

© ПЕСКОВА Е.В., 2025



Пескова Е.В.

Экспериментальная оценка комбинированного действия химических веществ на основе квантификации белков плазмы крови

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
Роспотребнадзора, 614045, Пермь, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Современные методы оценки комбинированного действия химических веществ предполагают математическую обработку данных, не учитывающую изменения на молекулярном уровне.

Цель исследования — оценка комбинированного действия химических веществ с применением квантификации белков плазмы крови биологической модели на примере оксида алюминия, фторида водорода и бенз(а)пирена.

Материалы и методы. Методами химико-аналитического, статистического, протеомного и биоинформационного анализа проведена оценка комбинированного действия химических веществ в эксперименте на крысах линии Wistar.

Результаты. При комбинированном действии оксида алюминия, фторида водорода и бенз(а)пирена происходят нарушения на молекулярном уровне, в том числе активация окислительного стресса, изменения регуляции внутриклеточных процессов, подавление активности цикла и функций клетки. Комбинированное действие изучаемых веществ по критерию изменения экспрессии белков оценено как синергетическое. Это указывает на усиление эффекта при совместном действии оксида алюминия, фторида водорода и бенз(а)пирена относительно их изолированной экспозиции.

Ограничения исследования. Проведённое исследование не позволяет сделать окончательных выводов об особенностях комбинированного действия изучаемых химических веществ, поскольку используемый метод имеет ограничения по количеству идентифицируемых белков.

Заключение. Установленные молекулярные эффекты комбинированного действия изучаемых химических веществ (преимущественно синергетического характера) расширяют теоретические представления о механизмах их токсичности, подходы к раннему выявлению и обоснованию мер профилактики риск-индуцированных нарушений здоровья человека.

Ключевые слова: протеомный профиль; комбинированная экспозиция; биологическая модель; биоинформационный анализ; негативные эффекты; профилактика риска

Соблюдение этических стандартов. Экспериментальные исследования на биологической модели проведены с соблюдением требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных или в иных научных целях (ETS № 123). Исследования одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» (протокол заседания № 1 от 4.02.2021 г.).

Для цитирования: Пескова Е.В. Экспериментальная оценка комбинированного действия химических веществ на основе квантификации белков плазмы крови. *Гигиена и санитария*. 2025; 104(5): 648–654. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2025-104-5-648-654> <https://elibrary.ru/egjmic>

Для корреспонденции: Пескова Екатерина Владимировна, e-mail: peskova@fcrisk.ru

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт средств федерального бюджета.

Поступила: 20.02.2025 / Поступила после доработки: 13.03.2025 / Принята к печати: 26.03.2025 / Опубликовано: 27.06.2025

Ekaterina V. Peskova

Experimental evaluation of combined effect of chemical substances on the base of quantification of blood plasma proteins

ABSTRACT

Introduction. Modern methods for assessing the combined effects of chemicals include mathematical processing of data that does not take into account changes at the molecular level.

The purpose of the study is to evaluate the combined effect of chemicals based on the quantification of blood plasma proteins in a biological model (using the example of aluminum oxide, hydrogen fluoride, and benzo(a)pyrene)

Materials and methods. Using chemical-analytical, statistical, proteomic, and bioinformatic analysis methods, an assessment of the combined effect of chemical substances was carried out in an experiment on Wistar rats.

Results. The combined action of aluminum oxide, hydrogen fluoride, and benz(a)pyrene causes disturbances at the molecular level, including activation of oxidative stress, changes in the regulation of intracellular processes, suppression of the activity of the cycle and cell functions. The combined action of the substances studied according to the criterion of changes in protein expression is assessed as synergistic. This indicates to an increase in the effect of the combined action of aluminum oxide, hydrogen fluoride, and benz(a)pyrene relative to their isolated exposure.

Limitations. The conducted study does not allow drawing final conclusions about the specifics of the combined action of the studied chemicals, since the method used has limitations in the number of identified proteins.

Conclusion. The established molecular effects of the combined action of the studied chemical substances (mainly of a synergistic nature) expand theoretical understanding of the mechanisms of their toxicity, approaches to early detection, and justification of measures to prevent risk-induced human health disorders.

Keywords: proteomic profile; combined exposure; biological model; bioinformatics analysis; adverse effects; risk prevention

Compliance with ethical standards. Experimental studies on a biological model were carried out in compliance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123). The studies were approved by the Biomedical Ethics Committee of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies (minutes of meeting No. 1 of 04.02.2021).

For citation: Peskova E.V. Experimental evaluation of the combined action of chemicals on the base of blood plasma protein quantification. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2025; 104(5): 648–654. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2025-104-5-648-654> <https://elibrary.ru/egjmic> (In Russ.)

For correspondence: Ekaterina V. Peskova, e-mail: peskova@fcrisk.ru

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received: February 20, 2025 / Revised: March 13, 2025 / Accepted: March 26, 2025 / Published: June 27, 2025

Введение

Современные научные исследования в области повышения эффективности социально-гигиенического мониторинга, контрольно-надзорной деятельности и медико-профилактических мер индивидуального и группового уровня предполагают всестороннее изучение действия химических веществ на организм человека с применением различных методологий и подходов. Актуальные инструменты и практические рекомендации по оценке действия химических смесей содержатся в руководящих документах, подготовленных Всемирной организацией здравоохранения (WHO)¹, Агентством по охране окружающей среды (USEPA)², Международной программой химической безопасности (IPCS)³ и Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека^{4,5}. Однако они не учитывают ранних клеточно-молекулярных изменений, лежащих в основе негативных эффектов при комбинированном действии химических веществ.

Геномные технологии, такие как протеомика, в сочетании с цифровыми аналитическими методами активно используются для изучения механизмов повреждающего действия химических веществ, однако их внедрение в практику ограничено [1, 2]. Исследование изменений синтеза белков и кодирующих их генов позволяет прогнозировать негативные последствия на ранних этапах, до появления признаков повреждений [3–5]. Однако вариабельность протеомного профиля при действии смеси химических веществ, что в реальных условиях является закономерным, изучена недостаточно, отсутствуют единые подходы к её оценке.

Исследование влияния химических веществ в реальных условиях сопряжено с определёнными сложностями, поскольку организм человека подвергается одновременному воздействию множества факторов. Токсикологические эксперименты позволяют минимизировать влияние посторонних факторов и создать оптимальные условия для изучения патогенетических закономерностей в обстановке, приближенной к реальной [6]. Выявленные метаболические нарушения модельных организмов при действии химических веществ в дальнейшем экстраполируются на человека благодаря высокой степени генетической гомологии [7].

Цель исследования — оценка комбинированного действия химических веществ с применением квантификации белков плазмы крови биологической модели на примере оксида алюминия, фторида водорода и бенз(а)пирена.

Материалы и методы

Для оценки изменений протеомного профиля плазмы крови биологической модели (крысы-альбиносы линии Wistar) проведён эксперимент продолжительностью 180 дней. Ингаляционное поступление химических веществ в организм животных обеспечивали с помощью специальной камеры, моделирующей ежедневное воздействие среднесуточных концентраций в районах расположения металлургических пред-

приятий [8]. Отбор проб воздуха из камеры для определения концентрации изучаемых веществ осуществляли на фильтр АФА-ХП-10-1 в течение всего периода экспозиции со скоростью подачи 2 дм³/мин. Животных разделили на пять групп по 20 особей в каждой. В опытную группу 1 вошли животные, получавшие ингаляционно изолированно аэрозоль водной суспензии оксида алюминия (Al₂O₃), в группу 2 — фторида водорода (HF), в группу 3 — бенз(а)пирена (C₂₀H₁₂). В группу 4 включены животные, подвергавшиеся комбинированному воздействию аэрозольной смеси водных суспензий изучаемых химических веществ (Al₂O₃, HF и C₂₀H₁₂) на уровне доз при изолированном поступлении. Контрольную группу содержали в тех же условиях, но не подвергали экспозиции изучаемым химическими веществами (табл. 1).

Содержание контаминантов в биосредах (кровь, моча) животных определяли утверждёнными химико-аналитическими методами в соответствии с МУК 4.1.773–99, МУК 4.1.3040–12 и МУК 4.1.3589–19. Исследования на биологической модели проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или в иных научных целях (ETS № 123) и этического комитета ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (протокол заседания № 1 от 4.02.2021 г.).

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью пакета программ Statistica 10. Сравнительная оценка результатов опытной группы выполнена относительно аналогичных показателей контроля. Для описания использовано среднее арифметическое исследуемого показателя (*M*) и стандартное отклонение (*SD*). Значимость различий переменных между группами определена по критерию Манна – Уитни (*U*, *p* ≤ 0,05).

Протеомное исследование плазмы крови проведено по технологии двумерного электрофореза. Идентификация аминокислотных последовательностей осуществлялась методом масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной хроматографией. Обработка спектральных данных выполнена в программе ProteinPilot с идентификацией по базе данных UniProt для вида *Rattus norvegicus*. Основная часть информации о полученных белках экстрагирована из базы данных UniProt⁶. Информация о генах, кодирующих выявленные белки, получена с помощью ресурса Rat Genome Database⁷. Описание биологических характеристик белков выполнено на основе данных ресурса The Gene Ontology⁸.

Определение особенностей комбинированного действия веществ основано на анализе параметризованных причинно-следственных связей экспозиции с изменением экспрессии белков и количественной оценке дополнительной вероятности развития негативных эффектов [9, 10]. На первом этапе использована модель множественной логистической регрессии, предусматривающая оценку вероятности изменения экспрессии белка в плазме крови животных опытной группы относительно контроля. При одновременной экспозиции тремя веществами учитываются их бинарные сочетания в различных комбинациях. Расчёт вероятности производится по формуле (1):

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3)}} \quad (1)$$

где *p* — вероятность изменения экспрессии белка опытной группы относительно контроля при одновременном развитии эффектов изолированного и комбинированного действия трёх веществ; *x*₁, *x*₂, *x*₃ — концентрации каждого контаминанта в биосреде при экспозиции тремя веществами (маркёры экспозиции, подтверждающие факт действия каждого вещества), мг/дм³; *b*₀ — параметр модели, характеризующий уровень вероятности изменения экспрессии белка

¹ Meek M.E., Boobis A.R., Crofton K.M., Heinemeyer G., Raaij M.V., Vickers C. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* Published online April 2, 2011. <https://orcid.org/10.1016/j.yrtph.2011.03.010>

² US EPA. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures; 2000. Доступно: https://ofmpub.epa.gov/eims/eimscmm.getfile?p_download_id=4486

³ WHO. Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment. Доступно: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44113/9789241563833_eng.pdf?sequence=1

⁴ Р 2.1.10.3968–23 «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих среду обитания». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. 221 с.

⁵ СанПиН 1.2.3685–21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 2 от 28.01.2021 г.

⁶ UniProt. Доступно: <https://www.uniprot.org>

⁷ Rat Genome Database. Доступно: <https://rgd.mcw.edu/rgdweb/homepage/>

⁸ Gene Ontology Resource. Доступно: <https://geneontology.org/>

Таблица 1 / Table 1

Среднесуточные дозы (мг/(кг · день)) ингаляционной экспозиции химических веществ для каждой экспериментальной группы животных

Average daily doses (mg/(kg · day)) of inhalation exposure to chemicals for each experimental group studied

Химическое вещество Chemical substance	При реальной экспозиции At real exposure	При экспериментальной экспозиции / During experimental exposure				
		Опытная группа / Experimental group				Контрольная группа Control group
		1	2	3	4	
Al ₂ O ₃ Оксид алюминия / Aluminum oxide	0.0005	0.0025	—	—	0.0025	—
HF Фторид водорода / Hydrogen fluoride	0.002	—	0.012	—	0.012	—
C ₂₀ H ₁₂ Бенз(а)пирен / Benzo(a)pyrene	0.000003	—	—	0.00001	0.00001	—

Таблица 2 / Table 2

Среднегрупповая концентрация (мг/дм³) химических веществ в биосредах экспериментальных животных при изолированном и комбинированном действии веществ, $M \pm SD$

Average group concentration (mg/dm³) of chemical substances in the biological media in experimental animals with isolated and combined action of substances, $M \pm SD$

Исследуемая группа Study group	Al в моче Al in urine	F-ион в моче F-ion in urine	C ₂₀ H ₁₂ в крови C ₂₀ H ₁₂ in the blood
Опытная группа 1 (Al ₂ O ₃) / Experimental group 1 (Al ₂ O ₃)	0.057 ± 0.029* $p = 0.008$	—	—
Опытная группа 2 (HF) / Experimental group 2 (HF)	—	6.800 ± 4.362 $p = 0.003$	—
Опытная группа 3 (C ₂₀ H ₁₂) / Experimental group 3 (C ₂₀ H ₁₂)	—	—	0.00001 ± 0.000 $p = 0.008$
Опытная группа 4 (Al ₂ O ₃ + HF + C ₂₀ H ₁₂) Experimental group 4 (Al ₂ O ₃ + HF + C ₂₀ H ₁₂)	0.019 ± 0.010 $p = 0.047$	2.072 ± 0.752 $p = 0.0001$	0.00002 ± 0.00001 $p = 0.0001$
Контрольная группа / Control group	0.016 ± 0.013	0.354 ± 0.171	0.000 ± 0.000

Примечание. * p — достоверность различий между опытной и контрольной группами.

Note: * p — significance of differences between groups.

Таблица 3 / Table 3

Среднегрупповое значение интенсивности белкового пятна в группах при изолированном и комбинированном действии Al₂O₃, HF и C₂₀H₁₂, $M \pm SD$

Average group value of protein spot intensity in groups with isolated and combined action Al₂O₃, HF and C₂₀H₁₂, $M \pm SD$

№	Наименование белка Protein name	Ген, кодирующий белок Gene encoding protein	Опытная группа, подвергнутая воздействию An experimental group exposed to				Контрольная группа Control group
			1 Al ₂ O ₃	2 HF	3 C ₂₀ H ₁₂	4 Al ₂ O ₃ + HF + C ₂₀ H ₁₂	
1	Белок 9, содержащий ассоциативный домен Ras Ras association domain-containing protein 9	<i>Rassf9</i>	—	1881 ± 135	—	2753 ± 291	477 ± 73
2	Белок SEC22b, транспортирующий везикулы Vesicle-traffic protein SEC22b Фактор элонгации 1-γ Elongation factor 1-γ	<i>Sec22b</i> <i>Eef1g</i>	2116 ± 111	—	2961 ± 70	2925 ± 314	503 ± 149
3	Тенеурин-2 / Teneurin-2	<i>Tenm2</i>	1870 ± 90	—	3320 ± 265	2635 ± 143	310 ± 73
4	Аполипопротеин А-1 / Apolipoprotein A-I	<i>Apoa1</i>	3925 ± 283	3086 ± 96	3215 ± 39	2227 ± 333	1436 ± 184
5	фактор фон Виллебранда von Willebrand factor	<i>Vwf</i>	—	2843 ± 368	3405 ± 63	3160 ± 183	2054 ± 118
6	Пероксинитритизомераза THAP4 Peroxynitrite isomerase THAP4	<i>Thap4</i>	—	2586 ± 78	—	2303 ± 217	1725 ± 62
7	Транстиретин / Transthyretin	<i>Tir</i>	2671 ± 413	2808 ± 605	2341 ± 84	4097 ± 295	1785 ± 239
8	Фактор элонгации 1-γ / Elongation factor 1-γ	<i>Eef1g</i>	2451 ± 46	—	2310 ± 247	1847 ± 80	421 ± 106

Таблица 4 / Table 4

Особенности комбинированного действия алюминия, бенз(а)пирена и фторид-иона в бинарных сочетаниях с учётом изменения экспрессии белков
Features of the combined action of aluminum, benzo(a)pyrene, and fluoride ion in binary combinations taking into account changes in protein expression

№	Наименование белка Protein name	Направление изменения показателя Direction of change of the indicator	Коэффициенты регрессии / Regression coefficients										Варианты комбинированного действия веществ в бинарных сочетаниях Options of combined action of substances in binary combinations			
			при изолированном действии in isolated action			при комбинированном действии with combined action										
			фооновый уровень background level											Al ₂ O ₃ и HF	Al ₂ O ₃ + C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂ + HF
				Al ₂ O ₃ (x ₁)	HF (x ₂)	C ₂₀ H ₁₂ (x ₃)	Al ₂ O ₃ + HF (x ₁₂)	Al ₂ O ₃ + C ₂₀ H ₁₂ (x ₁₃)	C ₂₀ H ₁₂ + HF (x ₁₄)	b ₁ b ₂	b ₁ b ₃	b ₂ b ₃				
			b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁ b ₂	b ₁ b ₃	b ₂ b ₃							
1	Белок 9, содержащий ассоциативный домен Ras Ras association domain-containing protein 9	Повышение Elevation	−1.7	−37.2	−1.8	222969.8	175.6	−24227320.0	91080.9	Антагонизм* Antagonism*	Синергизм по C ₂₀ H ₁₂ и антагонизм по HF Synergism at C ₂₀ H ₁₂ and antagonism at HF	Al ₂ O ₃ + C ₂₀ H ₁₂	b ₁ b ₃	b ₂ b ₃		
2	Белок SEC22b, транспортирующий везикулы Vesicle-trafficking protein SEC22b Фактор элонгации 1-γ Elongation factor 1-gamma	Повышение Elevation	0.1	−64.2	−2.1	190511.6	171.5	−22195570.0	84767.0	Антагонизм* Antagonism*	Синергизм по C ₂₀ H ₁₂ и антагонизм по HF Synergism at C ₂₀ H ₁₂ and antagonism at HF					
3	Тенеурин-2 Teneurin-2	Повышение Elevation	−0.6	−10.7	0.0	20412.7	16.7	−3268109.0	32284.8	Синергизм Synergism	Синергизм по C ₂₀ H ₁₂ и антагонизм по HF Synergism at C ₂₀ H ₁₂ and antagonism at HF					
4	Аполипопротеин А-1 Apolipoprotein A-1	Повышение Elevation	0.0	30.7	0.3	2259.0	−26.2	−1106712.0	23198.8	Антагонизм Antagonism	Антагонизм					
5	Фактор фон Виллебранда von Willebrand factor	Повышение Elevation	−0.4	−38.2	−1.3	266341.7	127.4	−25117310.0	107115.6	Антагонизм* Antagonism*	Синергизм по C ₂₀ H ₁₂ и антагонизм по HF Synergism at C ₂₀ H ₁₂ and antagonism at HF					
6	Пероксинитритизомераза THAP4 Peroxynitrite isomerase THAP4	Повышение Elevation	−0.8	11.1	0.3	−15778.7	−26.8	9430732.0	−72384.9	Антагонизм Antagonism	Синергизм* Synergism*					
7	Транстиретин Transthyretin	Повышение Elevation	−3.1	−52.5	0.0	69816.3	17.6	718422.0	−13298.9	Синергизм Synergism	Синергизм					
8	Фактор элонгации 1-γ Elongation factor 1-gamma	Повышение Elevation	0.1	22.5	−0.2	29142.0	6.2	−2909236.0	13778.0	Синергизм Synergism	Антагонизм* Antagonism*					

Примечание. * – типы взаимодействий химических веществ с усилением токсического эффекта.
Note: * – types of chemical interactions with enhancement of the toxic effect.

Таблица 5 / Table 5

Количественная оценка особенностей комбинированного действия алюминия, бенз(а)пирена и фторид-иона с учётом дополнительной вероятности изменения экспрессии белка

Quantitative assessment of the combined effects of aluminum, benzo(a)pyrene, and fluoride ion, considering the additional probability of changes in protein expression

№	Название белка Protein name	Направление изменения показателя Direction of change of the indicator	Дополнительная вероятность изменения экспрессии белка (Δp) Additional probability of protein expression change (Δp)			Особенность комбинированного действия трёх веществ The peculiarity of the combined action of three substances
			при фоновом уровне at background level	одновременно изолированное и комбинированное действие трёх веществ simultaneously isolated and combined action of three substances	комбинированное действие трёх веществ combined action of three substances	
1	Белок 9, содержащий ассоциативный домен Ras Ras association domain-containing protein 9	Повышение Elevation	0.122	0.436	0.389	Синергизм Synergism
2	Белок SEC22b, транспортирующий везикулы Vesicle-trafficking protein SEC22b Фактор элонгации 1-γ Elongation factor 1-γ	Повышение Elevation	0.336	0.511	0.354	Синергизм Synergism
3	Тенеурин-2 Teneurin-2	Повышение Elevation	0.341	0.593	0.274	Синергизм Synergism
4	Аполипопротеин A-1 Apolipoprotein A-I	Повышение Elevation	0.590	0.673	0.047	Синергизм Synergism
5	фактор фон Виллебранда von Willebrand factor	Повышение Elevation	0.317	0.774	0.593	Синергизм Synergism
6	Пероксинитритизомераза ТНАР4 Peroxynitrite isomerase TNAP4	Повышение Elevation	0.330	0.341	−0.025	Антагонизм Antagonism
7	Транстиретин Transthyretin	Повышение Elevation	0.025	0.099	0.077	Синергизм Synergism
8	Фактор элонгации 1-γ Elongation factor 1-γ	Повышение Elevation	0.583	0.581	0.007	Синергизм Synergism

опытной группы относительно контроля независимо от влияния изучаемых факторов экспозиции (фоновый уровень); $b_1, b_2, b_3, b_{12}, b_{13}, b_{23}$ — параметры модели, характеризующие скорость нарастания вероятности изменения экспрессии белка опытной группы относительно контроля при единичном увеличении маркера экспозиции при изолированном действии веществ x_1, x_2, x_3 и комбинированном в бинарной смеси x_{12}, x_{13}, x_{23} .

В качестве независимых переменных выступают концентрации маркёров экспозиции в биологических средах, в качестве зависимых — значения экспрессии белков, доказанно связанные с экспозицией веществ. Полученные результаты интерпретировали на основе матрицы экспертной оценки характера комбинированного действия химических веществ, включающей анализ знаков коэффициентов регрессии полученных моделей [10].

На следующем этапе проведена количественная оценка дополнительной вероятности при одновременном действии веществ, основанная на расчёте разницы между вероятностями изменения экспрессии белка по формуле (2):

$$\Delta p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_{12} + b_{13}x_{13} + b_{23}x_{23})}} - \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3)}}, \quad (2)$$

где Δp — дополнительная вероятность изменения экспрессии белка в результате эффектов комбинированного действия трёх веществ.

Если значение дополнительной вероятности находится в положительном знаке, то типом комбинированного действия веществ является синергизм, если в отрицательном — антагонизм. Преимущественный тип комбинированного действия веществ оценивали на основе анализа долевого вклада каждого типа в общую структуру.

Результаты

Анализ результатов химико-аналитического исследования показал, что $C_{20}H_{12}$ и при изолированной, и при комбинированной экспозиции изучаемыми веществами идентифицирован в крови крыс опытных групп 3 и 4 при отсутствии его в контроле ($p = 0,000–0,008$) (табл. 2).

При сравнительном анализе содержания F-иона в моче установлено, что его концентрация у крыс опытной группы 2 в 19,2 раза выше среднего значения данного показателя контрольной группы ($p = 0,003$), опытной группы 4 — в 5,8 раза ($p = 0,0001$). У крыс опытной группы 1 концентрация Al в моче превысила показатель контроля в 3,6 раза ($p = 0,008$), у группы 4 — в 1,2 раза ($p = 0,047$). При комбинированной экспозиции концентрации Al и F-иона в моче крыс ниже в 3–3,3 раза, чем при изолированной, что указывает на возможное взаимодействие веществ на уровне их всасывания, распределения и выведения. Уровень $C_{20}H_{12}$ в крови при комбинированном действии выше в два раза, что может свидетельствовать о нарушении механизмов его метаболизма и детоксикации в условиях присутствия других химических веществ.

Анализ протеомного профиля плазмы крови животных опытной группы 4, подвергнутых воздействию смеси веществ, позволил установить 23 белка, имеющих достоверные отклонения экспрессии (по критерию интенсивности) от показателей контроля и доказанно связанные с экспозицией одновременно тремя веществами. Из них только 8 белков встречаются как минимум в одной группе при изолированном действии и при комбинации веществ (табл. 3).

Выявлены варианты комбинированного действия изучаемых веществ в бинарных сочетаниях на экспрессию данных белков (табл. 4). В комбинации $Al_2O_3 + HF$ действие веществ

определено преимущественно как антагонистическое (62,5% от общего количества вариантов), при этом в большинстве случаев токсический эффект ослаблялся. В смесях $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{C}_{20}\text{H}_{12}$ и $\text{C}_{20}\text{H}_{12} + \text{HF}$ действие имеет как синергетический, так и антагонистический характер, однако количественная оценка особенностей комбинированной экспозиции трёх веществ с учётом дополнительной вероятности изменения экспрессии белков относительно изолированного действия позволила установить в 87,5% случаев синергетический тип действия исследуемых веществ (табл. 5).

Обсуждение

В ходе исследования выявлено, что одновременное воздействие оксида алюминия, фторида водорода и бенз(а)пирена вызывает значительные изменения в экспрессии белков и кодирующих их генов (по критерию интенсивности белковых пятен) по сравнению с изолированным воздействием каждого вещества и контрольной группой.

Проведённый протеомный анализ плазмы крови экспериментальных животных показал изменения в экспрессии ряда белков, участвующих в регуляции внутриклеточных процессов. Фактор элонгации 1-γ (ген *Eef1g*) выполняет множество функций в организме и часто сверхэкспрессируется при нарушениях в клетке [11]. Функция белка 9, содержащего ассоциативный домен Ras (ген *Rassf9*), до конца не определена, однако предполагается, что он участвует в регуляции транспорта везикул в клетке [12].

Синтез аполипопротеина А-1 (ген *Apoa1*) и транстирети-на (ген *Ttr*) усиливался при повышении концентрации изучаемых веществ в биосредах, что указывает на активацию механизмов окислительного стресса. Аполипопротеин А-1 обладает выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, активность которых возрастает при воспалительных реакциях, что способствует снижению уровня окислительного стресса [13, 14]. Экспрессия белка транстиретины увеличивается как защитный фактор против окислительного стресса, включающий механизмы устранения повреждения, направленные на репарацию, удаление или замещение повреждённых молекул [15].

Установлена повышенная экспрессия белков (фактор фон Виллебранда (ген *Wf*) и пероксинитритизомераза ТНАР4 (ген *Thap4*), участвующих в процессах клеточного цикла. Белковое семейство ТНАР участвует в различных клеточных процессах, в том числе транскрипции генов, росте и развитии клеток [16]. Уровень фактора фон Виллебранда повышается для поддержания гемостаза, способствует адгезии тромбоцитов к местам сосудистых повреждений [17].

Повышенная экспрессия части исследуемых белков при комбинированном действии веществ свидетельствует об изменении определённых клеточных функций. Белок SEC22b, транспортирующий везикулы (ген *Sec22b*), принимает участие в процессах слияния мембран, везикулярном транспорте, перекрёстной презентации антигенов, секреторной аутофагии и других биологических механизмах, обеспечива-

ющих нормальное функционирование клеток [18]. Белки семейства тенеуринов, к числу которых относится тенеурин-2 (ген *Tenm2*), в первую очередь участвуют в миграции нейронов, наведении аксонов, а также в формировании, дифференцировке и поддержании синапсов в ЦНС [19].

Полученные результаты протеомного профилирования согласуются с полученными другими авторами данными о молекулярных механизмах и возникающих патологических процессах при действии изучаемых веществ [20–25]. Фтор способен изменять гомеостаз физиологических систем посредством трансформации клеточного окислительно-восстановительного баланса, что может привести к последующим неблагоприятным эффектам: повреждению ДНК, аутофагии, апоптозу, митохондриальной дисфункции, митофагии, остановке клеточного цикла и другим нарушениям [20]. Токсические эффекты Al связаны в первую очередь с его прооксидантной активностью, ингибированием и активацией ферментов, а также влиянием на энергетический обмен [25]. $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$ активирует сигнальный путь рецептора ароматических углеводородов, запуская перекисное окисление липидов и воспаление [23]. Он не только обладает общетоксическим действием на организм, в основе которого лежит иммуносупрессивный эффект, но также имеет канцерогенные свойства [24, 25].

Полученные результаты подчёркивают важность интеграции протеомного анализа в оценку комбинированного действия химических веществ, обнаружения ключевых молекулярных точек и механизмов развития негативных эффектов для повышения точности прогноза и профилактики риск-индуцированных нарушений здоровья человека.

Заключение

Предложена методология оценки комбинированного действия химических веществ, основанная на исследовании трансформации протеомного профиля плазмы крови по критерию изменения интенсивности белкового пятна. Сравнительная оценка позволила характеризовать комбинированное действие Al_2O_3 , HF и $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$ как синергетическое (87,5% случаев). В сочетании с биоинформационным анализом выявлены механизмы токсического действия веществ на молекулярном уровне, указывающие на развитие ряда патогенетических путей: изменения регуляции внутриклеточных процессов (усиление экспрессии фактора элонгации 1-γ и белка 9, содержащего ассоциативный домен Ras) и клеточного цикла (усиление экспрессии фактора фон Виллебранда и пероксинитритизомераза ТНАР4), активацию окислительного стресса (усиление экспрессии аполипопротеина А-1 и транстиретины) и подавление клеточных функций (усиление экспрессии белка SEC22b, транспортирующего везикулы и тенеурин-2). Установленные молекулярные эффекты комбинированного действия изучаемых химических веществ расширяют теоретические представления о механизмах их токсичности, открывают новые возможности раннего выявления и обоснования профилактики риск-индуцированных нарушений здоровья человека.

Литература

(п.п. 1–4, 11–25 см. References)

- Зайцева Н.В., Землянова М.А., Долгих О.В. Геномные, транскриптомные и протеомные технологии как современный инструмент диагностики нарушений здоровья, ассоциированных с воздействием факторов окружающей среды. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(1): 6–12. <https://elibrary.ru/pipsea>
- Соседова Л.М., Филиппова Т.М. Роль биомоделирования в системе химической безопасности человека. *Экология человека*. 2017; (7): 46–52. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2017-7-46-52> <https://elibrary.ru/yunopd>
- Землянова М.А., Пескова Е.В., Степанков М.С. Протеомное профилирование плазмы крови при хронической экспериментальной экспозиции оксидом алюминия как инструмент прогноза негативных эффектов со стороны критических органов и систем человека. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(10): 1125–31. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-10-1125-1131> <https://elibrary.ru/oyysbv>
- Шекунова Е.В., Ковалева М.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020; 10(1): 19–28. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28> <https://elibrary.ru/kvzbv>
- Зайцева Н.В., Землянова М.А., Кольдибекова Ю.В., Кирьянов Д.А., Чигвинцев В.М. Оценка особенности комбинированного действия ряда химических веществ на основе анализа параметризованных причинно-следственных связей маркёров экспозиции и негативных эффектов и количественной оценки дополнительного риска для здоровья. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(10): 1132–42. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-10-1132-1142> <https://elibrary.ru/qhvjbh>
- Зайцева Н.В., Землянова М.А., Пескова Е.В. Прогноз вероятных негативных эффектов, инициированных трансформацией протеомного профиля плазмы крови человека при комбинированном действии химических веществ. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(5): 407–15. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-5-407-415> <https://elibrary.ru/acuahh>

References

- Cote I., Andersen M.E., Ankley G.T., Barone S., Bimbaum L.S., Boekelheide K., et al. The next generation of risk assessment multi-year study-highlights of findings, applications to risk assessment, and future directions. *Environ. Health Perspect.* 2016; 124(11): 1671–82. <https://doi.org/10.1289/EHP233> 2016
- Sturla S.J., Boobis A.R., FitzGerald R.E., Hoeng J., Kavlock R.J., Schirmer K., et al. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 2014; 27(3): 314–29. <https://doi.org/10.1021/tx400410s>
- Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics.* 2002; 1(11): 845–67. <https://doi.org/10.1074/mcp.r200007-mcp200>
- Corzett T.H., Fodor I.K., Choi M.W., Walsworth V.L., Turteltaub K.W., McCutchen-Maloney S.L., et al. Statistical analysis of variation in the human plasma proteome. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 258494. <https://doi.org/10.1155/2010/258494>
- Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Dolgikh O.V. Genomic, transcriptomic and proteomic technologies as a modern tool for health disorders diagnostics, associated with the impact of environmental factors. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(1): 6–12. <https://elibrary.ru/pipsea> (in Russian)
- Sosedova L.M., Filippova T.M. The role of biosimulation in human chemical safety system. *Ekologiya cheloveka*. 2017; (7): 46–52. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2017-7-46-52> <https://elibrary.ru/yunopd> (in Russian)
- Zemlyanova M.A., Peskova E.V., Stepankov M.S. Proteomic profiling of blood plasma in chronic experimental exposure to aluminum oxide as a tool for predicting adverse effects from critical human organs and systems. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(10): 1125–31. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-10-1125-1131> <https://elibrary.ru/oyysbv> (in Russian)
- Shekunova E.V., Kovaleva M.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Dose selection in preclinical studies: cross-species dose conversion. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2020; 10(1): 19–28. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28> <https://elibrary.ru/kvzbv> (in Russian)
- Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Koldibekova Ju.V., Kiryanov D.A., Chigvintsev V.M. Evaluation of the peculiarity of the combined action of a number of chemicals based on the analysis of parameterized cause-effect relationships of markers of exposure and negative effects and quantitative evaluation of additional health risk. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(10): 1132–42. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-10-1132-1142> <https://elibrary.ru/qhvjbh> (in Russian)
- Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Peskova E.V. Forecast of probable negative effects initiated by transformation of the proteomic profile of human blood plasma under combined exposure to chemicals. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2024; 103(5): 407–15. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-5-407-415> <https://elibrary.ru/acuahh> (in Russian)
- Luigi C. EEF1G (Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 2020; 24(2): 58–68. <https://doi.org/10.4267/2042/70656>
- Chen L., Johnson R.C., Milgram S.L. P-CIP1, a novel protein that interacts with the cytosolic domain of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, is associated with endosomes. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(50): 33524–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33524>
- Cooke A.L., Morris J., Melchior J.T., Street S.E., Jerome W.G., Huang R., et al. A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL. *J. Lipid. Res.* 2018; 59(7): 1244–55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M085332>
- Guo Q., Zhang C., Wang Y. Overexpression of apolipoprotein A-I alleviates endoplasmic reticulum stress in hepatocytes. *Lipids Health Dis.* 2017; 16(1): 105. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0497-3>
- Li X., Masliah E., Reixach N., Buxbaum J.N. Neuronal production of transthyretin in human and murine Alzheimer's disease: is it protective? *J. Neurosci.* 2011; 31(35): 12483–90. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2417-11.2011>
- Dehaene H., Praz V., Lhôte P., Lopes M., Herr W. THAP11F80L cobalamin disorder-associated mutation reveals normal and pathogenic THAP11 functions in gene expression and cell proliferation. *PLoS One.* 2020; 15(1): e0224646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224646>
- Shahidi M. Thrombosis and von Willebrand Factor. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 906: 285–306. https://doi.org/10.1007/5584_2016_122
- Sun W., Tian B.X., Wang S.H., Liu P.J., Wang Y.C. The function of SEC22B and its role in human diseases. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2020; 77(8): 303–12. <https://doi.org/10.1002/cm.21628>
- Antinucci P., Suleyman O., Monfries C., Hindges R. Neural mechanisms generating orientation selectivity in the retina. *Curr. Biol.* 2016; 26(14): 1802–15. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.035>
- Pal P., Jha N.K., Pal D., Jha S.K., Anand U., Gopalakrishnan A.V., et al. Molecular basis of fluoride toxicities: Beyond benefits and implications in human disorders. *Genes Dis.* 2022; 10(4): 1470–93. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.09.004>
- Exley C. Human exposure to aluminium. *Environ. Sci. Process Impacts.* 2013; 15(10): 1807–16. <https://doi.org/10.1039/c3em00374d>
- Ohsaka Y., Nomura Y. Rat white adipocytes activate p85/p110 PI3K and induce PM GLUT4 in response to adrenoceptor agonists or aluminum fluoride. *Physiol. Int.* 2016; 103(1): 35–48. <https://doi.org/10.1556/036.103.2016.1.4>
- Duan J., Chen C., Li H., Ju G., Gao A., Sun Y., et al. Multifaceted protective effects of hesperidin by aromatic hydrocarbon receptor in endothelial cell injury induced by benzo[a]pyrene. *Nutrients.* 2022; 14(3): 574. <https://doi.org/10.3390/nu14030574>
- Madeen E., Siddens L.K., Uesugi S., McQuistan T., Corley R.A., Smith J., et al. Toxicokinetics of benzo[a]pyrene in humans: Extensive metabolism as determined by UPLC-accelerator mass spectrometry following oral micro-dosing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2019; 364: 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.12.010>
- Salem M.L., El-Ashmawy N.E., Abd El-Fattah E.E., Khedr E.G. Immunosuppressive role of Benzo[a]pyrene in induction of lung cancer in mice. *Chem. Biol. Interact.* 2021; 333: 109330. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109330>

Сведения об авторе

Пескова Екатерина Владимировна, аспирант, мл. науч. сотр. отд. биохимических и цитогенетических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», 614045, Пермь, Россия. E-mail: peskova@fcrisk.ru

Information about the author

Ekaterina V. Peskova, postgraduate student, junior researcher, Department of biochemical and cytogenetic diagnostic methods of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-8050-3059> E-mail: peskova@fcrisk.ru