

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РИСКА

УДК 616.092
DOI: 10.21668/health.risk/2022.1.13

Читать
онлайн



Научная статья

ВЫЯВЛЕНИЕ ОМИК-МАРКЕРОВ НЕГАТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С АЭРОГЕННЫМ КОМБИНИРОВАННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ СОЕДИНЕНИЙ АЛЮМИНИЯ И ФТОРА

М.А. Землянова^{1,2,3}, Н.В. Зайцева¹, Ю.В. Кольдибекова¹, А.Н. Пережогин⁴,
М.С. Степанков¹, Н.И. Булатова¹

¹Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Россия, 6140045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

³Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Россия, 614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29

⁴Иркутский орден Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Россия, 664047, г. Иркутск, ул. Трилессера, 78

В настоящее время актуальным является изучение одновременного комбинированного воздействия химических веществ на развитие негативных эффектов со стороны здоровья населения. Поиск молекулярных индикаторных показателей негативных эффектов, измененный уровень экспрессии которых позволяет определить особенности молекулярно-клеточных механизмов патогенеза ряда неинфекционных заболеваний при воздействии смеси химических веществ, приобретает особую значимость.

Выявлены тождественные (идентичные) омик-маркеры негативных эффектов при экспериментальной и реальной аэрогенной комбинированной экспозиции одновременно соединений алюминия и фтора и осуществлен их сравнительный анализ. Обоснование молекулярных маркеров донозологических изменений выполнено последовательной реализацией алгоритма, включающего: выявление измененных белков и пептидов в профиле плазмы крови, идентичных при экспериментальной и реальной экспозиции; установление и количественную оценку причинно-следственных связей между тождественными белками и пептидами с концентрацией в моче алюминия и фторид-иона.

Результаты исследований показали, что длительная аэрогенная комбинированная экспозиция соединений алюминия и фтора на уровне низких средних суточных доз (0,0005 и 0,002 мг/(кг·день) соответственно) обуславливает повышенные концентрации в моче экспонированных детей алюминия (в 2,8 раза) и фторид-иона (в 1,8 раза), что верифицируется результатами экспериментальных исследований комбинированного воздействия изучаемых химических веществ. Обоснованы тождественные омик-маркеры – J-цепь иммуноглобулина (ген JCHAIN) и Кельч-подобный белок 4 (ген KLHL4) при одновременном воздействии соединений алюминия и фтора как при экспериментальной, так и при реальной комбинированной аэрогенной экспозиции. Доказана причинно-следственная связь между уровнем тождественных белков и концентрацией алюминия и фторид-иона в моче при одновременном воздействии веществ в смеси.

© Землянова М.А., Зайцева Н.В., Кольдибекова Ю.В., Пережогин А.Н., Степанков М.С., Булатова Н.И., 2022

Землянова Марина Александровна – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом биохимических и цитогенетических методов диагностики; доцент кафедры микробиологии и иммунологии (e-mail: zem@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8013-9613>).

Зайцева Нина Владимировна – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель (e-mail: znv@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-25-34; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2356-1145>).

Кольдибекова Юлия Вячеславовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией метаболизма и фармакокинетики отдела биохимических и цитогенетических методов диагностики (e-mail: koldibekova@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-18-15; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3924-4526>).

Пережогин Алексей Николаевич – заведующий отделом санитарной охраны территории и мониторинга чрезвычайных ситуаций (e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru; тел.: 8 (395) 222-04-10; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5678-468X>).

Степанков Марк Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории биохимической и наносенсорной диагностики (e-mail: stepankov@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-18-15; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7226-7682>).

Булатова Наталья Ивановна – научный сотрудник лаборатории биохимической и наносенсорной диагностики (e-mail: 1179815@mail.ru; тел.: 8 (342) 236-80-18; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3392-9097>).

Идентифицированные белковые маркеры плазмы крови позволяют прогнозировать негативные эффекты в виде развития дефицита иммуноглобулинов А и М с последующим нарушением гуморального иммунитета при экспрессии J-цепи иммуноглобулина; становления склеротических и воспалительных изменений сосудистой стенки – при экспрессии Кельч-подобного белка 4. Прогнозируемые негативные эффекты можно оценить как результат простого суммарного (аддитивного) токсического действия алюминия и фтора при их одновременной комбинированной аэрогенной экспозиции.

Ключевые слова: алюминий и фторид-ион в моче, риск развития негативных эффектов, изолированное и комбинированное воздействие, протеомный профиль плазмы крови, иммунная система, сердечно-сосудистая система, J-цепь иммуноглобулина и Кельч-подобный белок 4.

В настоящее время значимым направлением в области обеспечения химической безопасности Российской Федерации в частности и в мире в целом является оценка неблагоприятных эффектов со стороны здоровья населения, возникающих при совместном воздействии смеси загрязняющих веществ, даже в случаях, когда каждый компонент при изолированном поступлении малотоксичен. Данный аспект обозначен в руководящих документах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международной программы химической безопасности [1, 2]. В современных условиях население подвергается одновременному воздействию широкого спектра химических веществ, присутствующих во всех средах, включая атмосферный воздух [3]. По данным ВОЗ загрязнение атмосферного воздуха является основным фактором риска для развития ряда неинфекционных заболеваний, в первую очередь, органов дыхания, сердечно-сосудистой и нервной систем [4]. Основной вклад в загрязнение атмосферного воздуха вносит промышленное производство, особенно в местах его концентрации. В ряде регионов с размещением крупных субъектов хозяйственной деятельности металлургической отрасли промышленности, в первую очередь, связанной с производством алюминия, основное загрязнение воздушной среды формируется за счет поступления в атмосферный воздух специфических для данного вида производства соединений алюминия и фтора, преимущественно в составе газопылевых выбросов. Перечисленные вещества при длительном внешнесредовом аэрогенном поступлении в организм способны повреждать клеточные мембраны, повышая их проницаемость, связываться с белками крови, ингибировать многие ферментные системы, что в итоге может привести к различным патологическим изменениям механизмов, обеспечивающих гомеостаз [5–7].

Перспективным направлением, позволяющим достаточно эффективно идентифицировать молекулярно-клеточные механизмы изменения гомеостаза при воздействии неблагоприятных факторов риска, является исследование трансформированного протеомного профиля плазмы крови. Идентификация, количественный анализ и изменение уровня белков

(омик-маркеров), экспрессирующихся в клеточно-тканевых структурах при неблагоприятном воздействии факторов риска, в том числе химических, представляют собой актуальные задачи для изучения механизмов развития отдельных болезней органов дыхания, нервной системы, системы кровообращения и т.д. [8, 9]. Значимым направлением в молекулярном профилировании для поиска белковых маркеров негативных эффектов, определения механизма и характера взаимодействия химических факторов экспозиции, вызывающих негативные эффекты при изолированном и комбинированном воздействии, является проведение экспериментальных исследований на биологических моделях [10]. Верификация полученных изменений белкового профиля в эксперименте результатами натуральных исследований позволяет повысить точность и объективность обоснованных молекулярных белковых маркеров. Отечественные и зарубежные научные данные в области изменений пептидов и генов, кодирующих их экспрессию, в условиях воздействия смеси химических соединений достаточно неоднозначны. Результаты ряда экспериментальных исследований свидетельствуют, что при изолированном поступлении фтор ингибирует металлосодержащие ферменты, а алюминий – ферменты, связанные с энергетическим метаболизмом клетки [11]. При действии смеси данных веществ механизм повреждения становится обратным, и данные вещества ингибируют ферменты друг друга, что говорит об антагонизме их токсического действия. Результаты других зарубежных исследований позволяют отметить, что в смеси алюминий и фтор действуют по одному и тому же механизму, взаимодействуя с билипидным слоем мембраны клеток, нарушая ионный транспорт, вызывая конформационное изменение гуанозинтрифосфата (GTP), приводящее к искусственной активации гуанозиндифосфата (GDP) и связанных с ним Ras-белков¹ [12–14]. Данные белки отвечают за передачу сигнала из внеклеточного пространства и участвуют в регуляции клеточной пролиферации¹.

Принимая во внимание неоднозначные данные по изучению одновременного комбинированного воздействия химических веществ на организм, целесообразность поиска молекулярных мишеней (бел-

¹ Heterotrimeric G-Protein Signaling at Atomic Resolution // Handbook of Cell Signaling, Three-Volume Set / ed. by R. Bradshaw, E. Dennis. – 2009. – 2nd ed. – Chapter 198. – P. 165–1619.

ков), измененный уровень экспрессии которых может служить инструментом раннего донозологического выявления неинфекционных заболеваний, можно утверждать, что актуальным является установление изменения белков и пептидов в протеомном профиле плазмы крови для прогнозирования риска развития негативных эффектов, обусловленных аэрогенным комбинированным воздействием химических факторов риска, в том числе соединений алюминия и фтора, в условиях экспериментальной и реальной экспозиции.

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ и выявление тождественных (идентичных) омик-маркеров негативных эффектов при экспериментальной и реальной аэрогенной комбинированной экспозиции одновременно соединений алюминия и фтора.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся протеомный профиль плазмы крови, пептиды белков у детей и экспериментальных животных, подвергающихся комбинированному воздействию соединений алюминия и фтора.

Экспериментальные исследования проведены на самках крыс линии Wistar, которые в количестве 12 особей разделили на четыре группы по три особи в каждой: группа 1 – животные, подверженные изолированному действию стандартного образца (СО) фтор-иона в дозе 20 мг/кг массы тела; группа 2 – животные, подверженные изолированному действию суспензии алюминия на основе изотонического раствора хлористого натрия в дозе 1,67 мг/кг массы тела; группа 3 – животные, подверженные комбинированному действию смеси фтор-иона и алюминия в дозах, указанных выше; группа 4 – контрольные животные, содержащиеся в аналогичных условиях, но не подверженные воздействию изучаемых химических веществ. Экспозицию осуществляли однократно, внутривенно. Дозы химических веществ, вводимые экспериментальным животным, эквивалентны реальной аэрогенной экспозиции с учетом продолжительности воздействия химических веществ, массы тела, периода осреднения экспозиции и видовых особенностей. Отбор крови у лабораторных животных осуществляли через 24 ч после воздействия из подъязычной вены в объеме 3 см³; отбор мочи – через 24 ч после экс-

позиции в течение суток в метаболической клетке DXL-D (3W Fengshi, Китай).

Экспериментальные исследования выполнены с соблюдением требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных или иных научных целях (ETS № 123), и этического комитета ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения».

Углубленным скрининговым обследованием охвачено 35 детей в возрасте 4–7 лет, подвергающихся длительной аэрогенной комбинированной экспозиции соединениями алюминия (на уровне 0,0005 мг/(кг·день)) и фтора (0,002 мг/(кг·день)), – группа наблюдения (25 человек) и не подвергающихся воздействию изучаемых химических веществ – группа сравнения (10 человек). Критерием формирования выборок детей группы наблюдения является повышенное содержание алюминия и фторид-иона в моче, детей группы сравнения – содержание изучаемых химических веществ, соответствующих минимальным или референтным значениям².

Обследование детей выполнено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» с обязательным получением информированного добровольного согласия законного представителя. Проведенные исследования не ущемляли прав, не подвергали опасности благополучие субъектов исследования и не причиняли вреда их здоровью.

Анализ мочи на содержание алюминия и фторид-иона проведен согласно методическим указаниям³ с использованием ионселективного электрода на лабораторном иономере И-160М (ООО «Антех», Беларусь) и масс-спектрометре Agilent 7500cx (Agilent Technologies Inc., США) (заведующий отделом химико-аналитических методов исследования, д-р биол. наук Т.С. Уланова).

Алгоритм исследования протеомного профиля плазмы крови у детей и экспериментальных животных включал отбор образцов, двумерный электрофорез в полиакриламидном геле⁴, анализ двумерной

² Тиц Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам. – М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003. – 960 с.

³ МУК 4.1.773-99. Количественное определение ионов фтора в моче с использованием ионселективного электрода / утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 06.07.1999. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000; МУК 4.1.3589-19. Измерение массовой концентрации алюминия в биологических средах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой / утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 08.11.2019. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020.

⁴ PROTEAN i12 IEF System. Instruction Manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10022069A.pdf> (дата обращения: 12.01.2022); PROTEAN II xi cell. PROTEAN II xi 2-D cell. Instruction Manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1651801.pdf> (дата обращения: 12.01.2022); ReadyPrep 2-D starter Kit. Instruction manual [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110009A.pdf> (дата обращения: 12.01.2022).

электрофореграммы, выделение значимых белковых пятен по их интенсивности. Последующий масс-спектрометрический анализ на хроматографе UltiMate 3000 (Германия) и tandemном масс-спектрометре ABSciex 4000 QTRAP с источником ионизации Nanospray 3 (Канада) включал определение аминокислотных последовательностей фрагментов индивидуальных белков, идентификацию белка, анализ базы данных UniProt с выборкой по таксону Homo Sapiens и Rattus norvegicus. Определение гена, которому соответствует идентифицированный белок, выполнено с помощью базы данных HGNC database of human gene name⁵.

Оценку полученных значений показателей у экспонированных детей выполняли относительно неэкспонированных, у экспериментальных животных опытных групп – относительно показателей в группе контроля. Результаты проведенных исследований представлены в виде среднего значения (\bar{X}), ошибки среднего (SEM) и стандартного отклонения (SD). Статистическую значимость различий переменных между группами определяли по критерию Манна – Уитни ($U \leq U_{кр}$) при уровне значимости $p \leq 0,05$. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 10.

Обоснование у детей омик-маркеров негативных эффектов, ассоциированных с комбинированной экспозицией изучаемых химических веществ, выполнено последовательной реализацией алгоритма, включающего: выявление тождественных белков и пептидов профиля плазмы крови в условиях экспериментальной и реальной экспозиции; установление и количественную оценку причинно-след-

ственных связей между тождественными белками и пептидами с концентрацией в моче алюминия и фторид-иона; прогнозирование негативных эффектов на основе анализа информации о молекулярных функциях, биологической роли идентифицированных пептидов. Достоверность и адекватность полученных моделей оценивали на основе дисперсионного анализа с использованием критерия Фишера ($F \geq 3,96$), коэффициента детерминации (R^2) при статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По результатам экспериментальных исследований установлено, что средняя концентрация фторид-иона в моче крыс при изолированной ингаляционной экспозиции в дозе 20 мг/кг массы тела в 19,2 раза выше относительно соответствующего значения в контрольной группе ($p = 0,012$). Концентрация алюминия в моче экспонированных крыс в дозе 1,67 мг/кг массы тела составила $0,057 \pm 0,010$ мг/дм³, что в 9,5 раза превысило уровень в группе контроля ($p = 0,012$) (табл. 1).

При комбинированной ингаляционной экспозиции смеси фтор-иона и алюминия в аналогичных дозах в моче крыс опытной группы относительно контрольных данных установлено повышенное в 5,6 раза содержание фторид-иона, в 3,2 раза – содержание алюминия ($p = 0,012$). Обращает на себя внимание более выраженная степень бионакопления в организме фторид-иона и алюминия при изолированном поступлении, чем при комбинированном, подтверждением чего является повышенное в 3,0–3,3 раза содержание в моче алюминия и фторид-иона при изолированной экспозиции, чем при комбинированной ($p = 0,012$). Это может свидетельствовать о возможном

Т а б л и ц а 1

Содержание в моче фторид-иона и алюминия в условиях экспериментальной и натурной экспозиции

Исследуемая группа	Показатель	Фторид-ион, мг/дм ³	Алюминий, мг/дм ³
<i>Экспериментальные исследования</i>			
Опытная группа крыс с изолированным действием веществ	Среднее значение показателя ± стандартная ошибка среднего, $\bar{X} \pm SEM$	$6,800 \pm 1,571$	$0,057 \pm 0,010$
	Стандартное отклонение, SD	3,51	0,0230
	Достоверность различий среднего значения опытной группы с контролем, p	0,012	0,012
Опытная группа крыс с комбинированным действием веществ	Среднее значение показателя ± стандартная ошибка среднего, $\bar{X} \pm SEM$	$2,07 \pm 0,271$	$0,019 \pm 0,005$
	Стандартное отклонение, SD	0,606	0,012
	Достоверность различий среднего значения опытной группы с контролем, p	0,012	0,012
Контрольная группа крыс	Среднее значение показателя ± стандартная ошибка среднего, $\bar{X} \pm SEM$	$0,354 \pm 0,062$	$0,006 \pm 0,001$
	Стандартное отклонение, SD	0,138	0,010
<i>Натурные исследования</i>			
Группа наблюдения (дети)	Среднее значение показателя ± стандартная ошибка среднего, $\bar{X} \pm SEM$	$0,687 \pm 0,076$	$0,011 \pm 0,003$
	Стандартное отклонение, SD	0,378	0,019
	Достоверность различий среднего значения группы наблюдения с группой сравнения, p	0,006	0,039
Группа сравнения (дети)	Среднее значение показателя ± стандартная ошибка среднего, $\bar{X} \pm SEM$	$0,374 \pm 0,053$	$0,004 \pm 0,001$
	Стандартное отклонение, SD	0,167	0,001

⁵ The resource for approved human gene nomenclature: веб-сайт [Электронный ресурс] // HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee. – URL: <https://www.genenames.org/> (дата обращения: 10.12.2021).

Таблица 2

Белки и входящие в их состав пептиды, достоверно отличающиеся от контрольных данных, выделенные в протеомном профиле плазмы крови крыс, подверженных изолированному и комбинированному действию фтора и алюминия

Последовательность аминокислотных остатков пептида	Вероятность идентификации пептида, %	Наименование белка	Достоверность модели зависимости «вещество – значимый белок», $p \leq 0,05$
<i>Изолированное действие фтора</i>			
DSLNMWLCPR	47,5	Ядерный рецептор-коактиватор 4	0,009
VDCLKTFGR	18,9	Субъединица ламинина альфа-3	0,070
CYTAVVPLVYGGETK	99,1	J-цепь иммуноглобулина	0,043
VSFLSALEEYTK	96,4	Аполипопротеин А-I	0,025
EAMGKLYNFSTSSR	94,1	Альфа-протеинкиназа 1	0,011
GWVTDGFSSLK	99,4	Аполипопротеин С-III	0,030
LLVVYPWTQR	97,2	Субъединица гемоглобина гамма-2	0,025
FQPTLLTLPR	39,1	Ингибитор плазменной протеазы С1	0,010
NSAISPQK	75,4	Цинковый белковый протеин 644	0,301
<i>Изолированное действие алюминия</i>			
INGKPLPGATPAK	39,8	тРНК селеноцистеин 1-ассоциированный белок 1	0,0001
GLCVATPVQLR	98,7	Дополнение С4-В	0,0001
QRIEALSLMHPISIFSLR	61,3	Белок репарации несоответствия ДНК Mlh3	0,002
NIVQNVR	28,9	Сидерофлексин-3	0,029
LMAKAEDLR	69,8	Нск-ассоциированный белок 5-подобный	0,002
DDLIDLLNEAK	36,8	V-тип протонной АТФазы субъединицы Е 1	0,0001
EAMGKLYNFSTSSR	86,2	Альфа-протеинкиназа 1	0,004
QLCGCYLTR	82,3	Триметиллизиндиоксигеназы, митохондрии	0,0001
LPLPPQLLADLETSSMFTGD LECQKLLMEAMK	97,6	Кельч-подобный белок 4	0,016
GLPDDHAGPIR	35,4	Аланил-тРНК, редактирующий белок Aarsd1	0,001
GLEEELQFSLGSK	97,3	Дополнение С4-В	0,001
DESSLK	42,1	Вероятная Е3 убиквитин-протеиновая лигаза MID2	0,0001
EILSEVER	15,2	T-комплекс белка 1 субъединица гамма	0,0001
<i>Комбинированное действие смеси фтора и алюминия</i>			
KMGEMATSGDR	41,9	MARVEL-домен-содержащий белок 2	0,002
FQPTLLTLPR	48,7	Ингибитор протеазы С1 в плазме	0,021
YMPYNHQNK	52,8	Ацил-КоА (8-3) десатураза	0,003
APETGGAPRAGAGR	75,3	Серин / треонин-протеинкиназа LMTK3	0,037
NSAISPQK	64,8	Цинковый белковый протеин 644	0,069
DSLNMWLCPR	28,9	Ядерный рецептор-коактиватор 4	0,008
TSESGELHGLTTEEFVEGIYK	98,9	Транстиретин	0,006
CYTAVVPLVYGGETK	99,8	J-цепь иммуноглобулина	0,018
VSFLSALEEYTK	96,3	Аполипопротеин А-I	0,060
EAMGKLYNFSTSSR	93,2	Альфа-протеинкиназа 1	0,0001
LPLPPQLLADLETSSMFTGD	95,1	Кельч-подобный белок 4	0,004
LLVVYPWTQR	98,7	Субъединица гемоглобина гамма-2	0,544
EILSEVER	78,9	T-комплекс белка 1 субъединица гамма	0,012

антагонизме данных химических веществ при развитии негативных эффектов [11].

По результатам натуральных исследований установлено, что у детей группы наблюдения, подвергающихся длительной аэрогенной экспозиции одновременно алюминия (0,0005 мг/(кг·день)) и фтора (0,002 мг/(кг·день)), в моче зарегистрирован повышенный в 2,8 раза уровень алюминия и в 1,8 раза – фторид-иона относительно данных группы сравнения ($p = 0,006-0,039$).

В ходе исследования достоверно отличающихся белков плазмы крови крыс групп наблюдения относительно контрольных показателей на двумерных электрофореграммах суммарно идентифицировано 10 белковых фракций при изолированном воздействии фтора, 13 – при изолированном воздействии алюминия и 13 – при комбинированной экспозиции смеси изучаемых химических веществ (табл. 2).

При комбинированном воздействии смеси изучаемых химических веществ установлены следующие

Таблица 3

Тожественные белки, выявленные при экспериментальной и реальной комбинированной экспозиции алюминия и фтора ($p \leq 0,05$)

Наименование белка	Относительный объем белкового пятна, int			
	Среднее значение показателя \pm стандартная ошибка среднего, $\bar{X} \pm SEM$			
	при экспериментальной экспозиции		при реальной экспозиции	
	опытная группа с комбинированным действием веществ	контрольная группа	группа наблюдения	группа сравнения
Кельч-подобный белок 4	4097 \pm 106 $p=0,012$	469 \pm 224	2548 \pm 57 $p=0,0001$	94 \pm 36
J-цепь иммуноглобулина	2635 \pm 52 $p=0,007$	1785 \pm 86	1807 \pm 38 $p=0,0001$	101 \pm 34

щие белки, тождественные белкам, входящим в состав пятен при изолированном воздействии: фтора – ингибитор плазменной протеазы С1, цинковый белковый протеин 644, ядерный рецептор-коактиватор 4, J-цепь иммуноглобулина, аполипопротеин А-I, альфа-протеинкиназа 1, субъединица гемоглобина гамма-2; алюминия – альфа-протеинкиназа 1, Кельч-подобный белок 4, Т-комплекс белка 1 субъединица гамма. Увеличение содержания перечисленных белков, за исключением аполипопротеина А-I, цинкового белкового протеина 64, субъединицы гемоглобина гамма-2, имеет установленную причинно-следственную связь с повышенной концентрацией фторид-иона и алюминия в моче экспериментальных животных при их воздействии в смеси ($R^2 = 0,81-0,97$; $p = 0,0001-0,018$).

Сравнительный анализ достоверно отличающихся измененных белков в протеомном профиле плазмы крови у детей при реальной аэрогенной экспозиции относительно соответствующих данных детей вне экспозиции позволил установить из 25 белковых пятен два белка, количественно и качественно тождественных измененным белкам, установленным при комбинированном одновременном воздействии алюминия и фтора в экспериментальных условиях: J-цепь иммуноглобулина (ген, кодирующий его экспрессию JCHAIN) и Кельч-подобный белок 4 (ген KLHL4) (табл. 3).

Так, у детей группы наблюдения относительно данных детей группы сравнения установлено увеличение в 17,9–27,1 раза объема белков, содержащих

J-цепь иммуноглобулина и Кельч-подобный белок 4 ($p = 0,0001$), что сопоставимо с изменением объема пятен данных белков в эксперименте. Вероятность идентификации выявленных пептидов составила от 98,7 до 99,2 %. Пример двумерной электрофорграммы одного из пептидов представлен на рисунке.

Доказана зависимость увеличения относительного объема Кельч-подобного белка 4 и J-цепи иммуноглобулина от повышенного содержания алюминия и фторид-иона в моче при одновременном воздействии веществ в смеси. Параметры модели для Кельч-подобного белка 4: $R^2 = 0,07$; $b_0 = 1180,64$; $b_1 = 9141,60$; $b_2 = 190,10$ ($p = 0,046$); и J-цепи иммуноглобулина: $R^2 = 0,06$; $b_0 = 1804,56$; $b_1 = 5767,11$; $b_2 = 206,47$ ($p = 0,030$).

Обобщение и анализ существующих научных данных о биологической функции идентифицированных белков плазмы крови позволяет прогнозировать развитие ряда негативных эффектов со стороны иммунной и сердечно-сосудистой систем. Так, основная функция J-цепи иммуноглобулина заключается в инициации полимеризации IgM и IgA [15]. Включение J-цепи в полимерный IgA и пентамерный IgM придает этим антителам высокую валентность антигенсвязывающих сайтов и нулевой потенциал активации комплемента. Данные изменения обуславливают способность иммуноглобулинов агглютинировать бактерии и вирусы, что не позволяет им инициировать каскад воспалительных реакций. Тем самым секреторные антитела образуют «первую линию» защиты от патогенов и вредных веществ,

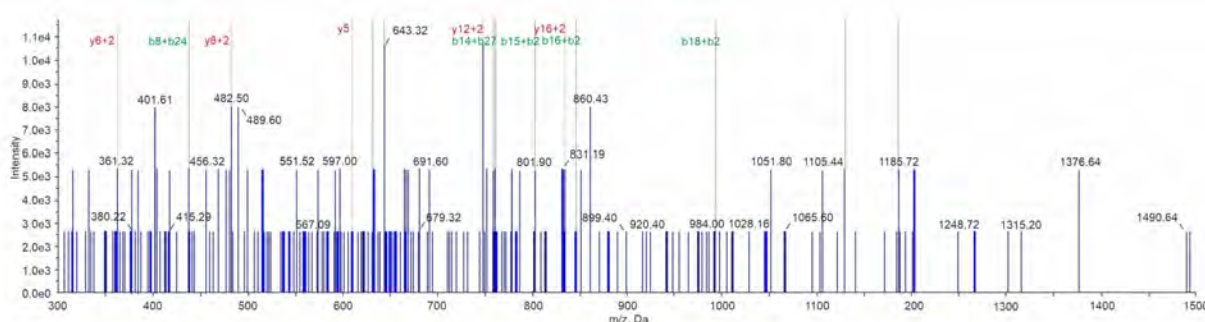


Рис. Масс-спектрометрическая идентификация пептида LPLLPQLLADLETSSMFTGDLECQKLLMEAMK (Кельч-подобный белок 4) плазмы крови ребенка (база данных SwissProt)

которые проникают в организм через слизистые оболочки [16]. При комбинированном действии алюминия и фторсодержащих соединений наблюдается повышение относительного объема пятна, содержащего J-цепь иммуноглобулина как в реальных, так и в экспериментальных условиях, что может свидетельствовать об адаптивных перестройках иммунного ответа с дальнейшим развитием дефицита IgA и IgM, характерного для хронического воспаления [17].

Белки семейства Kelch играют решающую роль в различных клеточных процессах, включая организацию цитоскелета и стробирование ионных каналов. Данный процесс сопровождается переходом ионного канала из открытого в закрытое состояние [18, 19]. Ионные каналы (калий- и кальций-зависимые), обнаруженные в эндотелиоцитах, вовлечены в транспорт электролитов, нарушение которого может способствовать уменьшению просвета сосудов и увеличению периферического сосудистого сопротивления. В связи с этим можно предположить, что избыточная экспрессия гена, следовательно, и синтез Кельч-подобного белка, запускает механизмы регуляции сосудистого тонуса [20]. При комбинированном воздействии смеси изучаемых химических соединений, как в экспериментальных, так и реальных условиях, установлена прямая связь между повышением уровня Кельч-подобного белка и повышенным содержанием алюминия и фторид-иона в моче. Это может свидетельствовать о негативном воздействии смеси изучаемых веществ на становление склеротических и воспалительных изменений сосудистой стенки при комбинированном поступлении.

Таким образом, идентификация изменений белков плазмы крови – Кельч-подобного белка 4 и J-цепи иммуноглобулина – актуальна для ранней диагностики, прогноза, оценки и предупреждения риска развития заболеваний сердечно-сосудистой, иммунной систем, крови и кроветворных органов, ассоциированных с длительным аэрогенным комбинированным воздействием одновременно соединений алюминия и фтора.

Выводы:

1. Длительная аэрогенная комбинированная экспозиция одновременно соединений алюминия и фтора на уровне низких средних суточных доз (0,0005 мг/(кг·день) и 0,002 мг/(кг·день) соответственно) обуславливает в моче экспонированных

детей повышенные (относительно данных неэкспонированных детей) концентрации алюминия (в 2,8 раза) и фторид-иона (в 1,8 раза), что верифицируется результатами экспериментальных исследований комбинированного воздействия смеси изучаемых химических веществ.

2. Обоснованы тождественные омик-маркеры – J-цепь иммуноглобулина (ген JCHAIN) и Кельч-подобный белок 4 (ген KLHL4), экспрессия которых установлена как при экспериментальной, так и при реальной комбинированной аэрогенной экспозиции одновременно соединений алюминия и фтора.

3. Доказана причинно-следственная связь между повышенным уровнем тождественных белков и концентрацией алюминия и фторид-иона в моче при одновременном воздействии веществ в смеси.

4. Идентифицированные белковые маркеры плазмы крови при сохраняющейся аэрогенной комбинированной экспозиции соединений алюминия и фтора позволяют прогнозировать развитие негативных эффектов в виде снижения активности гуморального звена иммунитета (при экспрессии J-цепи иммуноглобулина) и нарушения тонуса сосудистой стенки (при экспрессии Кельч-подобного белка 4).

5. Установлены клеточно-молекулярные механизмы вовлечения трансформированного протеомного профиля в развитие негативных эффектов, характеризующиеся: при экспрессии J-цепи иммуноглобулина – увеличением валентности антигенсвязывающих центров IgA и IgM, приобретением нулевого потенциала активации комплемента, детерминирующего адаптивные перестройки иммунного ответа; при экспрессии Кельч-подобного белка 4 – последовательным закрытием калий- и кальцийзависимых ионных каналов эндотелиоцитов, нарушением транспорта электролитов, уменьшением просвета и увеличением сопротивления сосудов.

6. Прогнозируемые негативные эффекты можно оценить как результат простого суммарного (аддитивного) токсического действия алюминия и фтора при их одновременной комбинированной аэрогенной экспериментальной и реальной экспозиции.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment // World Health Organization. – 2009. – № 7. – 83 p.
2. Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals. Series on Testing and Assessment // OECD. – 2018. – № 296. – 119 p.
3. Hadley M.B., Baumgartner J., Vedanthan R. Developing a Clinical Approach to Mitigating Risks of Air Pollution and Protecting Cardiovascular Health // Circulation. – 2018. – Vol. 137, № 7. – P. 725–742. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030377

4. WHO global air quality guidelines. Particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide [Электронный ресурс] // World Health Organization. – 2021. – URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345329/9789240034228-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (дата обращения: 12.11.2021).
5. Оценка токсичности и потенциальной опасности наночастиц оксида алюминия для здоровья человека / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, М.С. Степанков, А.М. Игнатова // Экология человека. – 2018. – № 5. – С. 9–15. DOI: 10.33396/1728-0869-2018-5-9-15
6. Донских И.В. Влияние фтора и его соединений на здоровье населения (обзор данных литературы) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – Т. 91, № 3. – Ч. 2. – С. 179–185.
7. Минтель М.В., Землянова М.А., Жданова-Заплесвичко И.Г. Некоторые аспекты совместного действия алюминия и фтора на организм человека (обзор литературы) // Экология человека. – 2018. – № 9. – С. 12–18. DOI: 10.33396/1728-0869-2018-9-12-17
8. Методики протеомного анализа и их роль в диагностике акушерской и гинекологической патологии / Н.Г. Сазонова, Т.А. Макаренко, Р.Я. Оловяникова, В.А. Кутяков, А.Б. Салмина // Журнал акушерства и женских болезней. – 2019. – Т. 68, № 1. – С. 69–82. DOI: 10.17816/JOWD68169-82
9. Поиск белковых биомаркеров при атеросклерозе с помощью протеомных технологий как перспективное направление науки / Р.А. Жетишева, М.А. Ковалева, И.А. Каменихина, Л.И. Ковалев, В.Г. Наумов // Атеросклероз и дислипидемии. – 2020. – № 2. – С. 12–19. DOI: 10.34687/2219–8202.JAD.2020.02.0002
10. Оценка интегральной токсичности факторов и объектов среды обитания с использованием альтернативных биологических тест-моделей: методология и технологии / Е.В. Дроздова, Н.В. Дудчик, С.И. Сычик, В.В. Шевляков. – Минск: Белорусский научно-исследовательский институт транспорта «Транстехника», 2017. – 216 с.
11. Effects of aluminum, fluorine and their mixtures on the enzyme activities of jejunal mucus membrane in the perfusion of small intestine of rats in vivo / B. Xiao, D. Li, Q. Dong, Q. Li, S. Li, C. Zhan // Journal of West China University of Medical Sciences. – 1992. – Vol. 23, № 1. – P. 79–82 (in Chinese).
12. Strunecka A., Strunecky O., Patocka J. Fluoride plus aluminum: Useful tools in laboratory investigations, but messengers of false information // Physiol. Res. – 2002. – Vol. 51, № 6. – P. 557–564.
13. Li L. The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications // Crit. Rev. Oral Biol. Med. – Vol. 14, № 2. – P. 100–114. DOI: 10.1177/154411130301400204
14. Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes / M. Suwalsky, B. Norris, F. Villena, F. Cuevas, P. Sotomayor, P. Zatta // Food Chem. Toxicol. – 2004. – Vol. 42, № 6. – P. 925–933. DOI: 10.1016/j.fct.2004.01.016
15. Koshland M.E. The coming of age of the immunoglobulin J chain // Annu. Rev. Immunol. – 1985. – Vol. 3. – P. 425–453. DOI: 10.1146/annurev.iy.03.040185.002233
16. Johansen F.E., Braathen R., Brandtzaeg P. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation // Scand. J. Immunol. – 2000. – Vol. 52, № 3. – P. 240–248. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2000.00790.x
17. Москалец О.В. Иммуноглобулин А и его селективный дефицит // Казанский медицинский журнал. – Т. 98, № 5. – С. 809–813. DOI: 10.17750/KMJ2017-809
18. KLHL4, a novel p53 target gene, inhibits cell proliferation by activating p21^{WAF/CDKN1A} / S.-H. Choi, S.-Y. Cho, J. Song, M.-W. Hur // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2020. – Vol. 530, № 3. – P. 588–596. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.100
19. Kelch-like proteins: Physiological functions and relationships with diseases / X. Shi, S. Xiang, J. Cao, H. Zhu, B. Yang, Q. He, M. Ying // Pharmacol. Res. – 2019. – Vol. 148. – P. 104404. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104404
20. Солодков А.П., Беляева Л.Е., Лазуко С.С. Стресс и артериальная гипертензия // Практикующий лікар. – 2013. – № 3. – С. 78–80.

Выявление омик-маркеров негативных эффектов, ассоциированных с аэрогенным комбинированным воздействием соединений алюминия и фтора / М.А. Землянова, Н.В. Зайцева, Ю.В. Кольдибекова, А.Н. Пережогин, М.С. Степанков, Н.И. Булатова // Анализ риска здоровью. – 2022. – № 1. – С. 123–132. DOI: 10.21668/health.risk/2022.1.13

UDC 616.092
DOI: 10.21668/health.risk/2022.1.13.eng



Research article

ON DETECTING OMIC-MARKERS OF NEGATIVE EFFECTS ASSOCIATED WITH COMBINED AEROGENIC EXPOSURE TO ALUMINUM AND FLUORIDE COMPOUNDS

M.A. Zemlyanova^{1,2,3}, N.V. Zaitseva¹, Yu.V. Koldibekova¹, A.N. Perezhgin⁴, M.S. Stepankov¹, N.I. Bulatova¹

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

²Perm State National Research University, 15 Bukireva Str., Perm, 614990, Russian Federation

³Perm National Research Polytechnic University, 29 Komsomolsky prospekt, Perm, 614990, Russian Federation

⁴Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East awarded by the Labour Red Banner, 78 Trilissera Str., Irkutsk, 664047, Russian Federation

At present, it is relevant to study simultaneous combined impacts exerted by chemicals on developing adverse health effects. It is also becoming vital to search for molecular indicators of adverse effects with the altered expression level. This alteration makes it possible to determine peculiarities of molecular and cellular pathogenesis mechanisms regarding a number of non-communicable diseases under exposure to a mixture of chemicals.

Our research goal was to comparatively analyze and identify identical omic-markers of adverse effects under experimental and actual combined aerogenic exposure to aluminum and fluoride compounds. We substantiated molecular markers of prenosological changes by sequential implementation of an algorithm which included identifying altered proteins and peptides in blood plasma which were identical both under experimental and actual exposure; detecting and quantifying cause-effect relations between identical proteins and peptides and concentrations of aluminum and fluoride ion in urine.

The research results indicate that long-term combined aerogenic exposure to aluminum and fluoride compounds in low average daily doses (0.0005 mg/(kg·day) and 0.002 mg/(kg·day) accordingly) causes elevated concentrations of aluminum (by 2.8 times higher) and fluoride-ion (by 1.8 times higher) in exposed children's urine. This fact is verified by experimental research with its focus on combined exposure to the examined chemicals. We were able to substantiate identical omic-markers, J-chain of immunoglobulin and Kelch-like protein 4 (KLHL4 gene), under simultaneous exposure to aluminum and fluoride compounds both under experimental and actual combined aerogenic exposure. We proved a cause-effect relation between levels of identical proteins and concentrations of aluminum and fluoride ion in urine under simultaneous exposure to the mixture of the examined chemicals. Identified protein markers in blood plasma give an opportunity to predict future adverse effects including developing immunoglobulins A and M deficiency with subsequent humoral immunity failure when J-chain of immunoglobulin is expressed; occurring sclerotic and inflammatory changes in vascular walls when Kelch-like protein 4 is expressed. These predicted adverse effects can be estimated as resulting from simple summated (additive) toxic impacts exerted by aluminum and fluoride under simultaneous combined aerogenic exposure to both chemicals

Key words: aluminum and fluoride ion in urine, risk of adverse effects, isolated and combined exposure, blood plasma proteomic profile, immune system, cardiovascular system, immunoglobulin J-chain and Kelch-like protein 4.

© Zemlyanova M.A., Zaitseva N.V., Koldibekova Yu.V., Perezhgin A.N., Stepankov M.S., Bulatova N.I., 2022

Marina A. Zemlyanova – Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher acting as the Head of the Department for Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Techniques; Associate Professor at the Department of Microbiology and Virology (e-mail: zem@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 236-39-30; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8013-9613>).

Nina V. Zaitseva – Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Scientific Director (e-mail: znv@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 237-25-34; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2356-1145>).

Yulia V. Koldibekova – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, the Head of the Laboratory for Metabolism and Pharmacokinetics at the Department for Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Techniques (e-mail: koldibekova@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 237-18-15; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3924-4526>).

Alexey N. Perezhgin – the Head of the Department for Sanitary Protection of the Territory and Emergency Situations Monitoring (e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru; tel.: +7 (395) 222-04-10; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5678-468X>).

Mark S. Stepankov – Junior Researcher at the Laboratory for Biochemical and Nanosensory Diagnostics (e-mail: stepankov@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 237-18-15; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7226-7682>).

Natalya I. Bulatova – Researcher at the Laboratory for Biochemical and Nanosensory Diagnostics (e-mail: 1179815@mail.ru; tel.: +7 (342) 236-80-18; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3392-9097>).

References

1. Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment. *World Health Organization*, 2009, no. 7, 83 p.
2. Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals, Series on Testing and Assessment. *OECD*, 2018, no. 296, 119 p.
3. Hadley M.B., Baumgartner J., Vedanthan R. Developing a clinical approach to mitigating risks of air pollution and protecting cardiovascular health. *Circulation*, 2018, vol. 137, no. 7, pp. 725–742. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030377
4. WHO global air quality guidelines, Particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. *World Health Organization*, 2021. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345329/9789240034228-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (12.11.2021).
5. Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Stepankov M.S., Ignatova A.M. Scientific forecasting of toxicity and evaluation of hazard potential of aluminum oxide nanoparticles for human health. *Ekologiya cheloveka*, 2018, no. 5, pp. 9–15. DOI: 10.33396/1728-0869-2018-5-9-15 (in Russian).
6. Donskikh I.V. The influence of fluorine and its compounds on people's health (literature review). *Byulleten' VSNTs SO RAMN*, 2013, vol. 91, no. 3, part 2, pp. 179–185 (in Russian).
7. Mintel M.V., Zemlyanova M.A., Zhdanova-Zaplesvichko I.G. Some aspects of synergistic action of aluminum and fluorine on human body (literature review). *Ekologiya cheloveka*, 2018, no. 9, pp. 12–18. DOI: 10.33396/1728-0869-2018-9-12-17 (in Russian).
8. Sazonova N.G., Makarenko T.A., Olovyanikova R.Ya., Kutyaikov V.A., Salmina A.B. Proteomic analysis methods and their role in the diagnosis of obstetric and gynecological pathology. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei*, 2019, vol. 68, no. 1, pp. 69–82. DOI: 10.17816/JOWD68169-82 (in Russian).
9. Zhetisheva R.A., Kovaleva M.A., Kamenihina I.A., Kovalev L.I., Naumov V.G. The protein biomarkers search in atherosclerosis using proteomic technologies – as a promising area of science. *Ateroskleroz i dislipidemii*, 2020, no. 2, pp. 12–19. DOI: 10.34687/2219–8202.JAD.2020.02.0002 (in Russian).
10. Drozdova E.V., Dudchik N.V., Sychik S.I., Shevlyakov V.V. Otsenka integral'noi toksichnosti faktorov i ob"ektov srede obitaniya s ispol'zovaniem al'ternativnykh biologicheskikh test-modelei: metodologiya i tekhnologii [Integrated toxicity assessment of environmental factors and objects using alternative biological test models: methodology and technology]. Minsk, Belorusskii nauchno-issledovatel'skii institut transporta «Transtekhnika» Publ., 2017, 216 p. (in Russian).
11. Xiao B., Li D., Dong Q., Li Q., Li S., Zhan C. [Effects of aluminum, fluorine and their mixtures on the enzyme activities of jejunal mucus membrane in the perfusion of small intestine of rats in vivo]. *Journal of West China University of Medical Sciences*, 1992, vol. 23, no. 1, pp. 79–82 (in Chinese).
12. Strunecka A., Strunecky O., Patocka J. Fluoride plus aluminum: Useful tools in laboratory investigations, but messengers of false information. *Physiol. Res.*, 2002, vol. 51, no. 6, pp. 557–564.
13. Li L. The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 100–114. DOI: 10.1177/154411130301400204
14. Suwalsky M., Norris B., Villena F., Cuevas F., Sotomayor P., Zatta P. Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes. *Food Chem. Toxicol.*, 2004, vol. 42, no. 6, pp. 925–933. DOI: 10.1016/j.fct.2004.01.016
15. Koshland M.E. The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu. Rev. Immunol.*, 1985, vol. 3, pp. 425–453. DOI: 10.1146/annurev.iy.03.040185.002233
16. Johansen F.E., Braathen R., Brandtzaeg P. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand. J. Immunol.*, 2000, vol. 52, no. 3, pp. 240–248. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2000.00790.x
17. Moskalets O.V. Immunoglobulin A and its selective deficiency. *Kazanskii meditsinskii zhurnal*, vol. 98, no. 5, pp. 809–813. DOI: 10.17750/KMJ2017-809 (in Russian).
18. Choi S.-H., Cho S.-Y., Song J., Hur M.-W. KLHL4, a novel p53 target gene, inhibits cell proliferation by activating p21^{WAF/CDKN1A}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020, vol. 530, no. 3, pp. 588–596. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.100
19. Shi X., Xiang S., Cao J., Zhu H., Yang B., He Q., Ying M. Kelch-like proteins: Physiological functions and relationships with diseases. *Pharmacol. Res.*, 2019, vol. 148, pp. 104404. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104404
20. Solodkov A.P., Belyaeva L.E., Lazuko S.S. Stress i arterial'naya gipertenziya [Stress and arterial hypertension]. *Praktikuyuchii likar*, 2013, no. 3, pp. 78–80 (in Russian).

Zemlyanova M.A., Zaitseva N.V., Koldibekova Yu.V., Perezhogin A.N., Stepankov M.S., Bulatova N.I. On detecting omicromarkers of negative effects associated with combined aerogenic exposure to aluminum and fluoride compounds. *Health Risk Analysis*, 2022, no. 1, pp. 123–132. DOI: 10.21668/health.risk/2022.1.13.eng

Получена: 21.01.2022

Одобрена: 04.03.2022

Принята к публикации: 11.03.2022