

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Аликина И.Н., Долгих О.В., Казакова О.А.

## Особенности экспрессии иммуномедиаторов при аэрогенной экспозиции алюминия

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь

**Введение.** Загрязнение окружающей среды территории Российской Федерации химическими примесями, в том числе содержащими алюминий, доказанная взаимосвязь между гигиеническими факторами и состоянием здоровья населения требуют разработки научно обоснованных гигиенических рекомендаций диагностической и профилактической направленности, в том числе с использованием современных критических технологий, включающих исследования протеинов, выполняющих функции иммуномодуляторов.

**Материал и методы.** Выполнено диагностическое обследование и проведён сравнительный анализ состояния здоровья детского населения, проживающего на территории аэрогенной экспозиции соединениями алюминия не менее 4 лет, — 78 детей, при этом группу сравнения составили 20 детей, проживающих в рекреационной зоне. Показатели иммунитета обследованных детей оценивали с использованием метода проточной цитометрии (*bcl-2*, *TNFR1*), иммуноферментного (карциноэмбриональный антиген КЭА) и аллергосорбентного (IgG-специфический к алюминию) методов. Генетические показатели (полиморфизмы генов *TLR4*, *CPOX*, *ANKK1*) оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Также проведена идентификация алюминия в атмосферном воздухе и биосредах, которую осуществляли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

**Результаты.** На примере аэрогенной экспозиции алюминием на уровне 2 референтных концентраций установлено, что у детей среднее содержание алюминия в моче достоверно ( $p < 0,05$ ) превышало референтные значения (в 5,5 раза) и аналогичный показатель в группе сравнения (в 4,5 раза), среднее содержание алюминия в крови в группе наблюдения составило 0,037 мкг/см<sup>3</sup> с достоверным различием от показателей группы контроля (0,02 мкг/см<sup>3</sup>). Одновременно у экспонированного алюминием контингента выявлены полиморфные генотипы генов протеинового профиля плазмы крови: *TLR4 rs1927911*, *CPOX (rs1131857)*, *ANKK1 rs1800497*. Установлено, что условия экспозиции алюминием реализуются в виде нарушений иммунной регуляции: гиперпродукции специфического IgG к алюминию, а также антиапоптотического транскрипционного белка *Bcl-2*, что подтверждается наличием достоверных связей маркеров экспозиции и эффекта, которые отсутствуют в группе контроля, а также наблюдаемыми нарушениями здоровья (астено-вегетативный синдром).

**Заключение.** Показатели протеинового профиля, принимающие участие в апоптозе, — иммуномедиатор *TNFR* и антиапоптотический внутриклеточный протеин *Bcl-2*, а также ассоциированные с ними полиморфные генотипы участков кандидатных генов (СТ гетерозиготный генотип и Т-аллель гена *ANKK1 C2137T rs1800497*, а также АС гетерозиготный генотип гена *CPOX 921A/C rs1131857*), могут быть рекомендованы для идентификации и использования в качестве индикаторных для задач предотвращения риска нанесения вреда здоровью в условиях избыточной аэрогенной экспозиции соединениями алюминия.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** иммуномедиаторы; полиморфизм генов; алюминий.

**Для цитирования:** Аликина И.Н., Долгих О.В., Казакова О.А. Особенности экспрессии иммуномедиаторов при аэрогенной экспозиции алюминия. Гигиена и санитария. 2020; 99 (11): 1203-1210. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1203-1210>

**Для корреспонденции:** Долгих Олег Владимирович, доктор мед. наук, зав. отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь. E-mail: oleg@fcrisk.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Долгих О.В.; сбор и обработка материала – Аликина И.Н., Казакова О.А.; написание текста – Долгих О.В., Аликина И.Н.; редактирование – Долгих О.В., Аликина И.Н.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Поступила 16.04.2020

Принята к печати 05.11.2020

Опубликована 22.12.2020

Inga N. Alikina, Oleg V. Dolgikh, Olga A. Kazakova

## Peculiarities of the Expression of immune mediators under aerogenic exposure of aluminum

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation

**Introduction.** Chemical admixtures, including those containing aluminum contaminate the R.F. territory environment. There is a well-proven dependence between hygienic factors and population health. Both facts call for developing scientifically substantiated sanitary recommendations for diagnostics and prevention that should involve applying up-to-date critical technologies, including research on proteins acting as immune modulators.

**Material and methods.** We performed a diagnostic examination and comparatively analyzed the health of children living on territory under the ambient air exposure to aluminum compounds in 78 children who had lived there for not less than four years. The reference group consisted of 20 children who lived in a recreation zone. Immune indices in the examined children were assessed using flow cytometry (*Bcl-2*, *TNFR1*), enzyme immunoassay (carcinoembryonic antigen CEA), and allergosorbent (IgG-specific to the aluminum) methods. Genetic indices (*TLR4*, *CPOX*, *ANKK1*) were evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR). We also identified aluminum in ambient air and biological media with mass spectrometry with inductively coupled plasma.

**Results.** We took ambient air exposure to aluminum in 2 reference concentrations. The average aluminum contents in children's blood were established to be authentically ( $p < 0.05$ ) higher than reference levels (by 5.5 times) and the same indices in children from the reference group (by 4.5 times). Average aluminum contents in the blood of children from the test group amounted to  $0.037 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . It was authentically different from the same index in the reference group ( $0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ). Simultaneously we revealed that exposed children had polymorph genotypes of proteomic profile genes in blood plasma, namely TLR4 rs1927911, CPOX (rs1131857), ANKK1 rs1800497. Adverse effects of the exposure to aluminum became apparent due to disorders of neural immune regulation as hyperproduction of IgG specific to aluminum and anti-apoptotic transcription protein Bcl-2. It was confirmed by authentic relations between exposure markers and effects that are absent in the reference group as well as by apparent health disorders such as asthenovegetative syndrome.

**Conclusion.** The expression of immune mediators (protein that take part in apoptosis, such as TNFR or anti-apoptotic protein Bcl-2) and related sections in candidate genes (CPOX rs1131857, ANKK1 rs1800497) with polymorphic changes in them can be recommended as indices for determining and preventing the risk of harm to health in conditions of excessive aerogenic contamination with aluminum compounds.

**К е у о р д с :** immune mediators; gene polymorphism; aluminum

**For citation:** Alikina I.N., Dolgikh O.V., Kazakova O.A. Peculiarities of the Expression of immune mediators under aerogenic exposure of aluminum. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2020; 99 (11): 1203-1210. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1203-1210> (In Russ.)

**For correspondence:** Oleg V. Dolgikh, MD, Ph.D., DSci., Head of the department of immunobiological diagnostic methods, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russia. E-mail: oleg@fcrisk.ru

**Information about the authors:**

Dolgikh O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4860-3145>; Alikina I.N., <https://orcid.org/0000-0002-2057-9828>; Kazakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-0114-3930>

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Contribution:** Alikina I.N. – data collection and processing, text writing, editing; Dolgikh O.V. – research concept and design, text writing, editing; Kazakova O.A. – data collection and processing. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: April 16, 2020

Accepted: November 05, 2020

Published: December 22, 2020

## Введение

Динамичное развитие алюминиевой промышленности в России, увеличение объёмов производства, строительство новых заводов, без сомнения, оказывают растущее влияние на окружающую среду, так как любое промышленное производство, и тем более металлургия, всегда сопряжено с экологическими рисками. Проведены многочисленные исследования, подтверждающие негативное влияние различных токсических веществ на здоровье населения [1–3]. Имеется достаточно большое количество фактов, свидетельствующих о прямой зависимости между состоянием здоровья детей и уровнями загрязнения атмосферного воздуха [4, 5]. Территория юга Сибири представлена предприятиями целлюлозно-бумажной отрасли, цветной металлургии, теплоэнергетики, которые оказывают воздействие на состояние экологической обстановки в регионе [6, 7]. Особого внимания заслуживает алюминиевое производство, представляющее высокую степень опасности для здоровья населения.

Алюминий является самым распространённым в природе металлом, широко используемым в промышленном производстве. Данный металл проявляет токсичность в отношении нервной и костной ткани при накоплении в организме. Также органами-мишенями являются головной мозг, сердечная мышца и лёгочная паренхима, печень [8]. Алюминий обладает высокой способностью образовывать комплексные соединения, что обуславливает его роль в снижении активности многих ферментов [9–11]. Токсичность алюминия в отношении иммунной системы практически не изучена, но известны факты, что при его кумуляции происходит подавление функций макрофагальной системы, Т- и В-лимфоцитов. В определении влияния ионов алюминия на первичный Т-зависимый гуморальный иммунный ответ через сутки были выявлены достоверные показатели иммунодепрессии, а также подавление антителообразования в сопровождении иммунной депрессии селезёнки и тимуса. Предполагают, что алюминий может быть одной из причин старческого клеточного иммунодефицита. Известно, что соединения алюминия могут изменять энергообмен в клетках путём нарушения процессов фосфорилирования, что приводит к хаотичному делению клеток и формированию опухолеобразования. Отмечается факт алюминий-индуцированного апоптоза [12–16]. Установлено, что у детского

населения, ингибируя синтез гемоглобина, алюминий вызывает малокровие, также заболевания почек и печени [17, 18]. Длительное воздействие алюминия на организм увеличивает риск развития фиброзирующего альвеолита, альвеолярного протеиноза, астмы и злокачественных опухолей лёгких и мочевого пузыря, кроме того, оно ассоциировано с нарушением памяти, со снижением стабильности синтеза и повреждением ДНК [19, 20].

Вдыхание алюминиевой пыли в концентрации  $0,13\text{--}1,95 \text{ мг}/\text{м}^3$  сопровождается постепенным замещением лёгочной ткани фиброзной, эмоциональной возбудимостью, затруднением с концентрацией, бессонницей, лабильностью настроения. Доказана роль развития таких аутоиммунных осложнений, спровоцированных поступлением соединений алюминия ( $0,5\text{--}1,7 \text{ мг}/\text{кг}/\text{сутки}$ ), как болезнь Альцгеймера [16, 21, 22].

Гаптены в условиях длительной персистенции в организме способны вызывать иммунный ответ. Неконтролируемый иммунный ответ способен вызвать значительные повреждения клеток и тканей организма, в том числе нервной и иммунной систем. В то же время ряд ксенобиотиков способны оказывать мутагенный эффект (некоторые соли алюминия, ароматические углеводороды ряда бензола), оказывать воздействие на кровь, кроветворение, проникать через гематоэнцефалический барьер, вызывая прямое «метаболическое» нарушения деятельности нервных клеток как центральной, так и периферической нервной системы. Эти изменения будут в свою очередь обуславливать нарушение функционирования систем подконтрольных: нервной, эндокринной, иммунной и мышечной, вызывая комплекс соматических проявлений в условиях полиморфной изменчивости кандидатных генов [22–24].

Длительное воздействие низких концентраций алюминия приводит к ускоренному старению мозга и дегенеративным заболеваниям нервной системы. Появление современных лабораторных методов, в частности технологии секвенирования генов, с целью выявления особенностей их индивидуальной молекулярной структуры позволяет вести поиск принципиально новых путей предотвращения развития заболеваний и их осложнений [22, 25]. Так, перспективным путём решения проблемы ранней диагностики и прогнозирования течения заболеваний является изучение генетически детерминированных индивидуальных особенностей в

различных условиях качества среды обитания. Определение генетических предикторов развития заболеваний позволяет конкретизировать риск возникновения нарушений определённых (кандидатных) органов и систем с целью ранней диагностики осложнений и назначения терапии в соответствии с установленным диагнозом.

Метод секвенирования значительно увеличивает скорость генотипирования по множественным маркерам и позволяет выявлять новые мутации. Если ген вариабелен, то можно в одном исследовании изучить все варианты мутаций, имеющиеся у пациента, а их количество позволяет проводить статистический анализ генетической вариабельности в отличие от возможностей полимеразной цепной реакции (ПЦР) [23–25].

Исследования на культурах клеток позволяют оценить прямое цитотоксическое действие солей алюминия. Алюминий также оказывает прямое цитопатическое действие на клетки головного мозга, активно накапливается до токсичного уровня в этих железосодержащих клетках, нарушая гомеостаз (саморегуляцию) железа и вызывая истощение микротрубочек, что приводит в конечном итоге к отключению нейронов, передающих импульсы от рецепторов к головному или спинному мозгу, потере функциональности и местной атрофии. Механизмы, лежащие в основе высокого риска патологии от низкой концентрации алюминия, относятся, во-первых, к скорости усваивания алюминия организмом, достаточно низкой, чтобы создать впечатление безопасности алюминия в пище и питьевой воде, во-вторых, медленно прогрессирующее проникновение алюминия в мозг в течение длительного периода продромальной стадии (когда симптомы болезни ещё не проявились, но уже заметно ухудшение некоторых функций), и в-третьих, сходство алюминия и железа с точки зрения размера ионов позволяет использовать для алюминия известный механизм поглощения железа клетками, ответственными за работу памяти [23–25].

Потенциальная токсичность алюминия была чётко показана, а последние работы убедительно доказывают, что алюминий может быть причиной канцерогенных процессов. В то же время 100% химических соединений находятся в организме в конъюгированном с белками состоянии (альбумины, бета-глобулины) [26]. Поэтому изучение дисбаланса протеомного профиля, идентификация новых белковых маркеров заболеваний человека и кодирующих их генов являются актуальными гигиеническими задачами в целях снижения неинфекционной заболеваемости, ассоциированной со средовыми факторами.

Цель работы – изучение иммунологических и генетических показателей детского контингента в условиях контаминации крови амфотерными металлами (на примере воздействия соединениями алюминия).

## Материал и методы

Были проведены исследования биологических сред (кровь, моча) детей, имеющих высокий уровень контактной контаминации амфотерными металлами (оксид алюминия).

Проведено углублённое изучение состояния здоровья детского населения в возрасте от 4 до 6 лет, проживающего в Иркутской области. Выполнено иммунологическое и генетическое диагностическое обследование 78 детей (40 мальчиков, 38 девочек), проживающих не менее 4 лет и посещающих дошкольное образовательное учреждение (ДОУ) на территории с аэрогенным загрязнением примесями химической природы, включая соединения алюминия (оксид алюминия) в зоне влияния предприятия по производству алюминия, расположенного на расстоянии 3,2 км к юго-западу от образовательного учреждения (г. Шелехов) (группа наблюдения). При этом группу сравнения составили 20 детей 4–6 лет (12 мальчиков, 8 девочек), посещающих дошкольное образовательное учреждение, проживающих на «условно

чистой» территории с отсутствием воздействия изучаемых химических факторов риска (пгт. Листвянка – территория относительного санитарно-гигиенического благополучия, расположена на расстоянии 87,4 км к юго-востоку от изучаемых факторов риска).

Группа сравнения соответствовала по возрастно-гендерным характеристикам, социально-экономическому уровню семьи, гигиеническим условиям проживания, качеству и рациону питания группам наблюдения. Дети группы наблюдения и группы сравнения посещали типовые дошкольные образовательные организации, эксплуатируемые в течение 15–16 лет, с проведённым ремонтом помещений в предыдущие 2 года, с одинаковой наполняемостью групп (20–22 человека). Санитарно-гигиенические условия в данных ДОУ удовлетворяли требованиям СанПиН 2.4.1.2660-10.

На момент обследования дети не имели острых инфекционных заболеваний не менее чем в течение 4 нед до начала исследования, индекс инфекционности – 0,2–0,5. Обследованные дети не принимали лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на центральную нервную систему (лекарственные средства общего обезболивания, снотворные, нейролептические, седативные, противосудорожные, жаропонижающие и анальгетические вещества из производных анилина, пиразолона, салициловой кислоты и т. д.), менее чем за 30 дней до начала исследования.

Углублённое обследование детей, включённых в выборку, выполнено в соответствии с обязательным соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2008), в гармонизации с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ-Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» (ICH E6 GCP). От каждого законного представителя ребёнка, включённого в выборку, получено письменное информированное согласие на добровольное участие в обследовании.

*Критерии включения детского населения в группы исследования:* проживание на территории г. Шелехов в зоне влияния предприятия ПАО «Русал-Братск» или в пгт. Листвянка («условно чистая» территория) не менее 4 лет; возраст от 4 до 6 лет; посещение дошкольного образовательного учреждения на исследуемых территориях.

*Критерии исключения детского населения из группы исследования:* несоответствие критериям отбора, соматическая патология в стадии декомпенсации, острые или хронические инфекционные заболевания, наследственная патология, инвалидность, девиантное поведение, психические заболевания, употребление психотропных веществ.

У обследуемых групп детей сбор биопроб проводили в разное время с интервалом в один день.

Определение алюминия в атмосферном воздухе (предел обнаружения 0,0001 мгм<sup>3</sup>) и биосредах (предел обнаружения в моче 0,0001 мг/л) проводили в соответствии с СТО М 25-2017 «Методика измерений массовых концентраций алюминия в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой». Количественное определение алюминия в крови и моче осуществляли на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500cx (Agilent Technologies, США) с октопольной реакционно/столкновительной ячейкой (ORS). Мощность генератора плазмы 1400 Вт. Введение проб выполняли через двухканальную распылительную камеру при температуре 2 °С. Диаметр инжекторной трубки плазменной горелки масс-спектрометра составлял 2,5 мм. Скорость подачи образца в распылительную камеру составляла 0,4 мл/мин. Для горения плазмы использовали жидкий аргон высокой чистоты – 99,998% (ТУ-2114-005-00204760-99) со скоростью подачи до 20 л/мин. Давление в канале подвода газа соответствовало 700 ± 20 кПа. Для настройки использовали раствор <sup>7</sup>Li, <sup>59</sup>Co, <sup>89</sup>Y и <sup>205</sup>Tl в 2% HNO<sub>3</sub> с концентрацией 1 мкг/л для каждого элемента. После достижения достаточной чувствительности в стандартном режиме масс-спектрометр пере-



ключали в режим работы с реакционной/столкновительной ячейкой. В качестве газа-реактанта использовали гелий высокой чистоты (ТУ-0271-135-31323949). Максимальное подавление фонового сигнала при достижении оптимальной чувствительности наблюдали при скорости потока гелия 4,3 мл/мин. Расстояние от горелки до отбирающего конуса составляло 7 мм.

Для определения уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухоли- $\alpha$  1-го типа (TNFRI – tumor necrosis factor receptor I) использовали цитофлуориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих моноклональных антител (МКАТ) с мембранным рецептором к TNF- $\alpha$  на лимфоцитах. Клетки ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,2) (PBS) и окрашивали стандартными МКАТ к рецептору TNFRI, меченными PE (Phycocerythrin), согласно протоколу фирмы-производителя «Becton Dickinson» («BD», США). Для оценки системы апоптоза исследовали внутриклеточный уровень экспрессии белка bcl-2 (PE Hamster Anti-Mouse Bcl-2 Set (RUO)). Для анализа использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных путём центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина. Затем клетки, дважды отмывые в холодном фосфатно-солевом буфере, ресуспендировали в буфере для разведения клеток Cell Wash ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) и окрашивали с одновременным проведением процедуры отрицательного изотипического контроля стандартными МКАТ, согласно протоколу фирмы-производителя («BD», США). Анализ проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuestPro.

Показатель пролиферативных реакций, содержание карциноэмбрионального антигена (КЭА) определяли методом иммуноферментного анализа, основанного на реакции «антиген-антитело» (тест-системы фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск) на анализаторе «El  $\times$  808IU» (BioTek Instruments Inc. (США)).

Содержание IgG специфического к алюминию определяли методом аллергосорбентного тестирования с ферментной меткой. На нитроцеллюлозной подложке производили конъюгацию тестируемого химического вещества с белком, в качестве контроля использовали 0,5% раствор хлорида натрия. В дальнейшем происходила инкубация исследуемой сыворотки с антигенными комплексами, сорбированными на нитроцеллюлозной подложке, и связывание Fab-фрагментов специфических антител человека. На втором этапе иммуноферментного анализа вносили конъюгированные с пероксидазой хрена моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека с последующим конкурентным связыванием специфических антител к химическому веществу со специфическими участками переменных доменов Fab-фрагментов моноклональных антител. После промывки лунок фосфатным буфером и проявления окраски посредством добавления хромогенного субстрата останавливали реакцию стоп-реагентом и после удаления отработанных подложек проводили фотометрическое измерение оптической плотности (спектрофотометр Tecan Sunrise, Австрия) в опытном и контрольном образцах, сопоставляя их с оптической плотностью стандартных образцов с известной концентрацией IgG к белку куриного яйца. Для получения таких стандартных образцов параллельно изготавливали калибровочные диски, на которые конъюгировали образцы с известным содержанием человеческих антител IgG к белку куриного яйца. Использовали стандартные образцы IgG, конъюгат, хромогенный субстрат и стоп-реагент из набора реагентов для определения общего IgG (IgG общий – ИФА-БЕСТ», «Вектор-Бест», Россия), специфического IgG (набор реагентов для качественного иммуноферментного определения аллерген-специфических IgG антител в сыворотке крови, «Иммунотекс», Россия).

Изучение полиморфизма генов в условиях экспозиции алюминием проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. ДНК выделяли из цельной крови сорбентным методом при помощи набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ООО «НекстБио», Россия). Образцы крови были проанализированы методом гибридизации с аллель-специфическими праймерами из используемых наборов реагентов компании Синтол (Москва). Реакция проводилась в присутствии зондов с флуоресцентной меткой для количественной оценки результатов в режиме реального времени. Уровень флуоресценции измеряли во время каждого цикла термостатирования на амплификаторе BIO-RAD CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Сингапур) с последующей детекцией продуктов реакции в специализированной программе TaqMAN. Определение вариантов аллелей происходило в соответствии с инструкцией для каждого отдельного гена. Для диагностики генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки амфотерными металлами подобраны гены и их участки в качестве маркеров чувствительности, отвечающих за экспрессию minorных белков плазмы крови и характеризующих вероятные риски возникновения индуцированных средой нарушений гомеостатического статуса (всего 3 генных полиморфизма): иммуногенетический маркер – *TLR4* (толл-подобный рецептор 4) rs1927911, копропорфириногенаксидазы *CPOX* (rs1131857), маркер нейроэндокринной регуляции иммунной системы – дофаминовый рецептор *ANKK1* rs1800497.

Для статистической обработки результатов исследования применяли методы математической статистики с использованием программы Microsoft® Office Excel 2003 и пакета прикладных программ Statistica 6.0. (StatSoft, USA). Статистический анализ данных проводили методами описательной статистики и методами параметрической статистики (с использованием *t*-критерия Стьюдента для выборок с нормальным распределением). Характер статистического распределения по выборкам устанавливали по критерию согласия –  $\chi^2$ . Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные признаки представлены как  $M \pm m$  (среднее арифметическое  $\pm$  ошибка среднего). Достоверность отличий между группами считали значимой при  $p < 0,05$ .

Оценку связи иммунологических показателей и химических соединений (оксид алюминия) у детей проводили на основании расчёта отношения шансов (OR – odds ratio) и его доверительного интервала (CI – confidence interval). Для оценки достоверности связи «воздействие – негативный эффект» рассчитывали 95% доверительный интервал (CI). Критериями наличия достоверной связи являлись  $OR \geq 1$  и нижняя граница  $CI > 1$ .

Установление реперных уровней проводили в соответствии с МР 2.1.10.0062-12 «Количественная оценка неканцерогенного риска при воздействии химических веществ на основе построения эволюционных моделей» и Benchmark Dose Technical Guidance (US EPA, 2012) по результатам эпидемиологического анализа показателей здоровья с установлением изменения показателя отношения шансов, характеризующего связь концентрации химического вещества в атмосферном воздухе с показателями ответных реакций. Регистрировали значения верхней 95%-ной доверительной границы для каждого вида эффекта. Оценку адекватности модели проводили на основе однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера. При построении математических моделей осуществляли определение 95%-ных доверительных границ точечных оценок допустимых уровней маркеров экспозиции.

Сравнительный анализ полиморфности генов в группах проводили с использованием программы Microsoft® Office Excel, где оценивали: соответствие частот генотипов исследуемых генов равновесию Харди–Вайнберга (HWE – Hardy–Weinberg Equilibrium), закон считали не нарушенным

при  $p > 0,05$ ; оценивали мультипликативную и общую модели наследования с определением:  $\chi^2$  – критерий хи-квадрат,  $p$  – уровень значимости, OR – оценка/отношение шансов, CI – доверительный интервал (значение должно исключать «1»), которые позволяют определить аллель и/или генотип как факторы, увеличивающие вероятность развития нежелательного события. Уровень значимости  $p$  для оценки вклада аллеля и/или генотипа определяли как  $p < 0,0166$  с учётом поправки Бонферрони на множественные сравнения ( $p = 0,05/m$ ).

## Результаты

Проведены клинико-лабораторные исследования состояния здоровья детского населения.

Установлено, что в группе детского населения, проживающего в условиях аэрогенной экспозиции алюминием, на уровне референтной концентрации ( $Rfc = 0,005 \text{ мг/м}^3$ ) средняя концентрация алюминия в моче достоверно ( $p < 0,05$ ) превышала референтные значения в 5,5 раза и аналогичный показатель в группе сравнения в 4,5 раза, содержание алюминия в крови в группе наблюдения составило  $0,037 \pm 0,007 \text{ мкг/см}^3$ , в группе сравнения –  $0,0197 \pm 0,0049 \text{ мкг/см}^3$  (референтный уровень  $0,0065 \pm 0,0035 \text{ мкг/см}^3$ ).

Повышенный уровень карцино-эмбрионального антигена (КЭА) зафиксирован в сыворотке крови 5,7% детей группы наблюдения. Установлены достоверные отклонения уровня фетального белка КЭА от аналогичного показателя в контрольной группе – превышение в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Анализ моделей зависимости «маркер экспозиции – маркер эффекта» позволил установить достоверное повышение концентрации КЭА, ассоциированное с повышением концентрации алюминия в крови ( $R^2 = 0,62$  при  $p < 0,05$ ) и в моче ( $R^2 = 0,63$  при  $p < 0,05$ ) (табл. 2).

У 75% детского населения основной группы выявлены достоверное повышение относительно референтного значения антиапоптотического фактора Bcl-2, а также избыточная по отношению к группе контроля экспрессия TNFR рецептора (в 3,6 раза), отвечающего за апоптоз, антиапоптотического белка Bcl-2 (в 6,8 раза) ( $p < 0,05$ ) (см. табл. 1).

Оценка математических моделей в системе «маркер экспозиции – маркер эффекта» позволила установить достоверный рост экспрессии рецептора туморнекротического фактора TNFR при увеличении концентрации алюминия в крови ( $R^2 = 0,73$  при  $p < 0,05$ ) и протеинов Bcl-2 и TNFR при увеличении концентрации алюминия в моче ( $R^2 = 0,34–0,54$  при  $p < 0,05$ ) (см. табл. 2).

Повышен уровень специфической сенсибилизации к алюминию по отношению к норме и значениям группы контроля (в 6,4 раза). При этом разница содержания IgG к алюминию между группами достигала уровня достоверности,  $p < 0,05$  (см. табл. 1).

Таблица 1

### Результаты сравнительного анализа иммунологических показателей обследованных детей, $M \pm m$

Показатель	Референтный интервал	Группа наблюдения, $n = 78$	Группа сравнения, $n = 20$
Bcl-2, %	1–1,5	$3,464 \pm 1,031^{***}$	$0,494 \pm 0,124$
TNFR, %	1–1,5	$1,813 \pm 0,648^{***}$	$0,567 \pm 0,258$
КЭА, $\text{нг/см}^3$	0–2,9	$1,193 \pm 0,188^{**}$	$0,795 \pm 0,202$
IgG к алюминию, у.е.	0–0,1	$0,281 \pm 0,055^{***}$	$0,08 \pm 0,042$

Примечание. Статистически значимые отличия: \* – группы наблюдения относительно референтного интервала ( $p < 0,05$ ); \*\* – между группой наблюдения и группой сравнения ( $p < 0,05$ ).

Анализ математических моделей позволил установить достоверное повышение концентрации IgG специфического к алюминию при увеличении концентрации алюминия в моче ( $R^2 = 0,62$  при  $p < 0,05$ ) (см. табл. 2).

Результаты изучения 3 генных полиморфизмов у детского населения 4–6 лет позволили выявить кандидатные гены, распространённость аллелей которых достоверно отличала исследуемые группы ( $p < 0,0166$  с учётом поправки Бонферрони) (табл. 3).

Для диагностики генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки амфотерными металлами (на примере алюминия) на основании изучения специализированной литературы авторами подобраны гены и их участки в качестве маркеров чувствительности вероятных рисков возникновения индуцированных средой нарушений здоровья детей.

По результатам сравнительного анализа полиморфизмов кандидатных генов между исследуемыми группами установлены значимые различия в частотности вариантных генотипов генов *ANKK* и *CPOX*, с уровнем значимости  $p < 0,01$ , а для гена *TLR4*  $p < 0,05$  (см. табл. 3). Группа наблюдения характеризовалась преобладанием СТ гетерозиготного генотипа (в 2,5 раза), наличием ТТ гомозиготного генотипа, а также преобладанием частоты Т-аллеля (в 2,9 раза) гена *ANKK1 C2137T rs1800497* относительно группы контроля, при этом СТ гетерозиготный генотип и Т-аллель выступают как факторы, увеличивающие вероятность развития событий, ассоциированных с данным полиморфизмом. Частота гетерозиготного варианта АС и С-аллеля гена копропорфириногенаоксидазы *CPOX 921A/C rs1131857* достоверно превышала уровень контрольной группы (в 2,9 и 2,2 раза соответственно), полностью отсутствовал СС гомозиготный генотип, при этом АС генотип выступает как генетический фактор, способствующий развитию событий, связанных с данным вариантом. Частота гетерозиготного генотипа АГ и G-аллеля гена толл-подобного рецептора *TLR4 A8595G rs1927911* в группе на-

Таблица 2

### Параметры моделей зависимости «маркер экспозиции – маркер эффекта»

Маркер экспозиции	Маркер эффекта	Направление изменения показателя	Параметр модели		Критерий Фишера (F)	Показатель достоверности (p)	Коэффициент детерминации (R <sup>2</sup> )
			$b_0$	$b_1$			
Алюминий (кровь)	TNFR	Повышение	$-0,948 \pm 0,002$	$18,98 \pm 3,394$	106,155	0,000	0,731
	КЭА	Повышение	$-3,395 \pm 0,002$	$58,781 \pm 6,132$	563,463	0,000	0,618
Алюминий (моча)	Bcl-2	Повышение	$-0,575 \pm 0,003$	$106,176 \pm 51,104$	220,598	0,000	0,841
	IgG к алюминию	Повышение	$-0,427 \pm 0,023$	$178,153 \pm 262,702$	120,815	0,000	0,619
	TNFR	Повышение	$-4,114 \pm 0,838$	$366,658 \pm 6373,977$	21,092	0,000	0,540
	КЭА	Повышение	$-3,046 \pm 0,005$	$58,681 \pm 49,158$	70,049	0,000	0,626

## Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов исследуемых генов

Ген/rs/полиморфизм	Генотип/аллель	Наблюдение, %	HWE ( $\chi^2/p$ )	Контроль, %	HWE ( $\chi^2/p$ )	Модель		
						$\chi^2$	$p$	OR
<i>ANKK1</i> rs1800497 C2137T	CC	47,6	0,6/0,4450	80,6	0,4/0,5508			0,22 (0,06–0,75)
	CT	47,6	0,6/0,4450	19,4	0,4/0,5508	6,8	0,0093	3,79 (1,10–13,03)
	TT	4,8	0,6/0,4450	0,0	0,4/0,5508			–
	C	71,4	0,6/0,4450	90,3	0,4/0,5508	6,2	0,0125	0,27 (0,09–0,79)
	T	28,6	0,6/0,4450	9,7	0,4/0,5508			3,73 (1,16–11,76)
<i>CPOX</i> rs1131857 921A/C	AA	42,9	3,4/0,0668	77,4	0,6/0,4393			0,22 (0,07–0,73)
	AC	57,1	3,4/0,0668	19,4	0,6/0,4393	8,2	0,0042	5,56 (1,61–19,22)
	CC	0,0	3,4/0,0668	3,2	0,6/0,4393			–
	A	71,4	3,4/0,0668	87,1	0,6/0,4393	4,0	0,0467	0,37 (0,14–1,01)
	C	28,6	3,4/0,0668	12,9	0,6/0,4393			2,70 (0,93–7,77)
<i>TLR4</i> rs1927911 A8595G	AA	47,6	0,0/0,9903	67,7	1,1/0,2842			0,43 (0,14–1,35)
	AG	42,9	0,0/0,9903	32,3	1,1/0,2842	4,2	0,0407	1,58 (0,50–4,96)
	GG	9,5	0,0/0,9903	0,0	1,1/0,2842			–
	A	69,0	0,0/0,9903	83,9	1,1/0,2842	3,2	0,0739	0,43 (0,17–1,10)
	G	31,0	0,0/0,9903	16,1	1,1/0,2842			2,33 (0,86–6,24)

Примечание. HWE – Hardy Weinberg equilibrium – равновесие Харди–Вайнберга;  $\chi^2$  – критерий хи-квадрат;  $p$  – уровень значимости; OR – оценка шансов.

блюдения достоверно превышала аналогичные показатели группы контроля (в 1,3 и 1,9 раза соответственно), однако об участии аллеля и/или генотипа в развитии связанных с полиморфизмом эффектов утверждать нельзя ввиду отсутствия значимости различий распределения частот между группами, согласно поправке Бонферрони (см. табл. 3).

Таким образом, проведённый анализ полиморфизмов кандидатных генов у детей группы наблюдения позволил выявить гены, распространённость аллелей и генотипов которых достоверно отличалась от группы контроля: СТ генотип и Т-аллель гена *ANKK1* C2137T rs1800497 и АС генотип гена *CPOX* 921A/C rs1131857.

## Обсуждение

Конъюгация металлов с протеинами может приводить к нарушению их третичной структуры. Изменение структуры белков – необходимый этап эффектов металлов как антигенов (гаптен). Сами по себе металлы и их соли не являются полноценными антигенами и не вызывают специфический иммунный ответ, но, подвергаясь в организме различным химическим превращениям и вступая в соединения с белками, они приобретают новые свойства, в том числе способность стимулировать специфическое антителообразование. В соединении с белком металл играет роль гаптана и определяет специфичность комплексного антигена [24, 26]. В данном исследовании иммунный профиль детского населения территории наблюдения (зона аэрогенной экспозиции алюминием) свидетельствует о перестройке рецепторов иммунокомпетентных клеток, которая выражалась повышением содержания TNFR рецептора, антиапоптотического белка Bcl 2 ( $p < 0,05$ ), отвечающих за клеточную гибель как по отношению к референтным значениям, так и по отношению к группе контроля, увеличением содержания онкофетального маркера КЭА, гиперпродукцией специфического IgG к алюминию, достоверные по отношению к норме и группе контроля ( $p < 0,05$ ). Выявленные изменения иммунной системы в группе наблюдения ассоциированы с нарушением процессов её естественного саморазрушения (апоптоз), ак-

тивацией процессов повышенной чувствительности к гаптенам, представляющим собой соединения алюминия (IgG к алюминию), а также наблюдаемыми нарушениями здоровья, характеризующимися астено-вегетативным синдромом. Известная нейротоксичность соединений алюминия, установленная авторами избыточность антителообразования, в том числе специфического, формируют астению (слабость, повышенная утомляемость), что коррелируется с установленным у детей астено-вегетативным синдромом. Иммунотоксичность алюминия практически не изучена, но известны данные, что данный металл при концентрации 1 мМ *in vitro* в течение 1 ч в 2 раза уменьшает хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов. Производственные факторы алюминиевого производства вызывают снижение содержания Т-лимфоцитов и увеличение количества В-лимфоцитов в крови. Также, по мнению некоторых авторов, взаимодействие белков лёгочной ткани с амфотерными металлами является причиной развивающейся иммунной патологии [22, 24, 27].

Взаимодействовать металлы могут с любыми мембранными образованиями: митохондриями, эндоплазматическим ретикуломом, лизосомами. Взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, катионы могут образовывать координационно-ковалентные связи с фосфатными группами и атомами азота пуриновых и пиримидиновых оснований. Некоторые металлы могут связываться с нуклеотидами, разрывают водородные связи и дестабилизируют структуру ДНК [28, 29]. В результате изучения особенностей полиморфизма генов в группе наблюдения установлены повышенные частоты аллелей и генотипов *CPOX* (rs1131857), *ANKK1* rs1800497, *TLR4* (rs1927911), которые выступают как факторы, увеличивающие вероятность развития событий, ассоциированных с данными полиморфизмами (эффекты со стороны иммунной и нервной систем, а также системы детоксикации). Однако статистический анализ полученных результатов с учётом наблюдения требуемого равновесия частот по Харди–Вайнбергу и уровня значимости с учётом поправки на множественные сравнения Бонферрони позволил выделить гены копропорфириногеназы *CPOX* (rs1131857)



и дофаминового рецептора *ANKKI* (rs1800497) как кандидатные гены. Идентифицированные генотипы и аллели, а также их распространённость характеризуют генетические варианты дисфункции процессов детоксикации 1-й и 2-й её фазы, вероятности развития нарушений иммунного ответа, ассоциированных с врождённой склонностью к аллергизации, а также угнетение экспрессии рецепторов, модифицирующих деятельность ЦНС. Хотя алюминий и не считается биогенным элементом, и его долгое время рассматривали как инертный нерастворимый металл, последние эпидемиологические исследования показали, что соли алюминия всё в больших концентрациях выявляются в питьевой воде, и существуют экспериментальные доказательства их влияния на воспалительные процессы в головном мозге [19, 24].

Дальнейшие исследования иммунного и генетического здоровья населения в ряде поколений будут интересны с точки зрения установления усиливающегося влияния алюминия с возрастом и разработки новых профилактических технологий.

## Заключение

На примере аэрогенной экспозиции алюминием на уровне 2 референтных концентраций установлено, что у детей среднее содержание алюминия в моче достоверно ( $p < 0,05$ ) превышало референтные значения (в 5,5 раза) и аналогичный показатель в группе сравнения (в 4,5 раза), среднее содержание алюминия в крови в группе наблюдения составило

0,037 мкг/см<sup>3</sup> с достоверным различием с показателями группы сравнения (0,02 мкг/см<sup>3</sup>).

Отмечается, что условия экспозиции алюминием реализуются в виде нарушений иммунной регуляции: гиперпродукции специфического IgG к алюминию, а также антиапоптотического транскрипционного фактора Bcl-2, что подтверждается наличием достоверных связей маркеров экспозиции и эффекта, которые отсутствуют в группе контроля, а также наблюдаемыми изменениями в состоянии здоровья, сопровождающиеся астено-вегетативным синдромом. Одновременно у экспонированного контингента идентифицированы СТ гетерозиготный генотип и Т-аллель гена *ANKKI* C2137T rs1800497, а также АС гетерозиготный генотип гена *CPOX* 921A/C rs1131857 со значимо отличающимися частотами от группы контроля, выступающие в качестве кандидатных как предрасполагающие факторы к формированию нарушений в иммунной и нервной системах, а также процессах детоксикации.

Таким образом, показатели иммунологического профиля, принимающие участие в апоптозе – рецептор фактора некроза опухоли TNFR и антиапоптотический внутриклеточный протеин Bcl-2, специфический IgG к алюминию, а также ассоциированные с ними полиморфные генотипы и аллели участков кандидатных генов (*CPOX* rs1131857, *ANKKI* rs1800497), могут быть рекомендованы к использованию в качестве индикаторных для задач предотвращения риска нанесения вреда здоровью в условиях избыточной аэрогенной экспозиции соединениями алюминия.

## Литература

(п.п. 9–15, 17–19, 21, 22, 24, 26–29 см. References)

- Агаджанян Н.А., Скальный А.В. *Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека*. М.: КМК; 2001.
- Агаджанян Н.А., Сусликов В.Л., Ермакова Н.В., Капланова А.Ш. Эколого-биогеохимические факторы и здоровье человека. *Экология человека*. 2000; (1): 3–5.
- Онищенко Г.Г. Критерии опасности загрязнения окружающей среды. *Гигиена и санитария*. 2003; 82(6): 3–4.
- Маторова Н.И. Оценка изменений здоровья детей в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. *Медицина труда и промышленная экология*. 2003; (3): 19–23.
- Маторова Н.И., Ефимова Н.В., Батурин В.А. Применение математического моделирования динамических систем при изучении влияния загрязнения атмосферного воздуха на заболеваемость детского населения. *Гигиена и санитария*. 2003; 82(4): 75–8.
- Галазий О.В. Анализ экологической обстановки и ее влияние на здоровье населения Иркутской области. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2001; (4): 7–11.
- Гольменко А.Д., Лебедева Л.Н., Шамсудинова Д.З. Анализ заболеваемости населения Иркутской области за период 1992-2001 гг. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2003; (3): 195–9.
- Аргучинцева А.В., Сирина Н.В., Шетников А.И. Прогноз воздействия на окружающую среду от планируемых предприятий алюминиевого завода. В кн.: *Материалы ежегодной научно-теоретической конференции молодых ученых*. Иркутск; 2006.
- Сетко А.Г., Терехова Е.А., Тюрин А.В., Моисеева М.М. Особенности нервно-психического статуса и качества жизни детей и подростков как результат воздействия факторов риска образовательной среды. *Анализ риска здоровью*. 2018; (2): 62–9. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2018.2.07>
- Ершов Ю.А., Плетнева Т.В. *Механизмы токсического действия неорганических соединений на эритроциты*. М.: Медицина; 1989.
- Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Бубнова О.А., Мазунина А.А., Безрученко Н.В. Ассоциации полиморфизма генов иммунной системы и генов детоксикации у детей в условиях аэрогенной экспозиции тяжелыми металлами. *Российский иммунологический журнал*. 2016; 10(2): 562–4.
- Долгих О.В., Старкова К.Г., Кривцов А.В., Бубнова О.А. Вариабельность иммунорегуляторных и генетических маркеров в условиях комбинированного воздействия факторов производственной среды. *Гигиена и санитария*. 2016; 95(1): 45–8. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2016-95-1-45-48>

## References

- Agadzhanyan N.A., Skal'nyy A.V. *Chemical Elements in the Habitat and Ecological Portrait of a Man [Khimicheskie elementy v srede obitaniya i ekologicheskij portret cheloveka]*. Moscow: KMK; 2001. (in Russian)
- Agadzhanyan N.A., Suslikov V.L., Ermakova N.V., Kaplanova A.Sh. Environmental and biogeochemical factors and human health. *Ekologiya cheloveka*. 2000; (1): 3–5. (in Russian)
- Onishchenko G.G. Criteria for risks of environmental pollution. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2003; 82(6): 3–4. (in Russian)
- Matorova N.I. Evaluating health changes in children under environmental hazards. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2003; (3): 19–23. (in Russian)
- Matorova N.I., Efimova N.V., Baturin V.A. Mathematical simulation of dynamic systems used in the study of the impact of ambient air pollution on morbidity in children. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2003; 82(4): 75–8. (in Russian)
- Galaziy O.V. Analysis of the environmental situation and its impact on the health of the population of the Irkutsk region. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2001; (4): 7–11. (in Russian)
- Gol'menko A.D., Lebedeva L.N., Shamsudinova D.Z. Analysis of the incidence of the population of the Irkutsk region for the period 1992-2001. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2003; (3): 195–9. (in Russian)
- Arguchintseva A.V., Sirina N.V., Shchetnikov A.I. Environmental impact forecast from planned aluminum plant enterprises. In: *Materials of the Annual Scientific and Theoretical Conference of Young Scientists [Materialy ezhegodnoy nauchno-teoreticheskoy konferentsii molodykh uchenykh]*. Irkutsk; 2006. (in Russian)
- Bantan T., Milacic R., Mitrovac B., Pihlar B. Investigation of low molecular weight Al complexes in human serum by fast protein liquid chromatography (FPLC)-ETAAS and electrospray (ES)-MS-MS techniques. *J. Anal. At. Spectrom.* 1999; 14(11): 1743–8. <https://doi.org/10.1039/A904213J>
- Cochran M., Elliott D.C., Brennan P., Chawtur V. Inhibition of protein kinase C activation by low concentrations of aluminum. *Clin. Chim. Acta*. 1990; 194(2-3): 167–72. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90131-b](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90131-b)

11. Staurnes M., Sigholt T., Reite O.B. Reduced carbonic anhydrase and Na, K-ATPase activity in gills of salmonids exposed to aluminum-containing acid water. *Experientia*. 1984; 40(2): 226–7.
12. Johnson G.V.W., Coghill K.W., Jope R.S. Oral aluminum alters in vitro protein phosphorylation and kinase activities in rat brain. *Neurobiol. Aging*. 1990; 11(3): 209–16. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90547-d](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90547-d)
13. Ohyashiki T., Satoh E., Okada M., Takadera T., Sahara M. Nerve growth factor protects against aluminum-mediated cell death. *Toxicology*. 2002; 176(2): 195–207. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00139-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00139-7)
14. Ronneberg A., Andersen A. Mortality and cancer morbidity in workers from an aluminium smelter with prebaked carbon anodes – part II: cancer morbidity. *Occup. Environ. Med.* 1995; 52(4): 250–4. <https://doi.org/10.1136/oem.52.4.250>
15. Savory J., Herman M., Ghribi O. Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *J. Inorg. Biochem.* 2003; 97(1): 151–4. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00258-7](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00258-7)
16. Setko A.G., Terekhova E.A., Tyurin A.V., Mokeeva M.M. Peculiarities of neuro-psyche state and life quality of children and teenagers formed under influence exerted by risk factors existing in educational environment. *Analiz riska zdorov'yu*. 2018; (2): 62–9. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2018.2.07> (in Russian)
17. Duramad P., Holland N.T. Biomarkers of immunotoxicity for environmental and public health research. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2011; 8(5): 1388–401. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051388>
18. Albero K., Glass J., Sella M. Aluminum inhibits hemoglobin synthesis but enhances iron uptake in Friend erythroleukemia cells. *Kidney Int.* 1990; 37(2): 677–81. <https://doi.org/10.1038/ki.1990.33>
19. Mahieu S., del Carmen Contini M., Gonzalez M., Millen N., Elias M.M. Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicol. Lett.* 2000; 111(3): 235–42. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(99\)00184-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00184-8)
20. Ershov Yu.A., Pletneva T.V. *The Mechanisms of the Toxic Effect of Inorganic Compounds on Erythropoiesis [Mekhanizmy toksicheskogo deystviya neorganicheskikh soedineniy na eritropoez]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
21. Walton J.R., Wang M.X. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.*, 2009; 103(11): 1548–54. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.07.027>
22. Martyn C.N., Coggon D.N., Inskip H., Lacey R.F., Young W.F. Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Epidemiology*. 1997; 8(3): 281–6. <https://doi.org/10.1097/00001648-199705000-00009>
23. Dolgikh O.V., Zaytseva N.V., Dianova D.G., Bubnova O.A., Mazunina A.A., Bezruchenko N.V. Associations of polymorphism of immune system genes and detoxification genes in children under conditions of aerogenic exposure to heavy metals. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2016; 10(2): 562–4. (in Russian)
24. Silva V.S., Cordeiro J.M., Matos M.J., Oliveira C.R., Gonçalves P.P. Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion: effect of cholesterol. *Neurosci. Res.* 2002; 44(2): 181–93. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00128-1](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00128-1)
25. Dolgikh O.V., Starkova K.G., Krivtsov A.V., Bubnova O.A. Variability of immunoregulatory and genetic markers in conditions of the combined effects of industrial environmental factors. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2016; 95(1): 45–8. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2016-95-1-45-48> (in Russian)
26. Platt B., Busselberg D. Combined actions of Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Al<sup>3+</sup> on voltage-activated calcium channel currents. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1994; 14(6): 831–40. <https://doi.org/10.1007/bf02088688>
27. Bellinger D.L., Lorton D. Autonomic regulation of cellular immune function. *Auton. Neurosci.* 2014; 182: 15–41. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.01.006>
28. Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L., Altamirano-Lozano M.A. Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug Chem. Toxicol.* 2010; 33(1): 97–102. <https://doi.org/10.3109/01480540903176602>
29. Yumoto S., Nagai H., Kobayashi K., Tamate A., Kakimi S., Matsuzaki H. <sup>26</sup>Al incorporation into the brain of suckling rats through maternal milk. *J. Inorg. Biochem.* 2003; 97(1): 155–60. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00246-0)