

УДК 616.097+613.954:502.3.

DOI: 10.14427/jipai.2017.1.80

## Показатели гибели клетки у детей в условиях избыточного поступления хлорсодержащих соединений с питьевой водой

Д.Г. Дианова<sup>1</sup>, Н.В. Зайцева<sup>1,2</sup>, О.В. Долгих<sup>1,2,3</sup>, А.В. Кривцов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь, Россия

## Cell death indicators in children under exposure to excessive intake of chlorine compounds with drinking water

D.G. Dianova<sup>1</sup>, N.V. Zaitseva<sup>1,2</sup>, O.V. Dolgikh<sup>1,3</sup>, A.V. Krivtsov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Vocational Education "Perm State National Research University", Perm, Russia

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Vocational Education "Perm National Research Polytechnic University", Perm, Russia

### Аннотация

**Цель.** Изучение особенностей иммунного статуса, в числе маркеров клеточной гибели у детей в условиях избыточного поступления хлорсодержащих соединений с питьевой водой.

**Материалы и методы.** Всего, включая группу контроля, обследовано 498 детей дошкольного возраста. Контрольная группа – 212 детей проживающие на территории, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения используются подземные грунтовые воды. Группа наблюдения – 286 детей постоянно проживающие на территории, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения выступают поверхностные воды с низким качеством питьевой воды по микробиологическим показателям, что требует применение для обеззараживания воды хлорсодержащих реагентов. В работе использованы химико-аналитические, иммунологические и статистические методы исследования.

**Результаты.** Установлено, что в крови детей, потребляющих гиперхлорированную воду, идентифицирован хлороформ в диапазоне от 0 мг/дм<sup>3</sup> до 0,2300 мг/дм<sup>3</sup>; в биосредах детей контрольной группы хлороформ не обнаружен. Используя метод проточной цитометрии установлено

### Summary

**Objective.** The study of the immune status features including cell death markers in children consuming drinking water with excessive content of chlorine compounds.

**Materials and methods.** Totally with the control group it was surveyed 498 pre-school children. The control group comprised 212 children, living on the territories, where circulating groundwater is used as a source of domestic water supply. The study group consisted of 286 children, living on the territories with the sources of domestic water supply presented by surface water of low quality due to microbiological indicators, what demands the use of chlorine-containing agents for water disinfection. To conduct the study the chemical-analytical, immunological and statistical methods have been used.

**Results.** It was revealed that in the blood of children, consuming hyperchlorinated water, the concentration of chloroform in a range of 0 mg/dm<sup>3</sup> - 0.2300 mg/dm<sup>3</sup> has been identified, meanwhile in the biological medium of the control group children, the chloroform has not been detected. Using flow cytometry the statistically significant ( $p = 0.001$ ) decrease (up to 1.7 fold) of Annexin V-FITC +PI- -cells amount (early apoptosis) and up to 2.4 fold increase ( $p = 0.001$ ) of Annexin

статистически значимое ( $p = 0,001$ ) снижение (в 1,7 раза) количества Annexin V-FITC+PI<sup>-</sup> -клеток (ранний апоптоз), а также повышение в 2,4 раза ( $p = 0,001$ ) содержания Annexin V-FITC+PI<sup>+</sup>-клеток (поздний апоптоз / некроз) у детей в условиях экспозиции хлороформом, поступающим с питьевой водой, относительно значений, зафиксированных у неэкспонированных детей.

**Выводы.** Показано, что при повышенном содержании в крови хлорсодержащих примесей механизм вероятного апоптогенного эффекта связан с активацией ферментных систем, ассоциированных с глутатионпероксидазой, глутатионтрансферазой, супероксиддисмутазой. Обоснованы реперные концентрации хлорсодержащих соединений в крови по критериям содержания CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>-, CD25<sup>+</sup>- лимфоцитов, IL6 с установлением диапазона допустимого их содержания в крови (0,00001 мг/дм<sup>3</sup> – 0,0181 мг/дм<sup>3</sup>).

### **Ключевые слова**

Клеточная гибель, хлорсодержащие соединения.

Уровень здоровья населения ставится в прямую зависимость от интенсивности, продолжительности влияния загрязнения и степени адаптации индивида к среде обитания [1]. 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 [2]. Процедура хлорирования водопроводной воды 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, дихлорбромметан, дибромхлорметан. Изменения иммунитета загрязнителями окружающей среды могут привести к увеличению риска развития ряда заболеваний, причинами которых часто являются нарушения клеточной регуляции [2]. В здоровом организме клеточный гомеостаз определяется балансом между клеточной гибелью и пролиферацией. Активация системы глутатиона при обезвреживании хлорсодержащих соединений (ХОС) приводит к истощению запасов глутатиона [3], вследствие чего создаются условия для возникновения устойчивых предпосылок формирования нарушения адаптационных процессов. Реакцию метаболитов хлороформа с глутатионом (GSH)

V-FITC+PI<sup>+</sup> -cells content (late apoptosis / necrosis) was found in those children, who were exposed to the excessive content of chloroform with drinking water, relative to the values fixed in non-exposed children.

**Conclusions.** It was demonstrated that under the increased chlorine compounds concentrations in blood the probable mechanism of apoptotic effect was related to the enzyme systems activation, associated with glutathione peroxidase, glutathione transferase, superoxide dismutase. The reference concentrations for chlorine-containing compounds in blood were proved by the criteria of IL6 and CD4<sup>+</sup> -, CD8<sup>+</sup> -, CD19<sup>+</sup> -, CD25<sup>+</sup> - lymphocytes content and their acceptable concentration range in blood (0.00001 mg / dm<sup>3</sup> - 0.0181 mg / dm<sup>3</sup>) was defined.

### **Keywords**

Cell death, chlorine compounds

следует рассматривать в качестве основного механизма детоксикации [3]. Очевидно, является актуальным детальное изучение механизмов реализации различных вариантов гибели иммунокомпетентной клетки (апоптоз и/или некроз) при воздействии на нее ХОС, что обеспечивает возможность ранней диагностики негативных последствий нарушения летальной программы клетки в условиях влияния техногенных химических факторов среды обитания.

Цель работы – изучение особенностей иммунного статуса, в том числе маркеров клеточной гибели у детей в условиях избыточного поступления хлорсодержащих соединений с питьевой водой.

### **Материалы и методы**

Биомедицинские диагностические исследования у детей выполнены в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 года с дополнениями 1983 года. Исследование одобрено Этическим комитетом Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения (протокол №10 от 17.10.2011 г.). Проведено углубленное обследование 498 детей дошкольного возраста, из них мальчиков – 236 человек (47,3 %), девочек – 262 человек (52,7 %). Контрольная группа – 212 детей проживающие на территории, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения используются подземные грун-

товые воды (контрольная территория). Группа наблюдения – 286 детей постоянно проживающие на территории, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения выступают поверхностные воды с низким качеством питьевой воды по микробиологическим показателям (территория наблюдения). Критерии включения в исследование: возраст детей от 4 до 7 лет, отсутствие приема иммунокорректоров и глюкокортикостероидов последние 6 месяцев, отсутствие в анамнезе аутоиммунных заболеваний, согласие родителей на участие в исследовании. Критерии исключения: невозможность или нежелание родителей обследуемых детей дать информационное согласие на участие в исследовании, участие обследуемых детей в другом исследовании. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использовании персональных данных. Группа наблюдения и контрольная группа обследуемых детей сопоставимы по основному диагнозу и сопутствующей патологии, по социальному статусу и условиям проживания ( $p > 0,05$ ).

Фенотипирование лимфоцитов, идентификацию мембранных маркеров апоптоза проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA), с использованием универсальной программы CellQuestPro. Определение субпопуляций лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD25+, CD95+ (FAS)) проводили методом мембранной иммунофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). Для определения количества апоптотических клеток использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина («Pharmacia Fine Chemicals», Sweden) [4]. Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC (Annexin V-FITC) и пропидиум йодидом (PI) согласно протоколу фирмы-производителя («BD», USA). Annexin V-FITC+ PI – ранний апоптоз (обратимый), Annexin V-FITC+PI+ – поздний апоптоз (необратимый) и некроз [5]. Цитокины (IL4, IL6, TNF $\alpha$ ,) определяли с помощью тест-систем для ИФА («Вектор-Бест», РФ; «Хема-Медика», РФ) на анализаторе «Elx808IU» («Biotek», USA). Изучение активности глутатионпероксидазы (GPx), супероксиддисмутазы (SOD), глутатионтрансферазы (GST) – в сыворотке крови проведено методом ИФА с использованием иммуноферментного анализатора «Infinite F50 Tesa»

(Austria). Определение малонового диальдегида (MDA) в плазме крови проводилось с помощью спектрофотометра ПЭ-5300в (ОАО «Экохим», РФ). Физиологическая норма иммунологических и биохимических показателей установлена согласно рекомендациям фирм-производителей, используемых реагентов.

Проведены натурные исследования содержания хлорорганических примесей в воде хозяйственно-питьевого назначения на территориях исследования. Хлорсодержащие соединения в биосредах (кровь) определяли с использованием капиллярного газового хроматографа «Кристалл 5000» (Россия) в соответствии с МУК 4.1.2102-4.1.2116-06.

Причинно-следственные связи между воздействием химического вещества и ответной реакцией организма («маркер экспозиции – маркер эффекта»), описывали при помощи модели логистической регрессии. Для установления реперных (недействующих) концентраций низкомолекулярных химических соединений в крови выполнена разработка математических моделей, отражающих зависимость «отношение шансов – маркер экспозиции». Оценку параметров зависимости проводили методом построения регрессионной модели в виде экспоненциальной функции. Адекватность моделей оценивали по критерию Фишера с 95% уровнем достоверности и коэффициенту детерминации. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий проверяли соответствие формы выборочных распределений нормальному, используя критерий  $\chi^2$ , а также контролировали равенство дисперсий с помощью F-критерия Фишера. При соответствии данных нормальному распределению использовали t-критерий Стьюдента. Для оценки значимости межгрупповых различий при ненормальном распределении использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и критерий Колмогорова-Смирнова. Результаты представлены в виде медианы (Me) и доверительного интервала (CI). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости ( $p$ ), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

### Результаты и их обсуждение

Установлено, что на территории наблюдения производится гиперхлорирование водопроводной воды, что при существующем уровне

загрязнения воды источника водоснабжения органическими веществами является причиной образования и поступления в питьевую воду высокотоксичных ХОС. В воде разводящей сети регистрируются следующие примеси: хлороформ, дихлорбромметан, дибромхлорметан, тетрахлорметан. «Суммарная» опасность загрязнения воды комплексом обнаруженных хлорорганических соединений характеризуется диапазоном 1,1 – 2,5, что превышает рекомендуемую норму ( $\leq 1$ ).

В крови детей группы наблюдения идентифицированы токсичные соединения, являющиеся результатом хлорирования воды, которые в норме в крови не обнаруживаются. Содержание хлороформа (0,0058; [0,0089 – 0,0138] мг/дм<sup>3</sup>) зарегистрировано у 99 % детей группы наблюдения при его отсутствии у детей группы контроля ( $p = 0,001$ ;  $U = 90$ ). Идентифицировано содержание в крови следующих хлорорганических соединений: дихлорбромметан (0,000205; [0,0003 – 0,0008] мг/дм<sup>3</sup>) - у 99 % детей, тетрахлорметан (0,00039; [0,0009 – 0,001] мг/дм<sup>3</sup>) – во всех исследованных пробах, дибромхлорметан (0,0000235; [0,00004 – 0,00007] мг/дм<sup>3</sup>) – в 60 % от общего количества проб.

Метаболизм хлороформа осуществляется системой ферментов цитохрома P - 450 в микросомах с образованием фосгена, который затем конъюгирует с двумя молекулами GSH и детоксифицируется [3]. Дальнейшая метаболическая трансформация хлороформа приводит к образованию тетрахлорметана и хлорсодержащих метаболитов. Характер превращения токсиканта создает условия для инициации свободнорадикальных процессов в клетке, во-первых, за счет активации перекисных процессов и, во-вторых, за счет подавления механизмов антирадикальной защиты. Система SOD и GSH обеспечивает обменные процессы, лежащие в основе реализации иммунорегуляторных механизмов [6].

При идентификации хлороформа в крови на уровне концентраций 0 – 0,2300 мг/дм<sup>3</sup> выделен комплекс маркерных показателей, имеющих статистически значимый ( $p < 0,05$ ) характер отклонений, отражающих негативные эффекты со стороны критических органов и систем (кровь, печень).

Об активизации окислительных процессов на уровне клеточной мембраны свидетельствует повышение малонового диальдегида, являющегося вторичным продуктом деструкции фосфолипидов клеточных мембран и липопротеидов плазмы крови в результате инициации перекис-

ного окисления липидов (POL). Уровень MDA в плазме крови у детей группы наблюдения в среднем составил 2,79; [2,63 – 2,95] мкмоль/см<sup>3</sup> и статистически значимо ( $p = 0,001$ ) в 1,2 раз превысил показатель в контрольной группе 2,25; [2,14 – 2,36] мкмоль/см<sup>3</sup>.

Глутатионпероксидаза катализирует процесс разложения пероксида водорода и органических перекисей с одновременным окислением глутатиона, что и придает этому ферменту первоочередное значение в антиоксидантной защите организма. Идентифицировано, что концентрация GPx, обладающей антиапоптозным эффектом, в сыворотке крови детей с повышенным содержанием хлороформа 82,3; [63,97 – 100,63] нг/см<sup>3</sup> статистически значимо ( $p = 0,001$ ) в 2,2 раза выше показателя контрольной группы 36,9; [34,02 – 39,8] нг/см<sup>3</sup>. У детей группы наблюдения установлена тенденция ( $p = 0,651$ ) повышения уровня GST 152,79; [48,83 – 256,75] нг/см<sup>3</sup> по сравнению с результатами детей группы контроля 137,51; [43,93 – 231,09] нг/см<sup>3</sup>. SOD фермент антиоксидантной защиты, катализирующий дисмутацию синглетного кислорода, образующегося при прохождении электронов по дыхательной цепи. SOD фермент первого звена защиты, синтез которого увеличивается при активации перекисного окисления. В выполненных углубленных исследованиях установлено статистически значимое ( $p = 0,002$ ) увеличение среднего уровня SOD у детей группы наблюдения 46,6; [35,06 – 58,14] нг/см<sup>3</sup> относительно показателей детей в контрольной группе 31,77; [30,36 – 33,18] нг/см<sup>3</sup>. Представленные результаты свидетельствуют, что повышенная активность антиоксидантных ферментов не препятствует процессам POL.

Сравнительный анализ иммунограмм выявил статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение процентного содержания CD3+-клеток и CD4+-клеток у детей основной группы в сравнение с контрольными значениями (табл. 1). Снижение экспрессии CD4+-маркера на иммунокомпетентных клетках может спровоцировать снижение активационного процесса в клетке и реализацию апоптотической программы лимфоцитов. Под влиянием зрелых CD8+-клеток активируемая гибель клетки по пути некроза связана с перфоринами, выделяемыми из гранул цитотоксических Т-клеток. В группе обследуемых, проживающих в условиях экспозиции хлороформом, отмечается статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение относительного числа CD19+-лимфоцитов в сравнение с контрольными величинами. В ряде исследований установлено, что источником FASL

необходимого для процесса активационного апоптоза Т-лимфоцитов являются активированные В-лимфоциты [7]. Оценка уровня экспрессии маркера ранней активации CD25+–рецептора и маркера FAS-зависимого апоптоза CD95+–рецептора показала, что у детей группы наблюдения, анализируемые показатели идентифицируются в диапазоне контрольных значений.

Установлено, что для реализации FAS-зависимого апоптоза необходим интактный уровень внутриклеточного GSH [6, 8]. Экспериментально показано, что GSH участвует в регуляции расщепления прокаспазы-3 [8, 9, 10], прокаспазы-8 [11], прокаспазы-9 [10]. Формирование сигнального комплекса DISC (death-inducing signaling complex) является GSH-независимым процессом, вследствие этого предполагают, что ингибирование апоптоза при снижении глутатиона зависит от изменения активности каспазного каскада [11].

Обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение продукции противоапоптотических цитокинов Th2 типа IL4, IL6 по сравнению с контрольными значениями (табл.1). Следует подчеркнуть, что изменение интенсивности продукции тех или иных цитокинов может быть как причиной, так и следствием антигенной (гаптенной) нагрузки, реакцией организма на техногенную экспозицию. ХОС, поступающие в организм с водой, способны спровоцировать нарушение баланса медиаторов Th1- и Th2-типа [12], что объясняется возникающим дисбалансом системы глутатиона [9]. Данная тенденция подтверждена результатами наших исследований. Существенное истощение уровня восстановленного GSH способствует снижению экспрессии TNF $\alpha$  Т-лимфоцитами [9]. Экспериментально доказано, что хлороформ дозозависимо снижает экспрессию TNF $\alpha$  [13], что можно объяснить истощением системы глутатиона. Характер действия TNF $\alpha$  зависит от его уровня и внутренних программ клетки. Так, в низкие концентрации TNF $\alpha$  вызывают усиление продукции активных форм кислорода (ROS), активацию лейкоцитов, при более высоких концентрациях цитокина отмечается увеличение уровней стероидных гормонов, что способствует развитию внутреннего (митохондриального) апоптоза. Преобладание противоапоптотических медиаторов приводит к подавлению реализации апоптотической программы лимфоцитов. Высокий уровень IL4, IL6 и тенденция снижения активности TNF $\alpha$ , рассматриваемые в контексте активности апоптоза, можно расценивать как явление компенсаторное,

направленное на сбалансированность этого биологического процесса в условиях контаминантной нагрузки.

Используя метод проточной цитофлюориметрии, детектировано содержание аннексин V-связанных клеток у детей, потребляющих гиперхлорированную питьевую воду (табл.1). Обнаружено, что у детей, проживающих в условиях воздействия хлороформом, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижено количество Annexin V-FITC+PI- -клеток (ранний апоптоз), а также статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышено содержание Annexin V-FITC+PI+ -клеток (поздний апоптоз / некроз), относительно цифр, зафиксированных в контрольной группе и статистически значимо ( $p < 0,05$ ) превышает значения физиологической нормы. В группе наблюдения количество проб с пониженным содержанием Annexin V-FITC+PI- -лимфоцитов относительно физиологической нормы составила 96 %, количества проб с повышенным количеством Annexin V-FITC+PI+ -лимфоцитов – 85 %. Результаты ряда экспериментов указывают, что в условиях окислительного стресса некроз является основным типом клеточной гибели [14].

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 мг/дм<sup>3</sup> до 0,2300 мг/дм<sup>3</sup> (табл. 2).

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 ( $p < 0,05$ ) причинно-следственные связи между уровнем в крови хлороформа, тетрахлорметана и изменением активности внутриклеточных ферментов GPx, SOD. Доказательством активизации процессов свободно-радикального окисления в организме вследствие образования агрессивных метаболитов при биотрансформации ХОС является установленная статистически значимая ( $p < 0,05$ ) связь между содержанием в крови продукта метаболизма хлороформа тетрахлорметана с биохимическими показателями активации окислительных процессов (повышение уровня MDA в плазме крови). Оксидативный стресс в зависимости от продолжительности и степени дисбаланса окислительно-восстановительных процессов может активировать или ингибировать апоптоз [15]. Соединения, образующиеся

**Таблица 1. Характеристика показателей иммунного статуса обследованных детей, (Ме; [DI])**

Показатели	ФН	Контрольная группа	Группа наблюдения	p	p <sup>1</sup>
CD3+, %	55-84	73,00 [71,09-74,07]	66,77 [69,50-68,00]	0,001	<0,05
CD4+, %	55-84	42,00 [38,62-42,59]	37,00 [35,70-38,21]	0,003	<0,05
CD8+, %	13-41	25,00 [24,39-27,48]	24,00 [23,67-25,81]	0,323	>0,10
CD19+, %	6-25	14,00 [12,78-14,80]	15,50 [14,96-16,92]	0,003	<0,05
CD25+, %	5-12	6,00 [5,69-6,89]	6,00 [5,62-6,29]	0,475	>0,10
CD95+, %	15-25	26,00 [25,02-29,23]	25,00 [24,97-27,97]	0,801	>0,10
TNFα, пкг/мл	0-6	0,67 [0,84-3,25]	0,73 [0,94-1,44]	0,370	>0,05
IL4, пкг/мл	0-4	0,91 [0,93-1,86]	1,69 [1,61-4,43]	0,001	<0,001
IL6, пкг/мл	0-10	0,45 [0,60-2,46]	3,11 [3,72-9,56]	0,001	<0,001
Annexin V-FITC+PI-, %	1,5-2,5	1,76 [1,78-8,87]	1,06 [0,97-1,18]	0,001	<0,05
Annexin V-FITC+PI+, %	7-11	8,87 [9,06- 10,71]	21,49 [18,48 22,50]*	0,001	<0,05

Примечание: ФН – физиологическая норма p – различие между контрольной группой и группой наблюдения по U-критерий Манна-Уитни; p<sup>1</sup> – различие между контрольной группой и группой по критерию Колмогорова-Смирнова; \* – различие между группой наблюдения и физиологической нормой по U-критерий Манна-Уитни (p =0,010).

**Таблица 2. Параметры моделей зависимости «хлорсодержащие соединения в крови – маркер эффекта» у детского населения**

Химический фактор в крови	Маркер эффекта	Направление изменения показателя	b <sub>0</sub>	b <sub>1</sub>	R <sup>2</sup>	F	p	Реперный уровень	
								среднее значение	диапазон
Хлороформ	TNFα	Понижение			0,30	5,41	0,013		
Хлороформ	CD4+	Понижение	-2,079±0,003	159,78±28,2	0,30	8,86	0,009	0,0181	0,01456-0,02455
Хлороформ	CD8+	Повышение	-4,44±0,0001	225,07±3,19	0,64	221,4	0,001	0,0031	0,00327-0,00342
Хлороформ	CD19+	Повышение	-3,12±0	54,9±0	0,27	32,19	0,001	0,0126	0,01763-
Хлороформ	GPx	Повышение	1,12±0,001	32,71±5,00	0,68	291,9	0,001		
Тетрахлорметан	SOD	Повышение	1,00±0,002	73,16±4,07	0,29	10,6	0,002		
Тетрахлорметан	MDA	Повышение	1,66±0,001	155,42±21,4	0,36	101,2	0,001		
Тетрахлорметан	IL-6	Повышение	-2,51±0	960,19±0	0,77	748,3	0,001		0,00001
Тетрахлорметан	CD3+	Понижение			0,20	155,2	0,001		
Дихлорбромметан	CD25+	Повышение	-2,95±0,0006	1445,2±241	0,59	223,3	0,001	0,0005	0,00043-0,00053

в результате окислительно-восстановительных реакций, могут регулировать экспрессию генов, контролирующей синтез GSH, тем самым включая защитный механизм против оксидативного стресса. Во время оксидативного стресса активные формы кислорода активируют ряд транскрипционных факторов, что приводит к повышению

экспрессии генов SOD, GPx, GST, ряда ферментов семейства цитохрома P450 [16], а также стимулируя протеинкиназу С повышают уровень IL6 [17].

Установлены и патогенетически обоснованные статистически значимые (p < 0,05) зависимости между маркерами эффекта (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD25+, IL6, TNFα, GPx, SOD,

MDA) и содержанием ХОС в крови, разрывающиеся в условиях отсутствия экспозиции. По результатам анализа математических моделей обоснованы референтные уровни ( $0,00001 \text{ мг/дм}^3 - 0,0181 \text{ мг/дм}^3$ ) содержания хлорсодержащих соединений в крови детей группы риска, которые могут быть рассмотрены в качестве критериев оценки безопасности воздействия. Показано, что экспозиция продуктами хлорирования 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.

### Выводы

1. При концентрации хлороформа в крови на уровне от  $0 \text{ мг/дм}^3$  до  $0,2300 \text{ мг/дм}^3$  выделен комплекс лабораторных показателей, ассоциированных с нарушением регуляции клеточной гибели. При комплексном анализе изменений иммунной системы, обусловленных экспозицией хлороформом, установлено статистически значимое ( $p = 0,001$ ) снижение содержания CD3+-клеток, CD4+-клеток статистически значимое ( $p = 0,003$ ) повышение количества CD19+-клеток в сравнении с контрольными значениями; статистически значимое ( $p = 0,001$ ) увеличение продукции цитокинов Th2 типа IL4, IL6 по сравнению с контрольными значениями (кратность превышения 2,2 и 4,3 раза соответственно). Установлено статистически значимое ( $p = 0,002$ ) увеличение среднего уровня SOD у детей группы наблюдения 46,6; [35,06 – 58,14] нг/см<sup>3</sup> относительно показателей детей в контрольной группе 31,77; [30,36 – 33,18] нг/см<sup>3</sup> (кратность превышения составила 1,5 раз); повышение концентрации GPx 82,3; [63,97 – 100,63] нг/см<sup>3</sup> статистически значимо ( $p = 0,001$ ) в 2,2 раза превышает показатель контрольной группы 36,9; [34,02 – 39,8] нг/

см<sup>3</sup>, что характеризует условия окислительного стресса как приоритетные в переключении реализации клеточной гибели на механизм некроза. Установлено, что в условиях воздействия хлороформом, статистически значимо ( $p = 0,001$ ) в 1,7 раз снижается количество Annexin V-FITC+PI- -клеток (ранний апоптоз), а также статистически значимо ( $p = 0,001$ ) в 2,4 раза повышается содержание Annexin V-FITC+PI+-клеток (поздний апоптоз / некроз), относительно цифр, зафиксированных в отсутствии экспозиции и статистически значимо ( $p = 0,001$ ) в 1,9 раз превышает значения физиологической нормы.

2. Установлены и патогенетически обоснованы статистически значимые ( $p = 0,001-0,013$ ) связи между маркерами эффекта (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD25+, IL6, TNF $\alpha$ , GPx, SOD, MDA) и содержанием хлорорганических соединений в крови, разрывающиеся в условиях отсутствия их экспозиции. Анализ связи параметров иммунной системы с повышенным содержанием в крови продуктов хлорирования воды показал, что механизм вероятного апоптогенного эффекта связан преимущественно с непосредственным воздействием на реализацию окислительно-восстановительного процесса через ряд ферментных систем контролирующих и осуществляющих данные процессы (система глутатиона, супероксиддисмутазы).

3. На основе построения математических моделей логистической регрессии, описывающих значимые причинно-следственные связи «химический фактор в крови – маркер эффекта», обоснованы недействующие уровни содержания хлорсодержащих соединений в крови. Для хлороформа реперный уровень по критерию снижения CD4+-маркера составил  $0,0181 \text{ мг/дм}^3$ , по критерию повышения CD8+-маркера –  $0,0031 \text{ мг/дм}^3$  и CD19+-маркера –  $0,0126 \text{ мг/дм}^3$ ; для дихлорбромметана по критерию повышения CD25+-маркера –  $0,0005 \text{ мг/дм}^3$ ; для тетрахлорметана по критерию повышения IL6 – верхняя граница  $0,00001 \text{ мг/дм}^3$ .

### Литература

1. Агаджанян Н.А., Скальный А.В. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека. М.: Изд-во КМК; 2001. 83 с.

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

3. Toxicological profile for chloroform. U.S. department of health and human services public health service. Agency for toxic substances and disease registry. 1997. 320 p.

4. 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. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968; 21, 97: 77–89.

5. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии. Медицинская иммунология. 2012; №6: 461-482.
6. Circu M.L., Aw T.Y. Glutathione and apoptosis. Free Radic Res. 2008; 42(8): 689-706.
7. Порядин Г.В. Молекулярные и клеточные механизмы иммунопатологии (Состояние и перспективы развития исследований): Актовая речь. М.: РГМУ; 2008. 48 с.
8. Hentze H., Kunstle G., Volbracht C. et. al. CD95-Mediated murine hepatic apoptosis requires an intact glutathione status. Hepatology. 1999; 30: 177-185.
9. Hentze H., Gantner F., Kolb S.A., Wende A. Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice. Am J. Pathology. 2000; 156(6): 2045-2056.
10. Huang Z., Pinto J.T., Deng H., Richie J.P. Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. Biochem. Pharmacol. 2008; 75(11): 2234-2244.
11. Hentze H., Schmitz I., Latta M. et. al. Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex. Biol. Chem. 2002; 277(7): 5588-5595.
12. Blossom S.J., Gilbert K.M. Exposure to a metabolite of the environmental toxicant, trichloroethylene, attenuates CD4+ T cell activation-induced cell death by metalloproteinase-dependent FASL shedding. Toxicol. Sci. 2006; 92(1): 103-114.
13. Koh Y.J., Cha D.S., Ko J.S. et. al. Anti-inflammatory effect of Taraxacum officinale leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. J. Med. Food. 2010; 13(4): 870-878.
14. Hanus J., Zhang H., Hanus J. et al. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. IOVS. 2014; 55: 633.
15. Shah D., Sah S., Nath S.K. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev. 2013; 12(7): 741-51.
16. Li J., Wang W., Zhang H. et al. Glutathione mediated detoxification of halobenzoquinone drinking water disinfection byproducts in T24 cells. Toxicol. Sci. 2014; 141(2): 335-343.
17. Sepulveda J., Amaral C.A.V., Volpe C.M.O. et al. Oxidative stress and interleukin-6 secretion during the progression of type 1 diabetes. J. Sepulveda, Arq. Bras Endocrinol. Metab. 2012; 56, 7: 441-448.

#### Сведения об авторах:

Дианова Дина Гумеровна - кандидат медицинских наук, отдел иммунобиологических методов диагностики, старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики, Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения 614045, Пермский край, г. Пермь, ул. Монастырская, 82; телефон - (342) - 237 25 34. E-mail: dianovadina@rambler. ru

Зайцева Нина Владимировна - доктор медицинских наук, профессор, академик. РАН, директор, Федеральное бюджетное учреждение науки Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения (ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН»), г.Пермь, ул. Монастырская, 82, 614045, E-mail: root@fcrisk.ru.

Долгих Олег Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики, Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения. 614045, Пермский край, г. Пермь, ул. Монастырская, 82; телефон - (342) - 237 25 34. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Кривцов Александр Владимирович - кандидат медицинских наук, отдел иммунобиологических методов диагностики, заведующий лабораторией иммуногенетики, Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения. 614045, Пермский край, г. Пермь, ул. Монастырская, 82; телефон - (342) - 237 25 34. E-mail: krivtsov@mail.ru

Поступила 14.03.2017 г.