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1986. – 36 с.
3. Андрюков, Б.Г. Апоптозмодулирующие стратегии детерминант патогенности иерсиний / Б.Г. Андрюков, Н.Ф. Тимченко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – № 1(59) – С. 29–41.
4. Атопический дерматит у детей / под ред. А.А. Баранова, Л.С. Намазовой-Барановой. – М.: Педиатр, 2017. – 76 с.
5. Бабкина, О.А. Гидрохимия стронция и бария в хлоридно-натриевых минеральных водах и рассолах бассейна среднего течения р. Хопёр / О.А. Бабкина // Вестник ВГУ. Серия: Геология. – 2011. – № 1. – С. 236–240.
6. Бобылев, С.Н. Эколого-экономические индикаторы корпоративной ответственности / С.Н. Бобылев, А.В. Корнилова // Экономика природопользования. – 2017. – № 5. – С. 4–28.
7. Бова, А.А. Военная токсикология и токсикология экстремальных ситуаций: учебник / А.А. Бова, С.С. Горохов. – Минск: БГМУ, 2005. – 662 с.
8. Бурда, Д.В. Влияние аллогенных фибробластов и их супернатанта на экспрессию активационных маркеров мононуклеарами периферической крови *in vitro* / Ю.Е. Бурда, Д.В. Ершов // Фундам. исслед. – 2005. – № 5. – С. 43–43.
9. Венгеровский, А.И. Молекулярные механизмы действия бисфосфонатов и стронция ранелата / А.И. Венгеровский, И.А. Хлусов, К.А. Нечаев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 9. – С. 43–46.

10. Влияние гормона эпифиза мелатонина на желтые тела и апоптоз в яичниках животных, подвергавшихся воздействию высокой температуры / А.Л. Бочкарева, С. В. Мичурина, С.А. Архипов [и др.] // Материалы IV Съезда лимфологов России. – М., 2011. – С.104–105.
11. Высвобождение фактора некроза опухолей-альфа *in vitro* мононуклеарами периферической крови человека, вызванное цитостатиком этопозидом / М.П. Потапнев, Е.П. Вашкевич, Н.В. Петёвка [и др.] // Иммунология. – 2016. – № 5. – С. 253–255.
12. Газалиева, М.А. Генотоксические эффекты при воздействии соединений бериллия на организм рабочих / М.А. Газалиева // Медицина труда и промышленной экологии. – 2009. – № 9. – С. 32–36.
13. Гены детоксикации ксенобиотиков и их роль в развитии пневмонии / Л.Е. Сальникова, Т.В. Смелая, В.В. Мороз [и др.] // Общая реаниматология. – 2008. – Т. IV, № 6. – С. 9–15.
14. Гичев, Ю.П. Загрязнение окружающей среды и экологическая обусловленность патологии человека / Ю.П. Гичев. – Новосибирск: ГПНТБ СО РАН, 2003. – 138 с.
15. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; под ред. Н.Е. Бузикашвили и соавт. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
16. Григорьев, Ю.И. Оценка риска загрязнения питьевой воды для здоровья детей Тульской области / Ю.И. Григорьев, Н.В. Ляпина // Гигиена и санитария. – 2014. – № 3. – Р. 23–25.
17. Даянова, Р.Р. Заболеваемость населения России / Р.Р. Даянова // NovaIfo.Ru – 2016. – № 45. – С. 45–52.
18. Долгих, О.В. Регуляция стронцием апоптотического сигнала в иммунocyтах / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова // Биологические мембраны. – 2016. – № 1(33). – Р. 1– 5.
19. Животовский, Б.Д. Программируемая гибель клеток – медицине / Б.Д. Животовский // Химия и жизнь – XXI век. – 2014. – № 5. – С.8–13.

20. Зайцева, Н.В. Метод проточной цитометрии в диагностике нарушений показателей иммунной системы у детей, проживающих в условиях техногенной нагрузки / Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17), – № 2(1). – С. 60–61.
21. Зайцева, Н.В. Иммунная и нейроэндокринная регуляция в условиях воздействия химических факторов различного генеза / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова. – Пермь: Изд-во Пермь, 2016. – 236 с.
22. Зайцева, Н.В. Актуальные аспекты профилактики неинфекционных заболеваний, ассоциированных с воздействием факторов окружающей среды / Н.В. Зайцева // Российская гигиена – развивая традиции в будущее: материалы XII Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей – М., 2017. – С. 38–41.
23. Здоровье детей промышленно развитого региона / И.В. Яцына, Е.Л. Синева, А.В. Тулакин [и др.] // Гигиена и санитария. – 2015 – № 94(5). – С. 39–44.
24. Земсков, А.М. Problems of clinical immunology at the present stage / А.М. Земсков, В.М. Земсков, В.А. Земскова // Immunopathology, allergology, infectology. – 2014. – № 1. – P.88–92.
25. Зенков, Н.К. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, В.О. Ткачѳв // Кислород и антиоксиданты.– 2009.– № 1.– С. 3–64.
26. Иванов, С.В. Влияние качества воды на здоровье населения / С.В. Иванов, Э.Л. Федорова, Э.Э. Темиров // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. – 2017. – №2. – С. 186–189.
27. Иммунные механизмы патологии у детей / И.А. Тузанкина, В.А. Черешнев, И.А. Мальчиков [и др.]. – Екатеринбург, 2013. – 244 с.
28. Информационный бюллетень Центра теоретического анализа экологических проблем. – 2002. – № 10. – 7 с.
29. Кайгородова, Е.В. Апоптоз и белки теплового шока / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий. – Томск: Печатная мануфактура, 2012.– 188 с.
30. Калетина, Н.И. Микроэлементы биологические регуляторы / Н.И. Калетина, Г.И. Калетин. – М.: Наука в России, 2007. – Вып. 1. – 50 с.

31. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редоксзависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, Н.Д. Новичкова // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
32. Ковальчук, В.К. Роль окружающей среды в возникновении неинфекционных заболеваний пищеварительной системы в Приморском крае / В.К. Ковальчук, И.Л. Иванова, В.М. Калдаева // Гигиена и санитария. – 2011. – №3. – С. 10–15.
33. Кормош, Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода на клеточном уровне и организма в целом – взгляд клинициста. Часть. 2 / Н.Г. Кормош // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – № 1(11). – С. 85–90.
34. Коршунова, А.Ю. Патогенетические особенности клеточной гибели при альтерации миокарда различного генеза: дис... канд. мед. наук / А.Ю. Коршунова. – М., 2016. – 141 с.
35. Кравченко, Л.В. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса / Л.В. Кравченко, Н.В. Трусов, М.А. Ускова // Токсикологический вестник. – 2009. – № 1. – С. 12–17.
36. Кулинский, В.И. Обезвреживание ксенобиотиков / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999 – № 1. – С.8–12.
37. Кулинский, В.И. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55(3). – С. 255–277.
38. Кулинский, В.И. Глутатион ядра клетки и его функции / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – Вып. 6. – С. 657–662.
39. Курганова, Л.Н. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс / Л.Н.Курганова // Вестник ННГУ. Серия Биология. – 2001. – № 6. – С. 74–76.
40. Куцева, Н.К. Нормативы качества воды: взгляд аналитика / Н.К. Куцева, А.В. Карташова, А.В. Чамаев // Методы оценки соответствия. – 2012. – № 3. – С. 4–9.

41. Куценко, С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2001. – 395 с.
42. Лаврик, И.Н. Регуляция апоптоза, индуцируемого через CD95 / FAS и другие «рецепторы смерти» / И.Н. Лаврик // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 173–179.
43. Лазарева, Н.В. Механизмы неблагоприятного влияния экологических факторов на репродуктивную функцию, пути коррекции / Н.В. Лазарева, О.И. Линева // J. Health and Education Millennium. – 2017. – № 19(9). – С. 100–104.
44. Магомедова, Д.Р. Показатели роста и развития детей и подростков в зависимости от экологических условий проживания / Д.Р.Магомедова, З.И. Рашкуева // Известия ДГПУ. – 2013. – № 4(25). – С. 28–32.
45. Май, И.В. Медико-гигиенические проблемы урбанизированных территорий Пермского края с питьевым водоснабжением из поверхностных источников / И.В. Май, А.Т. Шарифов, Д.В. Силина // Урбанистика. – 2012. – № 1 (5). – С. 114–122.
46. Манский, В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В.Н. Манский // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909–915.
47. Маркова, Т.П. Длительно и часто болеющие дети / Т.П. Маркова, Д.Г. Чувиров // Русский медицинский журнал. – 2003. – № 3. – С. 125.
48. Методические подходы к идентификации особенностей генетического полиморфизма как маркера ранних нарушений адаптационных процессов в условиях хронической экспозиции химическими средовыми факторами / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, Д.Г. Дианова [и др.] // Актуальные вопросы медицины: материалы VII Ежегодной международной научно-практической конференции – Баку, 2018. – С. 38–40.
49. Методические подходы к ранней диагностике здоровья детского населения при влиянии факторов среды обитания / Н.П. Сетко, Ю.А. Ревазова, Н.В. Зайцева, А.Г. Сетко // Экология человека, гигиена и медицина окружающей среды на рубеже веков: состояние и перспективы развития: сб. матер. Всерос. конф. / под ред. акад. РАМН Рахманина Ю.А. – М.: Изд-во ФГБУ «ЦСП», 2006. – С. 431–434.

50. Многоликий P53: разнообразие форм, функций, опухольсупрессирующих и онкогенных активностей / Б.П. Копнин, П.Б. Копнин, Н.В. Хромова, Л.С. Агапова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2008. – Т. 5, № 1. – С. 10.
51. Морозова, К.В. Роль полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы в генезе невынашивания беременности / К.В. Морозова, Н.Н. Луценко // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2015. – № 2. – С. 54–61.
52. Мохосоев, И.М. «Распускание узла» четырех альфа-спиралей N-концевого домена при активации псевдокиназы MLKL индуцирует связывание белкового комплекса с мембраной и некроптоз клеток / И.М. Мохосоев // Наука в мире. – 2014 – № 7(1). – С. 21.
53. Недьведя, М.К. Перинатальная патология: учебное пособие / М.К. Недьведя. – М.: Выш. шк., 2012. – 575 с.
54. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и MAP-киназ ERK 1,2 / К.П. Василенко, Е.Б. Бурова, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский // Цитология. – 2006. – Т. 48(6). – С. 500–507.
55. Окружающая среда и здоровье детей и матерей. [Электронный ресурс]: информационный бюллетень №284. // Development Programm. – 2005. – URL:<http://www.undp.org/content/dam/aplaws/publication/en/publications/environmen> (дата обращения: 03.10.2016).
56. Онищенко, Г.Г. Влияние факторов внешней среды на здоровье человека / Г.Г. Онищенко // Иммунология. – 2006. – № 6. – С. 352–356.
57. Онищенко, Г.Г. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов / Г.Г. Онищенко, Н.В. Зайцева, М.А. Землянова; под ред. Г.Г. Онищенко. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 532 с.
58. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017. – 220 с.

59. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пермском крае в 2016 году. – Пермь: Управление Роспотребнадзора по Пермскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае», 2017. – 266 с.
60. Осипов, А.Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротенинов / А.Н. Осипов, Г.Г. Борисенко, Ю.А. Владимиров // Успехи биологической химии. – 2007. – № 47. – С. 259–292.
61. Основы оценки риска для здоровья населения при воздействии химических факторов, загрязняющих окружающую среду / Г.Г.Онищенко, С.М. Новиков, Ю.А. Рахманин [и др.]; под ред. Ю.А.Рахманина, Г.Г.Онищенко. – М.: НИИ ЭЧ и ГОС, 2002.– 408 с.
62. Особенности экспрессии маркеров апоптоза клетками кожи при старении / Т.Ю. Витрук, Н.В. Рязанцева, П.Н. Пестерев [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 2. – С. 23–28.
63. О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. – М.: Минприроды России; НИА-Природа, 2017. – 746 с.
64. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях: краткое методическое руководство / С.В. Сибиряк, С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка [и др.]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. – 59 с.
65. Пермский край в цифрах. 2017: краткий статистический сборник / Территориальный орган Федеральной службы государственной статистики по Пермскому краю. – Пермь, 2017. – 180 с.
66. Петров, Р.В. Проблемы реабилитации иммунной системы / Р.В. Петров, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2015. – № 1. – С.40–42.
67. Поворознюк, В.В. Остеоиммунология: иммунологические механизмы в патогенезе постменопаузального остеопороза / В.В. Поворознюк, Н.А. Резниченко, Э.А. Майлян // Репродуктивная эндокринология. – 2013. – № 6(14). – С. 17–22.

68. Поляновский, О.Л. ERBB – онкогены – мишени моноклональных антител / О.Л. Поляновский, Е.Н. Лебеденко, С.М. Деев // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – Вып. 3. – С. 289–11.
69. Попутников, Д.М. Повреждение клетки (патофизиологические аспекты): учебно-метод. пособие / Д.М. Попутников, В.И. Висмонт. – Минск: БГМУ, 2013. – 48 с.
70. Порядин, Г.В. Молекулярные и клеточные механизмы иммунопатологии (Состояние и перспективы развития исследований): актовая речь / Г.В. Порядин. – М.: РГМУ, 2008. – 48 с.
71. Потапнев, М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого / М.П. Потапнев // Иммунология – 2014. – № 2. – С. 95–102.
72. Применение принципов доказательности при оценке причинной связи нарушений здоровья населения с воздействием вредных химических веществ в окружающей среде / С.А. Горбанев, В.П. Чашин, К.Б. Фридман, А.Б. Гудков // Экология человека. – 2017. – № 11. – С. 10–17.
73. Проблемы проектирования и санитарно-эпидемиологической экспертизы проектов зон санитарной охраны подземных источников водоснабжения / С.А. Горбанев, А.М. Никуленков, Г.Б. Еремин и [и др.] // Гигиена и санитария. – 2018. – Т. 97, № 12. – С. 1152–1156.
74. Протективное действие аутокринных факторов цитотоксических Т-лимфоцитов в условиях химической гипоксии / Г.В. Луценко, М.В. Гречихина, Л.Г. Дьячкова [и др.] // Иммунология. – 2013. – Т. 34(5). – С. 251–254.
75. Проточная цитометрия в медицине и биологии / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев, В.А. Черешнев – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2013. – 552 с.
76. Пуриnergическая сигнализация в мезенхимных стромальных клетках / П.Д. Котова, Ю.И. Фадеева, О.А. Рогачевская [и др.] // Биологические мембраны. – 2015. – Т. 32, № 4. – С. 265–273.

77. Р 2.1.10.1920-04. Руководство по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 143 с.
78. Разработка методических подходов к идентификации особенностей генетического полиморфизма и экспрессии генов у детей в условиях воздействия химических средовых факторов на примере стронция / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, А.В. Кривцов [и др.] // Анализ риска здоровью. – 2016. – № 31. – С. 34–41.
79. Рахманин, Ю.А. Актуализация методических проблем регламентирования химического загрязнения окружающей среды / Ю.А. Рахманин // Гигиена и санитария. – 2016. – № 95(8). – С. 701–706.
80. Реакция иммунной системы и лимфоидной ткани на воздействие химических факторов окружающей среды [Электронный ресурс] / В.М. Боев, Д.А. Кряжев, В.В. Суменко [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 4. – URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26555> (дата обращения: 24.09.2017).
81. Ревич, Б.А. Экологические и климатические особенности некоторых российских мегаполисов / Б.А. Ревич, Н.В. Шартова, П.И. Константинов // Экологические проблемы промышленных городов: сб. науч. тр. по материалам 8-й Международной научно-практической конференции. – Саратов: Изд-во СГТУ. – 2017. – С. 71–74.
82. Резолюция IV Всероссийского съезда по охране окружающей среды. – М., 2013. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.mnr.gov.ru/regulatory/> (дата обращения: 30.05.2017).
83. Референтные значения содержания химических элементов в волосах взрослых жителей республики Татарстан / Н.А. Агаджанян, А.В. Скальный, Е.С. Березкина [и др.] // Экология человека. – 2016. – № 4. – С. 38–44.
84. Рёкен, М. Наглядная аллергология: пер. с англ. / М. Рёкен, Г. Гроверс, В. Бургдорф. – М.: Бином: Лаборатория знаний, 2017. – 238 с.
85. Россия в цифрах. 2016: Краткий статистический сборник, Росстат. – М., 2016. – 543 с.

86. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
87. CD95-дефицитные клетки сублинии Jurkat/A4, устойчивые к лекарственно-индуцированному апоптозу / А.А. Соколовская, Т.Н. Заботина, Д.Ю. Блохин [и др.] // Экспериментальная онкология. – 2001. – № 23. – С. 175–180.
88. Семинар ВОЗ по информационным системам в области здоровья населения в связи с состоянием окружающей среды Российской Федерации, г. Тула, 19-23 февраля 1997 г. [Электронный ресурс] // Заключения и рекомендации по перечню параметров здоровья населения и окружающей среды для использования в информационных системах. – URL: <http://koi.sci.aha.ru/ATL/ra91a.htm> (дата обращения: 10.10.2016).
89. Скибо, Ю.В. Методы исследования программируемой клеточной гибели: учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза» / Ю.В. Скибо, З.И.Абрамова. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.
90. Снеговой, А.В. Значение биомаркеров для определения тактики лечения и прогноза злокачественных опухолей. / А.В. Снеговой, Л.В. Манзюк // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12, № 4 – С. 166–170.
91. Собчак, Д.М. Значение растворимых форм дифференцировочных антигенов в прогнозировании течения опоясывающего герпеса и эффективности противовирусной и иммунокорректирующей терапии / Д.М. Собчак, Т.А. Свинцова, О.В. Корочкина // Современные технологии в медицине. – 2011. – № 4. – С. 70–74.
92. Совершенствование государственной политики в области обеспечения химической безопасности Российской Федерации на основе оценки риска здоровью / С.Л. Авалиани, С.М. Новиков, Т.А. Шашина, Н.С. Додина // Актуальные научные и научно-технические проблемы обеспечения химической безопасности России. К 80-летию со дня рождения лауреата Ленинской премии, академика РАН, генерал-лейтенанта Анатолия Демьяновича Кунцевича: сборник

статей II Российской конференции с международным участием. – М.: Изд-во МЦНИП, 2017. – С. 58.

93. Современный взгляд на механизмы и классификацию клеточной гибели / И.А. Дворяшина, Ю.И. Великородная, А.Я. Почепцов [и др.] // Вестн. ВолгГМУ. – 2016. – № 3(59). – С. 137–139.

94. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии / И.В. Кудрявцев, А.С. Головкин, А.В. Зурочка [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – № 6. – С. 461–482.

95. Содержание активированной формы антиапоптотического протеина Akt1 в лизатах клеток костного мозга при первичных миелодиспластических синдромах / Н.Н. Климкович, Н.В. Пивень, О.В. Красько [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № 2. – С. 10–15.

96. Соловьева, И.А. Роль P38 MAPK в развитии иммунного воспаления / И.А. Соловьева, И.В. Демко, Е.А. Собко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – Вып. 49. – С. 105–114.

97. Сравнительный анализ морфофункциональных показателей культуры гепатоцитов, выделенных из нормальной и патологически измененной печени крыс / Е.В. Байдюк, А.П. Ширяева, Н.Н. Безбородкина, Г.А. Сакута // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 10. – С. 797–805.

98. Супероксиддисмутаза и глутатионредуктаза при хроническом гепатите с и неалкогольной жировой болезни печени / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, К.Н. Суздальцева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7. – С. 455–459.

99. Суржиков, В.Д. Загрязнение атмосферного воздуха промышленного города как фактор неканцерогенного риска для здоровья населения / В.Д. Суржиков, Р.А. Голиков // Гигиена и санитария. – 2013. – № 1. – С. 47–49.

100. Тиц, Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам / Н. Тиц. – М.: ЮНИМед-Пресс, 2003. – 721 с.

101. Тяжелова, В.Г. TRAIL- и WNT-сигнальные пути в апоптозе / В.Г. Тяжелова // Иммунология. – 2005. – № 6. – С. 377–384.

102. Федько, Н.А. Влияние экологических факторов на аллергическую заболеваемость детского населения Карачаево-Черкесии / Н.А. Федько, А.С. Джанибекова // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2014. – № 9(1). – С. 30–31.
103. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. – М.: Медиасфера, 1998. – 348 с.
104. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы / Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медия, 2013. – 277 с.
105. Черешнева, М.В. Характер структурных изменений в глазном яблоке при экспериментальном сахарном диабете / М.В. Черешнева, С.Е. Смирных, И.Г. Данилова // Тезисы докладов X Съезда офтальмологов в России. – М., 2015. – С. 168.
106. Черешнев, В.А. Экология. Иммунитет. Здоровье / В.А. Черешнев – СПб.: СПбГУП, 2016. – 32 с.
107. Черешнев, В.А. Экология, мониторинг и здоровье людей / В.А. Черешнев, А.Г. Гамбурцев // Вестник РАН. – 2017. – № 87(2). – С. 121–129.
108. Четвертая конференция министров «Окружающая среда для Европы» [Электронный ресурс] / Европейский региональный комитет. Пятьдесят четвертая сессия. – Будапешт, Венгрия, 2004 г. – 14 с. – URL: <http://www.ecoaccord.org/> (дата обращения: 26.03.2016).
109. Чумаков, П.М. Белок р53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3–52.
110. Эльпинер, Л.И. Оценка риска некондиционных питьевых вод / Л.И. Эльпинер // Контроль качества продукции. – 2017. – № 5. – С. 57–60.
111. Эпидемиологические, токсикологические и молекулярно-генетические аспекты разрушителей эндокринной системы в проблеме химической безопасности / О.О.Синицына, Ю.А. Рахманин, З.И. Жолдакова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2018. – Т. 97, № 3. – С. 197–203.

112. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин, 2010. – М.: ГЭОТРА-МЕДИА. – 749 с.
113. 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 [et al.] // *Environ. Toxicol.* – 2014. – № 29(6). – P. 655–664.
114. 4SC-202 activates ASK1-dependent mitochondrial apoptosis pathway to inhibit hepatocellular carcinoma cells / M. Fu, F. Wan, Z. Li [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 471 (2).
115. 8-Cl-cAMP affects glioma cell-cycle kinetics and selectively induces apoptosis / O. Grbovic, V. Jovic, S. Ruzdijic [et al.] // *Cancer. Invest.* – 2002. – Vol. 20(7-8). – P. 972–982.
116. A class of environmental and endogenous toxins induces BRCA2 haploinsufficiency and genome instability / S.L.W. Tan, S. Chadha, Y. Liu [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 169 (6). – P. 1105–1118.
117. 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.
118. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death / J.M. Hildebrand, M.C. Tanzer, I.S. Lucet [et al.] // *PNAS.* – 2014. – Vol. 111. – № 42. – P. 15072–15077.
119. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin / S. Stenger, D.A. Hanson, R. Teitelbaum [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 282. – P. 121–125.
120. 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 [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2015. – № 35. – P. 689–698.
121. 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 [et al.] // *J. Med. Food.* – 2010. – № 13(4). – P. 870–878.

122. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie // *Br. J. Cancer.* – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.
123. Apoptosis as a mechanism of peripheral blood mononuclear cell death after measles and varicella-zoster virus infections in children / C. Pignata, M. Fiore, S. De Filippo [et al.] // *Pediatric Research.* – 1998. – № 43. – P. 77–78.
124. Apoptosis, in perspectives on mammalian cell death / J.F. Kerr, J. Searle, V. Harmon [et al.] // *Oxford university press.* – 1987. – Vol. 26. – P. 93–128.
125. Apoptosis-related (survivin, Bcl-2), tumor suppressor gene (p53), proliferation (Ki-67), and non-receptor tyrosine kinase (Src) markers expression and correlation with clinicopathologic variables in 60 thymic neoplasms / T. Khoury, A. Arshad, P. Bogner [et al.] // *Chest.* – 2009. – Vol. 136(1). – P. 220–228.
126. Apoptosis is induced by shikonin through the mitochondrial signaling pathway / X. Tang, C. Zhang, J. Wei [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2016. – № 13(4). – P. 3668–3674.
127. A quantitative real-time approach for discriminating apoptosis and necrosis / A. Lekshmi, S.N. Varadarajan, S.S. Lupitha [et al.] // *Cell. Death. Discov.* – 2017. – № 3. – P. 16101.
128. ATP modulates acute inflammation in vivo through dual oxidase 1-derived H₂O₂ production and NF-κB activation / S. Oliveira, A. López-Muñoz, S. Candel [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192(12). – P. 5710–5719.
129. Baar, M.P. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging / M.P. Baar, R.M. Brandt, D.A. Putavet [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 23, № 169(1). – P. 132–147.
130. Baines, C.P. Role of the mitochondrion in programmed necrosis / C.P. Baines // *Front. Physiol.* – 2010. – № 1. – P. 56.
131. Balance between short and long isoforms of cFLIP regulates Fas-mediated apoptosis in vivo / D.R. Ram, V. Ilyukha, T. Volkova [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – № 113(6). – P. 1606–1611.
132. Balendiran, G.K. The role of glutathione in cancer / G.K. Balendiran, R. Dabur, D. Fraser // *Cell. Biochem. Funct.* – 2004. – Vol. 22. – P. 343–352.

133. Barr, P.J. Apoptosis and its role in human disease / P.J. Barr, L.D. Tomei // *Biotechnology*. – 1994. – Vol. 12(5). – P. 487–493.
134. Barry, W.H. The hemodynamic effects of strontium chloride in the intact dog / W.H. Barry, A.M. Marlon, D.C. Harris // *Exp. Biol. Med.* – 1972. – Vol. 141 (1). – P. 52–58.
135. Bcl-2 delays cell cycle through mitochondrial ATP and ROS / X. Du, X. Fu, K. Yao K. [et al.] // *Cell. Cycle*. – 2017. – № 16(7). – P. 707–713.
136. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress / N. Susnow, L. Zhang, D. Margineantu [et al.] // *Semin Cancer Biol.* – 2009. – № 19(1). – P. 42–49.
137. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received / S.J. Dawson, N. Makretsov, F.M. Blows [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2010. – Vol. 103(5). – P.668–675.
138. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab / J. Iqbal, P.N. Meyer, L.M. Smith [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2011. – № 17. – P. 7785–7795.
139. BCL-2 regulates reactive oxygen species signaling and a redox-sensitive mitochondrial proton leak in mouse pancreatic β -Cells / M. Aharoni-Simon., R. Shumiatcher, A. Yeung [et al.] // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157(6). – P. 2270–2281.
140. Blossom, S.J. Exposure to a metabolite of the environmental toxicant, trichloroethylene, attenuates CD4⁺ T cell activation-induced cell death by metalloproteinase–dependent FASL shedding / S.J. Blossom, K.M. Gilbert // *Toxicol. Sci.* – 2006. – Vol. 92(1). – P. 103–114.
141. Bouchard, V.J. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage / V.J. Bouchard, M. Rouleau, G.G. Poirier // *Exp. Hematol.* – 2003. – Vol. 31(6). – P. 446–454.
142. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at Ig / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – Vol. 97. – P. 77–89.

143. Bozec, A. T regulatory cells *in* bone remodelling / A. Bozec, M.M. Zaiss // *Curr. Osteoporos Rep.* – 2017. – Vol. 15(3). – P. 121–125.
144. Breitwieser, G.E. Calcium sensing receptors as integrators of multiple metabolic signals / G.E. Breitwieser, S.U. Miedlich, M. Zhang // *Cell. Calcium.* – 2004. – Vol. 35(3). – P. 209–216.
145. Büdinger, L. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview / L. Büdinger, M. Hertl, L. Büdinger // *Allergy.* – 2000. – Vol. 55. – № 2. – P. 108–115.
146. Burgering, B.M. A brief introduction to FOXOlogy / B.M. Burgering // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – Issue 16. – P. 2258–2262.
147. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate / O. Fromigué, E. Haÿ, A. Barbara [et al.] // *JCMM.* – 2009. – № 13(8B). – P. 2189–2199.
148. Calcium signaling in T lymphocytes / V. Robert, E. Triffaux, M. Savignac [et al.] // *Med. Sci. (Paris).* – 2012. – № 28(8-9) – P. 773–779.
149. Cambier, J.C. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors / J.C. Cambier, C.M. Pleiman, M.R. Clark // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. – № 2. – P. 457–486.
150. Cardoso, E.M. CD8⁺ T cells in chronic periodontitis: roles and rules / E.M. Cardoso, F.A. Arosa // *Front. Immunol.* – 2017. – № 8. – P. 145.
151. Caverzasio, J. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth / J. Caverzasio, C. Thouverey // *Cellular Physiol. and Biochem.* – 2011. – Vol. 27, № 3-4. – P. 243–250.
152. CD95-Mediated murine hepatic apoptosis requires an intact glutathione status / H. Hentze, G. Kunstle, C. Volbracht [et al.] // *Hepatology.* – 1999. – Vol. 30. – P. 177–185.
153. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance / S. Dalleau, M. Baradat, F. Guéraud [et al.] // *Cell. Death. Differ.* – 2013. – Vol. 20. – P. 1615–1630.

154. Characterization and practical benefits of keratinocytes cultured in strontium-containing serum-free medium / F. Furukawa, J.C. Huff, M.B. Lyons [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 1988. – № 90. – P. 690–696.
155. Characterization of biliary intra-epithelial lymphocytes at different anatomical levels of intrahepatic bile ducts under normal and pathological conditions: numbers of CD4+CD28- intra-epithelial lymphocytes are increased in primary biliary cirrhosis. / K. Isse, K. Harada, Y. Sato [et al.] // *Pathol Int.* – 2006. – Vol. 56, №1. – P. 17–24.
156. Charles, J.F. / Bone and the innate immune system / J.F. Charles, M.C. Nakamura // *Curr osteoporos rep.* – 2014. – № 12(1). – P. 1–8.
157. Chen, M. Proteasomal processing of nuclear autoantigens in systemic autoimmunity / M. Chen, von A. Mikecz // *Autoimmun. Rev.* – 2005. – Vol. 4. – P. 117–122.
158. Chloroform inhalation exposure conditions necessary to initiate liver toxicity in female B6C3F1 mice / A.A. Constan, B.A. Wong, J.J. Everitt [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2002. – Vol. 66. – Issue 2. – P. 201–208.
159. Circu, M.L. Glutathione and apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // *Free. Radic. Res.* – 2008. – Vol. 42(8). – P. 689–706.
160. Clinicopathologic and genetic characterization of follicular lymphomas presenting in the ovary reveals 2 distinct subgroups / N. Ozsan, B.J. Bedke, M.E. Law [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2011. – № 35. – P. 1691–1699.
161. Coles, B.F. Human alpha class glutathione transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease / B.F. Coles, F.F. Kadlubar // *Methods in Enzymol.* – 2005. – Vol. 401. – P. 9–42.
162. Conour, J.E. A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. / J.E. Conour, W.V. Graham, H.R. Gaskins // *Physiol. Genomics.* – 2004. – Vol. 18(2). – P. 196–205.
163. Control of apoptosis in treatment and biology of pancreatic cancer / S. Modi, D. Kir, S. Banerjee [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2016. – Vol. 117. – Issue. 2. – P. 279–288.
164. Corrado, A. Osteoblast role in rheumatic diseases / A. Corrado, N. Maruotti, F.P. Cantatore // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18(6). – P. 1272.

165. Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia. / J.M. Lluís, A. Morales, C. Blasco [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 3224–3232.
166. Cross, J.V. Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain / J.V. Cross, D.J. Templeton // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 381. – P. 675–683.
167. Cwfaivre, S. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents / S. Cwfaivre, G. Kroemer, E. Raymond // *Nat. Rev. Drug Discovery.* – 2006. – № 5. – P. 671–688.
168. Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells / A. Klinger, A. Gebert, K. Bieber [et al.] // *Int. Immunol.* – 2009. – № 21(4). – P. 443–455.
169. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy / A. Showalter, A. Limaye, J.L. Oyer [et al.] // *Cytokine.* – 2017. – Vol. 97. – P. 123–132.
170. Cytotoxicity in vitro, cell migration and apoptotic mechanism studies induced by ruthenium(II) complexes / W. Li, B.-J. Han, J.-H. Yao [et al.] // *RSC Adv.* – 2015. – № 5. – P. 24534–24543.
171. Davis, M.M. Systems immunology: just getting started / M.M. Davis, C.M. Tato, D. Furman // *Nature Immunology.* – 2017. – № 18. – P. 725–732.
172. Deaths: Final Data for 2014 // *NVSS.* – 2016. – Vol. 65(5). – P. 1–95.
173. Def6 restrains osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption / N. Binder, C. Miller, M. Yoshida [et al.] // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198(9). – P. 3436–3447.
174. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x_L-binding interface using NMR / A.M. Petros, A. Gunasekera, N. Xu [et al.] // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 559. – P. 171–174.
175. Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice / H. Hentze, F. Gantner, S.A. Kolb [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 156. – P. 2045–2056.
176. Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with experimental periodontitis / L. Gao, Y. Zhao, P. Wang [et al.] // *IJBMS* – 2017. – Vol. 20(3). – P. 294–300.

177. Differential susceptibility of human Th1 versus Th2 cells to induction of anergy and apoptosis by ECDI/antigen-coupled antigen-presenting cells / A. Vandenbark, D. Barnes, T. Finn [et al.] // *Int. Immunol.* – 2000. – Vol. 12(1). – P. 57–66.
178. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis / J.E. Chipuk, T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes [et al.] // *Science.* – 2004. – Vol. 303. – P. 1010–1014.
179. Diseases associated with calcium-sensing receptor / C. Vahe, K. Benomar, S. Espiard [et al.] // *Orphanet J. of Rare Diseases.* – 2017. – № 12. – P. 19.
180. Disruptive environmental chemicals and cellular mechanisms that confer resistance to cell death / K.B. Narayanan, B.J. Barclay, Q.S. Cheng [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2015. – № 36(1). – P. S89–S110.
181. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model / E.K. Leffel, C. Wolf, A. Poklis [et al.] // *Toxicol.* – 2003. – Vol. 188. – P. 233–250.
182. Dynamics and ecological risk assessment of chromophoric dissolved organic matter in the yinma river Watershed: rivers, reservoirs and urban waters / S. Li, J. Zhang, E. Guo [et al.] // *Environ. Res.* – 2017. – Vol. 158. – P. 245–254.
183. Dysregulated systemic lymphocytes affect the balance of osteogenic/adipogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells after local irradiation / X. Xu, R. Li, Y. Zhou [et al.] // *Stem. Cell. Res. Ther.* – 2017. – № 8. – P. 71.
184. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells / H. Fuente, D. Portales-Perez, L. Baranda [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2002. – Issue. 129 – P. 69–77.
185. 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 [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2001. – Vol. 22(9). – P. 1511–1519.
186. Effects of malnutrition on neutrophil/mononuclear cell apoptotic functions in children with acute lymphoblastic leukemia / F.B. Cakir, S.G. Berrak, G. Aydogan [et al.] // *Nutr Cancer.* – 2017. – № 69(3). – P. 402–407.

187. Ekshyyan, O. Decreased susceptibility of differentiated pc12 cells to oxidative challenge: Relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1 / O. Ekshyyan, T.Y. Aw // *Cell Death. Differ.* – 2005. – № 12. – P. 1066–1077.
188. Ekström, T. Chloroform-induced glutathione depletion and toxicity in freshly isolated hepatocytes. / T. Ekström, J. Högborg // *Biochem. Pharmacol.* – 1980. – Vol. 29(22). – P. 3059–3065.
189. 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. 6372–6279.
190. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495–516.
191. Enhanced blood lymphocytes apoptosis in children with inflammatory bowel disease / M.A. El-Hodhod, R.H. Aly, S.R. Youssef [et al.] // *ISRN Gastroenterol.* – 2013. – № 10. – P.1345–1353.
192. Enhancement of X-ray induced apoptosis by mobile phone-like radio-frequency electromagnetic fields in mouse spermatocyte-derived cells / K.-Y. Zhang, H. Xu [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* – 2017. – № 14(6). – P. 616.
193. Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes / J. Chen, M. Delannou, S. Odwin [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2003. – № 75. – P. 271–278.
194. ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences / Y.N. Gong, C. Guy, H. Olauson [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 169(2). – P. 286–300.
195. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 / L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, I. Vitale [et al.] // *Cell Death and Differentiation.* – 2015. – Vol. 22(1). – P. 58–73.
196. Ethier, C. A gap in cell death knowledge: is necroptosis of eosinophils involved in allergic airway inflammation? / C. Ethier, F. Davoine // *OA Inflammation.* – 2013. – № 1(1). – P. 9.

197. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival / S.A. Krum, G.A. Miranda-Carboni, P.V. Hauschka [et al.] // *EMBO* – 2008. – Vol. 27. – Issue 3. – P. 535–545.
198. Evaluation of CD62L expression as a marker for vaccine-elicited memory cytotoxic T lymphocytes / S.S. Jackson, J.E. Schmitz, M.J. Kuroda [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 116 (4). – P. 443–453.
199. Evaluation of cyavanaprāśa on health and immunity related parameters in healthy children: a two arm, randomized, open labeled, prospective, multicenter, clinical study / A. Gupta, S. Kumar, S. Dole [et al.] // *Anc. Sci. Life.* – 2017. – № 36(3). – C. 141–150.
200. Evaluation of a methodology for automated cell counting for streak mode imaging flow cytometry / M. Ossandon, J. Balsam, H.A. Bruck [et al.] // *J. Anal. Bioanal. Tech.* – 2017. – № 8(3). – P. 1-7.
201. Exchange of cytosolic content between T cells and tumor cells activates CD4 T cells and impedes cancer growth / M. Hardtke-Wolenski, L. Kraus, C. Schmetz [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 8(10). – P. 1371.
202. Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts / R. Bu, C.W. Borysenko, Y. Li [et al.] // *Bone.* – 2003. – № 33(5). – P. 760–770.
203. Falcone, C. External and internal triggers of cell death in yeast / C. Falcone, C. Mazzoni // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – Vol. 73. – P. 2237–2250.
204. FAS/S1P1 crosstalk via NF- κ B activation in osteoclasts controls subchondral bone remodeling in murine TMJ arthritis / I.R. Hutami, T. Izawa, A. Mino-Oka [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – № 490(4) – P. 1274–1281.
205. Fenini, G. Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases /G. Fenini, E. Contassot, L.E. Frenc // *Front Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 278.
206. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species / P. Jia, Y.J. Xu, Z.L. Zhang [et al.] // *JOR.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1843–1852.

207. Filomeni, G. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway / G. Filomeni, G. Rotilio, M. Ciriolo // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17(1). – P. 64–66.
208. Filomeni, G. p38(MAPK) and ERK1/2 dictate cell death/survival response to different pro-oxidant stimuli via p53 and Nrf2 in neuroblastoma cells SH-SY5Y / G. Filomeni, G. Rotilio, M. Ciriolo // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 83. – P. 1349–1357.
209. Forman, H.J. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and parahormesis versus free radical scavenging in vivo / H.J. Forman, J.A. Davies, F. Ursini // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – № 66. – P. 24–35.
210. Friesen, C. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells / C. Friesen, Y. Kiess, K.M. Debatin // *Cell Death. Differ.* – 2004. – № 11. – Suppl. 1. – P. 73–85.
211. Functional immune anatomy of the liver-as an allograft / A.J. Demetris, C.O. Bellamy, C.R. Gandhi [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2016. – № 16(6): – P. 1653–1680.
212. Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation / Z. Feng, W. Hu, E. de Stanchina [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 3043–3053.
213. Galluzzi, L. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams // *Cell Death. Differ.* – 2012. – № 19. – P. 107–120.
214. Gemma, S. Metabolism of chloroform in the human liver and identification of the competent P450s / S. Gemma, L. Vittozzi, E. Testai // *Drug Metabolism and Disposition.* – 2003. – № 31 (3). – P. 266–274.
215. Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis* / N. Estévez-Calvar, A. Romero, A. Figueras [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 8(4). – P. 61502.
216. Gichev, Y.P. Adverse effects of environmental pollution on human health (the sorrowful experience of Russia). Center for ecological policy of Russia / Y.P. Gichev. – Sofia, 2006. – 120 p.

217. Gilman, A.P. The circumpolar AMAP maternal blood monitoring study: 1995-1996. / A.P. Gilman // In: The AMAP International Symposium on Environmental Pollution in the Arctic. – Ext. Abstracts, Tromso, Norway, 1997. – P. 57–58.
218. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels / W.K. Chang, K.D. Yang, H. Chuang [et al.] // Clin. Immunol. – 2002. – Vol. 104(2). – P. 151–160.
219. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. / A. Zimmermann, F. Loucks, E. Schroeder [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 29296–29304.
220. Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex / H. Hentze, I. Schmitz, M. Latta [et al.] // Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277(7). – P. 5588–5595.
221. Glutathione in cerebral microvascular endothelial biology and pathobiology: implications for brain homeostasis / W. Li, C. Busu, M.L. Circu [et al.] // Int. J. Cell. Biol. – 2012. – № 14. – P. 1002–1012.
222. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation, / J. Markovic, C. Borrás, A. Ortega [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 20416–20424.
223. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production / D. Suen, T.P. Dalton, D.W. Nebert [et al.] // JBC. – 2005. – Vol. 280. – P. 25305–25312.
224. Glutathione mediated detoxification of halobenzoquinone drinking water disinfection byproducts in T24 cells / J. Li, W. Wang, H. Zhang [et al.] // Toxicol. Sci. – 2014. – Vol. 141(2). – P. 335–343.
225. 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. – № 47. – P. 312–320.
226. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells / P. Cole-Ezea, D. Swan, D. Shanley [et al.] // Free Radical. Biol. Med. – 2012. – Vol. 53. – P. 488–497.

227. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production / D. Shan, T.P. Dalton, D.W. Nebert [et al.] // *JBC*. – 2005. – Vol. 280– P. 25305–25312.
228. Gomez, M.I.D. Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform / M.I.D. Gomez, J.A. Castro // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* – 1980. – № 27. – P. 191–194.
229. Gordon, M.D. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors / M.D.Gordon, R. Nusse // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281(32). – P. 22429–22433.
230. Gu, B. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases / B. Gu, L.J. Bendall, J.S. Wiley // *Blood*. – 1998. – Vol. 1, № 92(3). – P. 946–951.
231. Guicciardi, M. Gores life and death by death receptors / M. Guicciardi, G .Gores // *FASEB J.* – 2009. – № 23(6). – P. 1625–1637.
232. Guidelines for drinking-water quality – 4th ed. – Geneva: WHO, 2017.
233. Hall, A.G. Glutathione role in regulation of apoptosis / A.G. Hall // *EJCI*. – 1999. – № 29. – P. 238–245.
234. Hampton, M.B. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis / M.B. Hampton, S. Orrenius // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 414. – P. 552–556.
235. Haney, S.L. Novel tropolones induce the unfolded protein response pathway and apoptosis in multiple myeloma cells / S.L. Haney // *Oncotarget*. – 2017. – № 8. – P. 76085–76098.
236. Hansson, M. Xenobiotic metal-induced autoimmunity: mercury and silver differentially induce antinucleolar autoantibody production in susceptible H-2s, H-2q and H-2f mice / M. Hansson, M. Abedi-Valugerdi // *Clin. Exp. Immunol.* – 2003 – Vol. 131(3). – P. 405–414.
237. Harari, F. Lithium, boron, cesium and other potentially toxic metals in Swedish well water / F. Harari, L. Maxe, M. Vahter. – Stockholm, Sweden, 2017. – 42 p.

238. Heitland, P. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS / P. Heitland, H.D. Köster // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2006. – № 20 (4). – P. 253–262.
239. Herouart, D. Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana* / D. Herouart, M. Van Montagu, D. Inze // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 3108–3112.
240. Ho, Y.F. Uptake and biosynthesis of glutathione by isolated hepatic nuclei / Y.F. Ho, T.M. Guenther // *Toxicologist.* – 1994. – № 4. – P. 178.
241. HOCl-modified phosphatidylcholines induce apoptosis and redox imbalance in HUVEC-ST cells. / A. Robaszekiewicz, G. Bartosz, A.R. Pitt [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2014. – Vol. 548. – P. 1–10.
242. Hori, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 / S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi // *Science.* – 2004. – Vol. 299. – P. 1057–1061.
243. Howie, S.E.M. Lymphocyte apoptosis – mechanisms and implication in disease / S.E.M. Howie, D.J. Harrison, A.H. Wyllie // *Immunol. Rev.* – 1994. – Vol. 142. – P. 141–156.
244. Human purified protein derivative-specific CD4⁺ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms / D.M. Lewinsohn, T.T. Bement, J. Xu [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 1, № 160(5). – P. 2374–2379.
245. Iannuccilli, W. Clinical flow cytometry: detection and diagnosis / W. Iannuccilli // *GEN.* – 2017. – № 37(19). – P. 1–12.
246. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery / C.E. Jacome-Galarza, S.K. Lee, J.A. Lorenzo [et al.] // *JBMR.* – 2013. – № 28. – P. 1203–1213.
247. Identification of a p53 target, *CD137L*, that mediates growth suppression and immune response of osteosarcoma cells / Y. Tsuda, C. Tanikawa, T. Miyamoto [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – № 7. – P. 10739.
248. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray

analysis / J.-M. Lee, M.J. Calkins, K. Chan [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 12029–12038.

249. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis / B.J. Shenker, S. Datar, K. Mansfield [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 143(2). – P. 397–406.

250. Influence of oxygen concentration on T cell proliferation and susceptibility to apoptosis in healthy men and women / A. Waskowska, K.A. Lisowska, A. Daca [et al.] // *Folia histochem cytobiol.* – 2017. – № 55(1). – P. 26–36.

251. Inhaled pollutants: the molecular scene behind respiratory and systemic diseases associated with ultrafine particulate matter / H. Traboulsi, N. Guerrina, M. Iu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017 – Vol. 18(2). – P. 243.

252. Ikeda, H. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis / H. Ikeda, S. Nishi, M. Sakai // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 380. – P. 515–521.

253. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation / S.Z. Ben-Sasson, J.Hu-Li, J. Quiel [et al.] // *PNAS.* – 2009. – Vol. 106. – № 17. – P. 7119–7124.

254. IL-17 induces radiation resistance of B lymphoma cells by suppressing p53 expression and thereby inhibiting irradiation-triggered apoptosis / Q. Li, X. Xu, W. Zhong [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2015. – № 2(3). – P. 366–372.

255. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / L. Galluzzi, A. Buqué, O. Kepp [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2017. – №17.– P. 97–111.

256. Immunotoxicological profile of chloramine in female B6C3F1 mice when administered in the drinking water for 28 days / T.L. Guo, D.R. Germolec, B.J. Collins [et al.] // *J. Immunotoxicol.* – 2011. – № 8(4). – P. 381–388.

257. Increased osteoblast apoptosis in apert craniosynostosis role of protein kinase c and interleukin-1 / J. Lemonnier, E. Haÿ, P. Delannoy [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 158(5). – P. 1833–1842.

258. Induction of cell cycle arrest and apoptotic response of head and neck squamous carcinoma cells (detroit 562) by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester derivative / A. Dziedzic, R. Kubina, A. Kabała-Dzik [et al.] // ECAM. – 2017. – №4. – P. 1–10.
259. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells / J. Hanus, H. Zhang, Z. Wang [et al.] // IOVS. – 2014. – Vol. 55. – P. 633.
260. Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation / Z. Huang, J.T. Pinto, H. Deng [et al.] // Biochem Pharmacol. – 2008. – Vol. 75(11). – P. 2234–2244.
261. Interaction of FAS ligand and Fas expressed on osteoclast precursors increases osteoclastogenesis / H. Park, Y.K. Jung, O.J. Park [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175(11). – P. 7193–201.
262. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages / L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan [et al.] // Nat. Immunol. – 2005. – № 6(11). – P. 1123–1132.
263. Intestinal microbiota: a potential target for the treatment of postmenopausal osteoporosis / X. Xu, X. Jia, L. Mo [et al.] // Bone Research. – 2017. – № 5. – P. 170146.
264. Involvement of receptor-interacting protein 140 in estrogen-mediated osteoclasts differentiation, apoptosis, and bone resorption / H. Piao, X. Chu, W. Lv [et al.] // J. Physiol. Sci. – 2017. – № 67(1). – P. 141–150.
265. Irradiation inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts via the activation of Nrf2/HO-1 pathway / S.H. Kook, K.A. Kim, H. Ji [et al.] // Mol. Cell Biochem. – 2015. – Vol. 410. – P. 255–266.
266. Jaeschke, H. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury / H. Jaeschke, T. Hasegawa // Liver Int. – 2006. – Vol. 26, № 8. – P. 912–919.
267. Jayakiran, M. Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review / M. Jayakiran // J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – Vol. 5(1). – P. 205.
268. Jilka, R.L. Osteocyte apoptosis / R.L. Jilka, B. Noble, R.S. Weinstein // Bone – 2013. – № 54. – P. 264–271.

269. Jones, D.R. A potential osteoporosis target in the FAS ligand/FAS pathway of osteoblast to osteoclast signaling / D.R. Jones // *Ann. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 3(14). – P. 189.
270. Jorgensen, I. Programmed cell death as a defence against infection / I. Jorgensen, M. Rayamajhi, E.A. Miao // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – № 17. – P. 151–164.
271. Kang, S.J. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes / S.J. Kang // *Environ. Mol. Mutagens*. – 2008. – Vol. 49(5). – P. 399–405.
272. Kemp, M.G. Crosstalk between apoptosis and autophagy: environmental genotoxins, infection, and innate immunity [Электронный ресурс] / M.G. Kemp // *J. Cell. Death*. – 2017. – № 9. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469477> (дата обращения: 22.02.2018).
273. Kerr, J. F. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy / J.F. Kerr, C.M. Winterford, B.V. Harmon // *Cancer*. – 1994. – Vol. 73. – P. 2013–2026.
274. Kim, E.H. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors / E.H. Kim, Y.J. Surh // *Biochem. Pharmacol.* – 2006. – № 72. – P. 1516–1528.
275. Kim, H.R. SAT0558 VEGF promotes RANKL expression and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [Электронный ресурс] / H.R. Kim, H.-H. Kim, S.-H. Lee // *BMJ*. – 2014. – Vol 73. – Issue 2. – URL: https://ard.bmj.com/content/73/Suppl_2/792.3 (дата обращения: 30.12.2017).
276. Kim, K.W. TNF- α upregulates HIF-1 α expression in pterygium fibroblasts and enhances their susceptibility to VEGF independent of hypoxia / K.W. Kim, S.J. Lee, J.C. Kim // *Exp. Eye. Res.* – 2017. – № 164. – P. 74–81.
277. Kretz-Remy, C. Gene expression and thiol redox state / C. Kretz-Remy, A.P. Arrigo // *Methods Enzymol.* – 2002. – Vol. 348. – P. 200–215.
278. Kukita, A. Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis / A. Kukita, T. Kukita // *Future Oncol.* – 2013. – № 9(11). – P. 1609–1622.

279. Kumar, V. Robbins and cotran pathologic basis of disease / V. Kumar, A. Abbas, J. Aster. – USA, 2014. – 1408 p.
280. Lee, A.Y. Evaluating for immunodeficiency in children with recurrent infection / A.Y. Lee, P.E. Gray // *Aust. Fam. Physician*. – 2014. – Vol. 43, – № 9. – P. 629–632.
281. Lee, K. Effects of cadmium and vanadium ions on antigen-induced signaling in CD4⁺ T cells / K. Lee, X. Shen, R. Konig // *Toxicology*. – 2001. – Vol. 169, № 1. – P. 53–65.
282. Leong, O.K. Chloroform extract on human lung adenocarcinoma NCI-H23 cell lines by induction of apoptosis / O.K. Leong, T.S. Muhammad, S.F. Sulaiman // *eCAM*. – 2011. – № 4. – P. 185164.
283. Levy suppression of Foxo1 activity and down-modulation of CD62L (L-selectin) in HIV-1 infected resting CD4 T cells / B. Trinité, C.N. Chan, C.S. Lee [et al.] // *PLOS ONE*. – 2014. – № 9 (10). – P. e110719.
284. Li, J.-H. Health effects from swimming training in chlorinated pools and the corresponding metabolic stress pathways [Электронный ресурс] / J.-H. Li, Z.-H. Wang, X.-J. Zhu // *PLoS One*. – 2015. – № 10(3). – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742134> (дата обращения: 12.12.2016).
285. Lifewide profile of cytokine production by innate and adaptive immune cells from Brazilian individuals / E. Speziali, A. Teixeira-Carvalho, D.M. Vitelli-Avelar [et al.] // *Immun. Ageing*. – 2017. – № 14(2).
286. Linking stress-signaling, glutathione metabolism, signaling pathways and xenobiotic transporters / S. Yadav, E. Zajac, S.S. Singhal [et al.] // *Cancer Metastasis. Rev.* – 2007. – № 26. – P. 59–69.
287. Liu, Y. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy / Y.Liu, B.Levine // *Cell Death Differ.* – 2015 – № 22. – P. 367–376.
288. Lockshin, R.A. Caspase-independent cell death? / R.A. Lockshin, Z. Zakeri // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23(16). – P. 2766–2773.
289. Lopez, J.Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within / J. Lopez, S.W.G. Tait // *British J. Cancer*. – 2015. – Vol. 112. – P. 957–962.

290. Loss of Fas apoptosis inhibitory molecule leads to spontaneous obesity and hepatosteatosis [Электронный ресурс] / J. Huo, Y. Ma, J.J. Liu [et al.] // *Cell Death and Disease*. – 2016. – № 7. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866272> (дата обращения: 23.01.18).
291. Lunemann, A. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity / A. Lunemann, J. Lunemann, C. Munz // *Mol. Med.* – 2009. – Vol. 15. – P. 352–358.
292. Ma, Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity / Q. Ma // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2013. – № 53. – P. 401–426.
293. Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin / Y. Chtourou, K. Trabelsi, H. Fetoui [et al.] // *Neurochem. Res.* – 2011. – № 36(8). – P. 1546–1557.
294. Manskikh, V.N. Do external or internal factors lead to tumor development? It is still unknown / V.N. Manskikh // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – № 82(1). – P. 81–85.
295. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95 / Fas-mediated apoptosis / T.H. Holmström, I. Schmitz, T.S. Söderström [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2000. – Vol. 19. – Issue 20. – P. 5418–428.
296. Marcinkiewicz, J. Taurine and inflammatory diseases / J. Marcinkiewicz, E. Kontny // *Amino Acids*. – 2014. – № 46 (1). – P. 7–20.
297. Martin, S.J. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities / S.J. Martin, C.M. Henry // *Methods*. – 2013. – Vol. 61. – Issue 2. – P. 87–89.
298. Martinou, J.-C. Breaking the mitochondrial barrier / J.-C. Martinou, D.R. Green // *Nat. Rev. Mol. Cell Biology*. – 2001. – Vol. 2. – P. 63–67.
299. Martins, I. Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death / I. Martins, S. Qasim, L. Voisin // *Biomedical J.* – 2017. – Vol. 40. – Issue 3. – P. 133–140.
300. Mazur, L. Classification of cell death - recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / L. Mazur // *Conference: XXXI ogólnopolskie seminarium*

«Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych». – Kraków, 2017. – P. 37.

301. Mechanisms of apoptosis in human retinal pigment epithelium induced by TNF- α in conditions of heavy metal ion deficiency / J.H. Yang, W.D. Le, S.F. Basinger [et al.] // IOVS. – 2005. – Vol. 46, № 3. – P. 1039–1046.

302. MicroRNA-434-3p regulates age-related apoptosis through eIF5A1 in the skeletal muscle / P.S. Pardo, A. Hajira, A.M. Boriak [et al.] // Aging (Albany NY). – 2017. – № 9(3). – P. 1012–1029.

303. miR-23a regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting manganese superoxide dismutase / B. Long, T. Gan, R.C. Zhang [et al.] // Mol Cells. – 2017. – № 40(8). – P. 542–549.

304. Mitochondrial glutathione: importance and transport / J.C. Fernandez-Checa, N. Kaplowitz, C. Garcia-Ruiz [et al.] // Semin. Liver. Dis. – 1998. – № 18. – P. 389–401.

305. Mitochondrial proton leak in mouse pancreatic β -Cells / M. Aharoni-Simon, R. Shumiatcher, A. Yeung [et al.] // Endocrinology. – 2016. – Vol. 157(6). – P. 2270–2281.

306. Mitochondrial superoxide generation enhances P2X7R-mediated loss of cell surface CD62L on naive human CD4⁺ T lymphocytes / J.G. Foster, E. Carter, I. Kilty [et al.] // J. Immunol. – 2013. – Vol. 190. – P. 1551–1559.

307. Modulation by iron of hepatic microsomal and nuclear cytochrome P450, and cytosolic glutathione S-transferase and peroxidase in C57BL/10ScSn mice induced with polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) / S. Madra, F. Mann, J.E. Francis [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1996. – Vol. 136(1). – P. 79–86.

308. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt // K.E. O'Reilly, F. Rojo, Q.B. She [et al.] // Cancer Res. – 2006. – Vol. 1. – Issue 66(3). – P. 1500–1508.

309. National Toxicology Program. NTP Toxicology and carcinogenesis studies of bromodichloromethane (CAS No. 75-27-4) in male F344/N rats and female B6C3F1 mice (Drinking Water Studies) // Natl Toxicol Program: Tech. Rep. Ser. – 2006. – Vol. 532. – P. 1–248.

310. Neighbour, P.A. Human large granular lymphocytes and natural killing: Ultrastructural studies of strontium-induced degranulation / P.A. Neighbour, H.S. Huberman, Y. Kress // *Eur. J. Immunol.* – 1982. – № 12 (7). – P. 588–595.
311. Newsletter. – Geneva: WHO, 2017.
312. NF- κ B pathway is depleted in phagocytes from behçet's disease patients secondarily to constitutive phosphorylation of the P65 subunit / S.F. Perazzio, P.V.S. Pereira, A.W.S. Souza [et al.] // *Arthritis & Rheumatology.* – 2013. – Vol. 65. – Suppl. 10. – P. 2613.
313. Normal human primary CD4⁺ T lymphocytes synthesize and release functional osteoprotegerin in vitro / A. Chakravarti, A.-A. Marceau, L. Flamand [et al.] // *Laboratory Investigation.* – 2008. – № 88. – P. 171–181.
314. North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors / R.A. North // *Physiol. Rev.* – 2002. – № 82(4). – P.1013–1067.
315. North, R.A. P2X receptors [Электронный ресурс] / R.A. North // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2016. – Vol. 371. – URL: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.042> (дата обращения: 23.01.2017).
316. Nuclear glutathione / J.L. Garcia-Gimenez, J. Markovic, F. Dasi [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – P. 3304–3316.
317. Occurrence and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in subjects without periodontitis in Turkey / B. Doğan, J. Chen, S.Y. Çiftlikli [et al.] // *Arch. Oral Biol.* – 2016. – Vol. 61. – P. 125–129.
318. Ohsawa, M. Biomarkers for responses to heavy metals / M. Ohsawa // *Cancer Causes Control.* – 1997. – Vol. 8, № 3. – P. 514–517.
319. Ohsawa, M. Heavy metal-induced immunotoxicity and its mechanisms / M. Ohsawa, Z. Yakugaku // *Eur. J. Biochem.* – 2009. – Vol. 129, № 3. – P. 305–319.
320. Okada, H. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells / H. Okada, T.W. Mak // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 592–603.
321. Omodamiro, O.D. Oxytotic effect of aqueous, ethanolic, n-hexane and chloroform extracts of *Xylopia aethiopica* (Anonaceae) and *Ocimum gratissium* (Labiata) on guinea

- pig uterus / O.D. Omodamiro, O.C. Ohaeri, I.N. Nweke // Asian J. Plt. Sci. and Res. – 2012. – № 2(1). – P. 73–78.
322. On the origin of risk relativism Charles Poole epidemiology. – 2010. – № 21(1). – P. 3–9.
323. Ortega, A.L. Glutathione in cancer cell death / A.L. Ortega, S. Mena, J.M. Estrela // Cancers (Basel). – 2011. – № 3(1). – P. 1285–1310.
324. Osteoblast–osteoclast interactions / X. Chen, Z. Wang, N. Duan [et al.] // Connective Tissue Research. – 2017. – Vol. 59. – Issue 2. – P. 99–107.
325. Osteoclast apoptosis: the role of FAS in vivo and in vitro / X. Wu, M.A. McKenna, X. Feng [et al.] // Endocrinology. – 2003. – Vol. 144(12). – P. 5545–5555.
326. Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass / L. Wang, S. Liu, Y. Zhao [et al.] // Cell. Death. Differ. – 2015. – Vol. 22(10). – P. 1654–1664.
327. Osteoimmunology: major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss [Электронный ресурс] / T.N. Crotti, A.A.S.S.K. Dharmapatni, E. Alias [et al.] // J. of Immunology Research. – 2015. – Vol. 2015. – URL: <https://doi.org/10.1155/2015/281287> (дата обращения: 13.09.2017).
328. Osteoprotegerin induces apoptosis of osteoclasts and osteoclast precursor cells via the Fas/Fas ligand pathway [Электронный ресурс] / W. Liu, C. Xu, H. Zhao [et al.] // PLoS ONE – 2015. – № 10(11). – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone> (дата обращения: 03.12.2016).
329. Osteoprotegerin-mediated homeostasis of rank + thymic epithelial cells does not limit Foxp3 + regulatory T cell development nicholas / I. McCarthy, J.E. Cowan, K. Nakamura [et al.] // J. Immunol. – 2015. – Vol. 195(6). – P. 2675–2682.
330. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster* / W.C. Orr, S.N. Radyuk, L. Prabhudesai [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280(45). – P. 37331–3738.
331. Oxidative biochemistry disbalance and changes on proteomic profile in salivary glands of rats induced by chronic exposure to methylmercury / L.O. Bittencourt, B. Puty, S. Charone [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–15.

332. Oxidative stress and interleukin-6 secretion during the progression of type 1 diabetes / J. Sepulveda, C.A.V. Amaral, C.M.O. Volpe [et al.] // *Arq. Bras Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 56, № 7. – P.441–448.
333. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival / J. Navarro-Yepes, M. Burns, A. Anandhan [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2014. – Vol. 21(1). – P. 66–85.
334. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling / X. Wang, H.Y. Kua, Y. Hu [et al.] // *J. of Cell. Biology.* – 2006. – Vol. 172, № 1. – P. 115–125.
335. p53 inhibits SP7/Osterix activity in the transcriptional program of osteoblast differentiation / N. Artigas, B. Gámez, M. Cubillos-Rojas [et al.] // *CDD* – 2017. – № 24. – P. 2022–2031.
336. Pharmacological modulation of reactive oxygen species (ROS) improves the airway hyperresponsiveness by shifting the Th1 response in allergic inflammation induced by ovalbumin / R.T. Nesi, M.V. Barroso, V. Souza Muniz [et al.] // *Free Radic Res.* – 2017. – Vol. 51(7-8). – P. 708–722.
337. PI3K – Akt and apoptosis: size matters / T.F. Franke, C.P. Hornik, L. Segev [et al.] // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 8983–8998.
338. PIKfyve regulates vacuole maturation and nutrient recovery following engulfment / S. Krishna, W. Palm, Y. Lee [et al.] // *Dev. Cell.* – 2016. – № 38. – P. 536–547.
339. Pongracz, J.E. Wnt signalling in lung development and diseases / J.E. Pongracz, R.A. Stockley // *Respir. Res.* – 2006. – Vol. 7(1). – P. 15.
340. Porcine parvovirus infection activates mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway by inducing ROS accumulation / X. Zhao, H. Xiang, X. Bai [et al.] // *Virology J.* – 2016. – Vol. 13, № 26. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755023/> (дата обращения: 24.11.2017).
341. Pot, C. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity / C. Pot, L. Apetoh, V.K. Kuchroo // *Semin. in Immunol.* – 2011. – Vol. 23. – P. 202–208.

342. Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of the NF-kappaB pathway / P. Luppi, H. Tse, K. Lain [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2006. – № 56(2). – P. 135–144.
343. Programmed cell clearance: From nematodes to humans / K. Kloditz, Y.-Z. Chen, D. Xue [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 482. – P. 491–497.
344. 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 [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2000. – Vol. 69(1). – P. 73–78.
345. Protective role of hesperidin against γ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis / N.Z. Shaban, A.M.A. Zahran, F.H. El-Rashidy [et al.] // *J. Biol. Res. (Thessalon).* – 2017. – № 24. – P. 5.
346. PTEN ameliorates autoimmune arthritis through down-regulating STAT3 activation with reciprocal balance of Th17 and Tregs / S.H. Lee, J.S. Park, J.K. Byun [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – № 6. – P. 34617.
347. Public drinking water contamination and birth outcomes / F.J. Bove, M.C. Fulcomer, J.B. Klotz [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 1995. – Vol. 141(9), № 6. – P. 850–862.
348. Pulido, M.D. Metal-induced apoptosis: mechanisms / M.D. Pulido, A.R. Parrish // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 10, № 533(1-2). – P. 227–241.
349. Raggatt, L.J. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling / L.J. Raggatt, N.C. Partridge // *JBC.* – 2010. – Vol. 285. – P. 25103–25108.
350. Rainer, T.H. L-selectin in health and disease / T.H. Rainer // *Resuscitation.* – 2002. – № 52(2). – P. 127–141.
351. Randomized controlled trial of oral glutathione supplementation on body stores of glutathione / J.P.Jr. Richie, S. Nichenametla, W. Neidig [et al.] // *Eur. J. Nutr.* – 2015. – № 54(2). – P. 251–263.
352. RBP-J-Regulated miR-182 Promotes TNF- α -Induced Osteoclastogenesis / C.H. Miller, S.M. Smith, M. Elguindy [et al.] // *J. Immunol.* – 2016. – Vol. 196(12). – P. 4977–4986.

353. Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430 / C. Coddou, J.F. Codocedo, S. Li [et al.] // *J. Neurosci.* – 2009. – № 29. – P. 12284–12291.
354. Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma / J. Qu, Y. Li, W. Zhong [et al.] // *JTD* – 2017. – Vol. 9, № 1. – P. E32-E43.
355. Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease / P. Kesarwani, A.K. Murali, A.A. Al-Khami [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – Vol. 18(12). – P. 1497–1534.
356. Regulation of apoptosis through bcl-2/bax proteins expression and DNA damage by nano-sized gadolinium oxide / S. Alarifi, H. Ali, S. Alkahtani [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. – № 12. – P. 4541–4551.
357. Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax // N. Shinoura, Y. Yoshida, A. Asai [et al.] // *Oncogene.* – 1999. – Vol. 18, № 41. – P. 5703–5713.
358. Report of the oversight committee. In: *Biologic markers in reproductive toxicology.* – Washington, DC: National Academy of Sciences, National Research Council, National Academy Press. NAS/NRC, 1989.
359. Rodriguez-Iturbe, B. Role of the immune system in hypertension / B. Rodriguez-Iturbe, H. Pons, R.J. Johnson // *Physiol Rev.* – 2017– Vol. 97(3). – P. 1127–1164.
360. Role of apoptosis in disease / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano [et al.] // *Aging (Albany NY).* – 2012. – № 4(5). – P. 330–349.
361. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance / N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity.* – 2013. – № 10.
362. Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma / A. Subarnbhesaj, M. Miyauchi, C. Chanbora [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – № 12(11). – P. s97.
363. Sandford, N. Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation / N. Sandford, J.W. Searle, J. Kerr // *Pathology.* – 1984. – № 16. – P. 406–410.

364. Savic-Radojevic, A. GSTA1 (glutathione S-transferase alpha 1) / A. Savic-Radojevic, T. Radic // *Atlas Genet Cytogenet. Oncol. Haematol.* – 2014. – № 18(9). – P. 645–649.
365. Schafer, F.Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F.Q. Schafer, G.R. Buettner // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – № 30. – P. 1191–1212.
366. 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 [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – № 42. – P. 363–370.
367. Sengstake, S. CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7R / S. Sengstake, H. Illges // *Immunol.* – 2006. – № 18(7). – P. 1171–1178.
368. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism / A. Semmler, S. Hermann, F. Mormann [et al.] // *Folia Neuropathol.* – 2009. – № 47(4). – P. 321–328.
369. Shah, D. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus / D. Shah, S. Sah, S.K. Nath // *Autoimmun. Rev.* – 2013. – № 12(7). – P. 741–751.
370. Single nucleotide polymorphisms in apoptosis pathway are associated with response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia / Q. Zheng, N. Hamad, H.-J. Kim [et al.] // *J. of translational. medicine.* – 2016. – № 14(82).
371. Skenderi, F. Regulated cell death in diagnostic histopathology / F. Skenderi, S. Vranic, I. Damjanov // *Int. J. Dev. Biol.* – 2015. – № 59. – P. 149–158.
372. Sr^{2+} binding to the Ca^{2+} binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions / O.H. Shin, J.S. Rhee, J. Tang [et al.] // *Neuron.* – 2003. – № 37(1). – P. 99–108.
373. Strafe, K. Exposure to high concentrations of nitros-amines and cancer mortality among a cohort of rubber workers / K. Strafe, S.R. Weiland, M. Burgers // *Occup. and Environ. Med.* – 2000. – Vol. 57, № 3. – P. 180–187.

374. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and *in vivo* bone formation by activating Wnt/catenin signaling / F. Yang, D. Yang, J. Tu [et al.] // *Stem. Cells.* – 2011. – № 29(6). – P. 981–991.
375. Strontium ranelate decreases RANKL-induced osteoclastic differentiation *in vitro*: involvement of the calcium sensing receptor / A. Caudrillier, A.-S. Hurtel-Lemaire, A. Wattel [et al.] // *Molecular Pharmacology.* – 2010. – Vol. 78, № 4. – P. 569–576.
376. Sulforaphane-induced apoptosis *in* human leukemia HL-60 cells through extrinsic and intrinsic signal pathways and altering associated genes expression assay / H.S. Shang, Y.L. Shih, C.H. Lee [et al.] // *Environ. Toxicol.* – 2016. – № 32(1). – P. 311–328.
377. Susceptibility of lupus-prone NZM mouse strains to lead exacerbation of systemic lupus erythematosus symptoms / C.A. Hudson, L. Cao, J. Kasten-Jolly [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 2003. – Vol. 66. – P. 895–918.
378. Switching Akt: From survival signaling to deadly response / M. Los, S. Maddika, B. Erb [et al.] // *BioEssays.* – 2009. – № 31(5). – P. 492–495.
379. Sykes, M.C. Reversible glutathiolation of caspase-3 by glutaredoxin as a novel redox signaling mechanism in tumor necrosis factor- α -induced cell death / M.C. Sykes, A.L. Mowbray, H. Jo // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100. – P. 152–154.
380. Systemic immunity is required for effective cancer immunotherapy / M.H. Spitzer, Y. Carmi, N.E. Reticker-Flynn [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 168. – P. 487–502.
381. Targeting FAS in osteoresorptive disorders / N. Kovacic, D. Grcevic, V. Katavic [et al.] // *Expert. Opin. Ther Targets.* – 2010. – № 14(10). – P. 1121–1134.
382. Teng, X. Cell death in genome evolution / X. Teng, J.M. Hardwick // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – Vol. 39. – P. 3–11.
383. Tew, K.D. A novel glutathione S-transferase-activated prodrug / K.D. Tew // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2015. – № 14. – P. 1047–1054.
384. Tew, K.D. Redox in redux: emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation / K.D. Tew // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 1257–1269.

385. TGF- β 2-induced ANGPTL4 expression promotes tumor progression and osteoclast differentiation in giant cell tumor of bone / B. Li, M. Qian, H. Cao [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – № 8(33). – P. 54966–54977.
386. 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 [et al.] // *J. of Biological chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – P. 575–584.
387. The FAS/FAS ligand system inhibits differentiation of murine osteoblasts but has a limited role in osteoblast and osteoclast apoptosis / N. Kovacic, I.K. Lukic, D. Grcevic [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – № 178. – P. 3379–3389.
388. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder / A. Masi, N. Glozier, R. Dale [et al.] // *Neurosci Bull.* – 2017. – № 33(2). – P. 194–204.
389. The impact of electromagnetic fields with frequency of 50 Hz on metabolic activity of cells in vitro / A. Koziorowska, P. Sołek, L. Majchrowicz [et al.] // *Przegląd elektrotechniczny*. – 2017. – № 1. – P. 161–164.
390. The impact of oxidative stress on the bone system in response to the space special environment / Y. Tian, X. Ma, C. Yang [et al.] // *IJMS*. – 2017. – Vol. 18. – P. 2132.
391. The interplay between the bone and the immune system [Электронный ресурс] / G. Mori, P. D'Amelio, R. Faccio [et al.] // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935650> (дата обращения: 24.11.2017).
392. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis / J.F. Kerr, W.G. Cooksley, J. Searle [et al.] // *Lancet*. – 1979. – Vol. 2(8147). – P. 827–828.
393. The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival / H. Ochi, Y. Hara, M. Tagawa [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2010. – Vol. 28(5). – P. 657–663.
394. The unfolded protein response in immunogenic cell death and cancer immunotherapy / N. Rufo, A.D. Garg, P. Agostinis [et al.] // *Trends Cancer*. – 2017. – № 3(9). – P. 643–658.

395. Thioredoxin 1 as a subcellular biomarker of redox imbalance in human prostate cancer progression / W. Shan, W. Zhong, R. Zhao [et al.] // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 15, № 49(12). – P. 2078–2087.
396. Thiosemicarbazone p-substituted acetophenone derivatives promote the loss of mitochondrial, GSH depletion, and death in K562 cells [Электронный ресурс] / F.S. Pessoto, C.H. Yokomizo, T. Prieto [et al.] // *Oxid. Med. and Cell. Longev.* – 2015. – № 15. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/394367> (дата обращения: 20.12.2017).
397. T lymphocytes influence the mineralization process of bone / T.E. Khassawna, A.T. Serra, C.H. Bucher [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – № 8. – P. 562.
398. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1 / D.M. Moujalled, W.D. Cook, T. Okamoto [et al.] // *Cell. Death. and Disease.* – 2013. – № 4. – P. c465.
399. Toxicological profile for bromoform and dibromochloromethane [print/digital] / Atlanta, Ga.: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. – 251 p.
400. Toxicological profile for chloroform. U.S. department of health and human services public health service. Agency for toxic substances and disease registry. – Atlanta, GA: U.S, 1997. – 320 p.
401. Toxicological profile for strontium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, public health service. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR) [Электронный ресурс] – 2004. – URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp159.pdf> (дата обращения: 23.12.2017).
402. Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1 / S. Shetty, B.A. Graham, J.G. Brown [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – № 25(13). – P. 5404–5416.
403. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, photohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors / S. Herbette, C. Lene, D. de Iabrouhe [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2003. – Vol. 119. – P. 418–428.

404. Transition and heavy metals compared to oxidative parameter balance in patients with deep vein thrombosis: a case-control study / M. Ferrante, M. Fiore, G.O. Conti [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – № 15(5). – P. 3438–3444.
405. Treatment of hydrogen molecule abates oxidative stress and alleviates bone loss induced by modeled microgravity in rats / Y. Sun, F. Shuang, D.M. Chen [et al.] // *Osteoporos. Int.* – 2013 – № 24. – P. 969–978.
406. Trivedi, P.J. Gut-liver immunity / P.J. Trivedi, D.H. Adams // *J. Hepatol.* – 2016 – Vol. 64(5). – P. 1187–1189.
407. Tucci, P. Caloric restriction: is mammalian life extension linked to p53? / P. Tucci // *AGING.* – 2012. – № 8 – P. 525–534.
408. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors / G.T Motz, S.P Santoro, L-P. Wang [et al.] // *Nature Medicine.* – 2014. – Vol. 20. – P. 607–615.
409. Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type I receptor and RANK signaling pathways / Y.-H. Zhang, A. Heulsmann, M.M. Tondravi [et al.] // *J. of Biological. Chemistry.* – 2001. – Vol. 276. – P. 563–568.
410. Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells / H. Kawashima, H. Takatori, K. Suzuki [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – № 191(7). – P. 3614–3623.
411. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells / S. Dimmeler, C. Hermann, J. Galle [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1999. – № 19(3). – P. 656–664.
412. Usatyuk, P.V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins / P.V. Usatyuk, N.L. Parinandi, V. Natarajan // *JBC.* – 2006. – Vol. 4(281) – P. 35554–35566.
413. UVB-irradiated T-cells undergoing apoptosis lose L-selectin by metalloprotease-mediated shedding / P.M. Kern, L. Keilholz, C. Forster [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2000. – Vol. 76(9). – P. 1265–1271.

414. Vanags, D.M. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis / D.M. Vanags, S. Coppola, D.H. Burgess // *Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 31075–31085.
415. Vandenameele, P. The flick of a switch: which death program to choose? / P. Vandenameele, G. Melino // *Cell Death and Different.* – 2012. – № 19. – P. 1093–1095.
416. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor type 2 / A.C. Ziogas, N.G. Gavalas, M. Tsiatas [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2012. – Vol 130(4). – P. 857–864.
417. Walsh, M.C. Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond / M.C. Walsh, Y. Choi // *Front. Immunol.* – 2014. – № 5. – P. 511.
418. Weitzmann, M.N. Bone and the immune system / M.N. Weitzmann // *Toxicologic Pathology.* – 2017. – Vol. 45. – Issue 7. – P. 911–924.
419. Whole blood and hair trace elements and minerals in children living in metal-polluted area near copper smelter in Karabash, Chelyabinsk Region, Russia / A.V. Skalny, E.V. Zhukovskaya, G.N. Kireeva [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2018. – Vol. 25(3). – P. 2014–2020.
420. Wnt Signaling through Inhibition of β -catenin degradation in an Intact axin1 complex / V.S. Li, S.S. Ng, P.J. Boersema [et al.] // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – P. 1245–1256.
421. Wohlleber, D. The role of liver sinusoidal cells in local hepatic immune surveillance / D. Wohlleber, P.A Knolle // *J. Clinical. and translational. Immunology.* – 2016. – № 5(12). – P. 117.
422. Wu, Y. Osteoclasts – the innate immune cells of the bone / Y. Wu, M.B. Humphrey, M.C. Nakamura // *Autoimmunity.* – 2008. – № 41(3). – P. 183–194.
423. Yan, W. GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner / W. Yan, X. Chen // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 7856–7862.
424. Yan, Z. Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric / Z. Yan, A. Khadra // *J. Gen. Physiol.* – 2011. – Vol. 138(4). – P. 437–452.

425. Yee, N.S. Role of TRPM7 in cancer: potential as molecular biomarker and therapeutic target / N.S. Yee // *Pharmaceuticals*. – 2017. – № 10(2).
426. Yurchenko, M. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome / M. Yurchenko, L.M. Shlapatska, S.P. Sidorenko // *Exp. Oncol.* – 2012. – Vol. 34, №3. – P. 1712–1716.
427. Zhao, G. Advance in antitumor agents targeting glutathione-S-transferase / G. Zhao, X. Wang // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – № 13. – P. 1461–1471.
428. Zhao, S. Microbial reductive dehalogenation of trihalomethanes by a dehalobacter-containing co-culture / S. Zhao, M.J. Rogers, F. He // *AMB.* – 2017. – Vol. 101(13). – P. 5481–5492.
429. Zhou, M. Transfection of a dominant-negative mutant NF- κ B inhibitor (IkBm) represses p53-dependent apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells: interaction of IkBm and p53 / M. Zhou, L. Gu // *Oncogene*. – 2003. – № 22(50). – P. 8137–8144.
430. Zhou, W. Necroptosis in health and diseases / W. Zhou, Y. Liu, B. Levine // *Semin Cell. Dev. Biol.* – 2014. – Vol. 35. – P. 14–23.
431. Zhu, F. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome / F. Zhu, Q. Wang, C. // *Clin. Immunol.* – 2011. – № 141(2). – P. 152–160.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Таблица 1 – Сравнительная характеристика механизмов клеточной гибели

Тип	Механизм клеточной гибели	Признаки клеточной гибели		Регуляторы	Ингибиторы
		биохимические	морфологические		
1	2	3	4	5	6
Регулируемая смерть	Апоптоз (Galluzzi et al, 2012)	Индуктируется внутриклеточными стрессовыми состояниями (повреждение ДНК, гипоксия, высокая концентрации Ca^{2+} , окислительный стресс). Модулируется белками BCL-2, регулирующих апоптоз на уровне митохондрии	Сморщивание клеток; уменьшение объема клетки (пикноз); конденсация хроматина; ядерная фрагментация (кариоррексис); в цитоплазме происходит конденсация и сморщивание гранул без их разрушения, но целостность мембраны сохраняется до заключительных этапов процесса; формирование апоптических тел; поглощение апоптоических тел профессиональными фагоцитами; в большинстве случаев воспаления нет	<i>CASP10, CARD8, GZMB, HSPA1B, CARD6, NOX5, p53, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL</i>	IAPs: XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ILP-2, ML-IAP / livin, NAIP, Bruce/Apollon, survivin
	Внутренний путь Зависимый от каспаз	Повышение MOMP → высвобождение белков IMS (CYTC, Smac/DIABLO) → образование апоптосомы → активация каспазы-9 → активация каспазы-3			
	Независимый от каспаз	Повышение MOMP → высвобождение белков IMS (AIF, ENDOG, HTRA2) → ДНК фрагментация, расщепление цитозольных и цитоскелетных белков			
	Внешний путь Рецептор-зависимый	Индуктируется связыванием лигандов смерти (FASL, TNF α , TRAIL) с трансмембранными рецепторами смерти (FAS, TNFR1, TRAILR, DR5, др.) → DICS и каспаза-8 (или -10) → эффекторная каспаза-3; или - каспаза-8 → tBID → MOMP → каспаза-9 → эффекторная каспаза-3			

Окончание Таблицы 1

1	2	3	4	5	6
	Аутофагия (Green et al, 2011; Liu, Levine, 2014)	Деграция и внутриклеточная утилизация поврежденных органелл и белков без вреда для организма. Индуцируется отсутствием питательных веществ, повреждением ДНК, повреждением органелл и т. д. В случаях, вызванных стрессом, имеет цитопротекторную роль и способствует выживанию клеток. При нормальном развитии способствует смерти клеток	Массивная вакуолизация цитоплазмы; отсутствие конденсации хроматина; разрыв плазматической мембраны; обычно воспаление отсутствует	<i>ATG (ATG1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)</i>	Неселектив. ингибиторы РІЗК: LY294002, вортманнин; Специфич. ингибиторы ULK1: MRT68921, MRT67307
	Некроптоз (Kitanaka, Kuchino, 1999; Berghe et al, 2014)	Индуцированные различными стимулами, включая повреждение ДНК, экзотоксины, лигирование рецепторов смерти (например, TNFR1) или дефицитом апоптоза	Увеличение объема клетки (онкоза); разбухание органелл; кариолиз, кариорексис; пикноз; нарушение целостности плазматической мембраны; «утечка» внутриклеточного содержимого; наличие воспаления	<i>EDD1, MPG, CA9, SLC25A15, SIRT5, NPEPL1, DCC1, CD40, COL4A3BP RIP1, RIP3, MLKL</i>	Ингибиторы RIP1: Nec-1; Ингибиторы MLKL: NSA
Нерегулируемая смерть	Некроз (Elmore, 2007)	Индуцируется серьезными внешними вредными раздражителями: острая травма, инфекция, химические факторы среды обитания, не проявляющие биохимические или морфологические особенности апоптоза или аутофагии		-	-

Примечание: MOMP –пермеабилзация внешней митохондриальной мембраны; IMS – межмембранное пространство; ENDOG –эндонуклеаза G; Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low Pi) – белок с низкой pI, прямо связывающий IAP; CYTC – цитохром C.

**ПРИЛОЖЕНИЕ В. ПАРАМЕТРЫ МОДЕЛЕЙ ЗАВИСИМОСТИ «ХИМИЧЕСКОЕ ВЕЩЕСТВО В КРОВИ –
ВЕРОЯТНОСТЬ ОТКЛОНЕНИЯ ИНДИКАТОРНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ»**

Таблица 2 – Параметры логистических моделей зависимости «химическое вещество в крови – вероятность отклонения индикаторного показателя» у детей, экспонированных хлороформом, поступающим с питьевой водой

Химический фактор в крови	Индикаторный показатель	Направление изменения показателя	b_0	b_1	R^2	F	p	Реперный уровень
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Хлороформ	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ .	Повышение	-1,807	8,886	0,24	70,09	0,001	
Хлороформ	CD19 ⁺ , %	Повышение	-2,614	36,509	0,74	645,8	0,001	
Хлороформ	CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-4,367	67,62	0,81	995,4	0,001	
Хлороформ	CD25 ⁺ , %	Повышение	-5,007	96,697	0,80	976,5	0,001	
Хлороформ	CD8 ⁺ , %	Повышение	-5,073	79,244	0,87	16,27	0,001	
Хлороформ	АОА, %	Повышение	-0,629	35,296	0,57	321,5	0,001	
Хлороформ	АСТ, Е/дм ³	Повышение	-2,085	12,102	0,10	15,98	0,001	0,009
Хлороформ	Билирубин общий, мкмоль/дм ³	Повышение	-4,27	38,727	0,68	465,5	0,001	
Хлороформ	LPO, мкмоль/дм ³	Повышение	-0,358	3,65	0,10	10,517	0,042	0,061
Хлороформ	IL4, пг/см ³	Повышение	-2,551	33,291	0,57	319,65	0,001	
Хлороформ	INF γ , пг/см ³	Повышение	-3,586	29,171	0,59	309,9	0,001	
Хлороформ	TNF α , пг/см ³	Повышения	-3,106	9,370	0,14	36,5	0,001	0,002
Хлороформ	GPx, нг/см ³	Повышение	1,12	32,71	0,68	291,9	0,001	
Хлороформ	bcl-2, %	Повышение	-3,37	228,05	0,83	465,5	0,001	0,003
1,2-дихлорэтан	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	Повышение	-3,461	32,472	0,86	1255	0,001	
1,2-дихлорэтан	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-1,941	4,014	0,10	8,627	0,001	
1,2-дихлорэтан	CD19 ⁺ , %	Повышение	-2,825	27,289	0,53	242,89	0,001	
1,2-дихлорэтан	CD19 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-1,854	12,274	0,20	55,40	0,001	
1,2-дихлорэтан	CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-3,544	28,697	0,86	1131	0,001	

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,2-дихлорэтан	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Понижение	-3,043	16,846	0,87	1220	0,001	0,034
1,2-дихлорэтан	CD8, 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-3,16	20,38	0,43	132,14	0,001	0,093
1,2-дихлорэтан	CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Понижение	-2,427	6,529	0,17	42,06	0,001	0,007
1,2-дихлорэтан	Альбумины, г/дм ³	Понижение	-3,098	37,779	0,42	137,55	0,001	
1,2-дихлорэтан	АОА, %	Понижение	-0,368	5,966	0,10	17,088	0,001	
1,2-дихлорэтан	АСТ, Е/дм ³	Повышение	-2,124	10,373	0,26	78,576	0,001	
1,2-дихлорэтан	IL4, пг/см ³	Повышение	-2,384	35,897	0,22	45,936	0,001	
1,2-дихлорэтан	INF γ , пг/см ³	Повышение	-3,934	37,99	0,49	139,235	0,001	
1,2-дихлорэтан	MDA, мкмоль/дм ³	Повышение	-0,116	2,605	0,05	5,955	0,001	
1,2-дихлорэтан	Общий белок, г/дм ³	Понижение	-3,439	45,06	0,82	640,895	0,020	0,045
1,2-дихлорэтан	SOD, нг/см ³	Повышение	-2,275	23,621	0,81	698,276	0,001	
1,2-дихлорэтан	TNF α , пг/см ³	Повышение	-2,712	3,802	0,10	14,381	0,002	0,007
Дибромхлорметан	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-1,977	631,35	0,05	7,562	0,007	
Дибромхлорметан	CD25 ⁺ , %	Повышение	-4,736	30614	0,87	1516,19	0,001	
Дибромхлорметан	CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-4,045	20695	0,83	1079,75	0,001	
Дибромхлорметан	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Понижение	-3,145	2783,1	0,20	55,121	0,001	
Дибромхлорметан	CD8 ⁺ , %	Повышение	-4,724	20724	0,84	1178,55	0,001	
Дибромхлорметан	CD95 ⁺ , %	Повышение	-0,13	2866,2	0,33	114,453	0,001	
Дибромхлорметан	Альбумины, г/дм ³	Понижение	-2,806	1490,5	0,05	8,674	0,004	
Дибромхлорметан	Билирубин общий, мкмоль/дм ³	Повышение	-4,267	9124,4	0,63	372,809	0,001	
Дибромхлорметан	LPO, мкмоль/дм ³	Повышение	-1,078	4521,4	0,12	27,853	0,001	
Дибромхлорметан	IL10, пг/см ³	Повышение	-2,544	14926	0,52	223,55	0,001	
Дибромхлорметан	IL1 β , пг/см ³	Повышение	-3,917	16534	0,76	263,06	0,001	
Дибромхлорметан	IL4, пг/см ³	Повышение	-2,703	5438,9	0,29	87,464	0,001	
Дибромхлорметан	INF γ , пг/см ³	Повышение	-3,757	8087,6	0,55	241,913	0,001	
Дибромхлорметан	Общий белок, г/дм ³	Понижение	-4,771	18887	0,85	1321	0,001	
Дибромхлорметан	SOD, нг/см ³	Повышение	-2,245	3185,8	0,13	31,427	0,001	
Дихлорбромметан	CD25 ⁺ , %	Повышение	-3,7041	115,95	0,12	30,517	0,001	
Дихлорбромметан	CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-3,521	134,42	0,12	31,983	0,001	

Окончание Таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Дихлорбромметан	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Понижение	-3,301	490,81	0,67	492,65	0,001	
Дихлорбромметан	CD8 ⁺ , %	Повышение	-4,052	126,65	0,15	39,648	0,001	
Дихлорбромметан	CD95 ⁺ , %	Повышение	-0,11	231,136	0,56	310,40	0,001	
Дихлорбромметан	CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Понижение	-2,508	200,24	0,63	401,311	0,001	0,001
Дихлорбромметан	Билирубин общий, мкмоль/дм ³	Повышение	-4,031	14,146	0,05	11,43	0,002	
Дихлорбромметан	LPO, мкмоль/дм ³	Повышение	-0,218	42,057	0,05	11,307	0,002	
Дихлорбромметан	IL8, пг/см ³	Повышение	-2,695	133,66	0,10	20,691	0,001	
Дихлорбромметан	MDA, мкмоль/дм ³	Повышение	-0,134	390,22	0,65	434,89	0,001	
Дихлорбромметан	GPx, нг/см ³	Повышение	1,53	33,92	0,10	10,27	0,041	
Тетрахлорметан	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	Повышение	-3,219	388,83	0,61	355,47	0,001	
Тетрахлорметан	CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-1,853	119,98	0,39	142,12	0,001	
Тетрахлорметан	CD19 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-1,845	264,16	0,46	203,56	0,001	
Тетрахлорметан	CD19 ⁺ , %	Повышение	-2,956	470,38	0,59	333,275	0,001	
Тетрахлорметан	CD25 ⁺ , %	Повышение	-4,033	621,65	0,64	346,158	0,001	
Тетрахлорметан	CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-4,134	1186,8	0,85	1070,4	0,001	
Тетрахлорметан	CD8 ⁺ , %	Повышение	-4,642	788,19	0,80	850,18	0,001	
Тетрахлорметан	CD8 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Повышение	-3,236	342,75	0,67	378,05	0,002	
Тетрахлорметан	CD3 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	Понижение	-2,187	44,293	0,05	5,95	0,020	
Тетрахлорметан	АЛТ, Е/дм ³	Повышение	-5,128	196,34	0,11	20,247	0,001	
Тетрахлорметан	Альбумин, г/дм ³	Понижение	-3,046	206,93	0,38	133,8	0,001	
Тетрахлорметан	АОА, %	Повышение	-0,505	132,09	0,16	42,253	0,001	
Тетрахлорметан	IL10, пг/см ³	Повышение	-2,59	374,1	0,40	138,288	0,001	0,001
Тетрахлорметан	IL4, пг/см ³	Повышение	-3,17	1006,6	0,57	294,853	0,001	
Тетрахлорметан	IL6, пг/см ³	Повышение	-1,59	223,38,	0,19	50,59	0,001	
Тетрахлорметан	IFN γ , пг/см ³	Повышение	-4,851	223,38	0,20	50,586	0,001	
Тетрахлорметан	Общий белок, г/дм ³	Понижение	-4,15	648,38	0,78	606,71	0,001	
Тетрахлорметан	SOD, нг/см ³	Повышение	-3,837	1156,1	0,64	383,92	0,001	0,001
Тетрахлорметан	GPx, нг/см ³	Повышение	1,89	-266,4	0,48	92,8	0,001	
Тетрахлорметан	TNF α , пг/см ³	Повышение	-2,9	220,56	0,39	123,89	0,001	0,003