

3. Кашнельсон Б.А., Makeev O.Г., Дегтярёва Т.Д. Экспериментальное испытание комплекса средств биологической защиты организма от канцерогенного действия комбинации экотоксикантов. [Текст]/ Б.А. Кашнельсон, О.Г. Makeev, Т.Д. Дегтярёва, Л.И. Привалова, В.А. Буханцев, С.А. Денисенко, Т.В. Слышкина, Н.П. Макаренко, И.Х. Измайлов, Е.С. Куликов// Токсикологический вестник. - Москва, №3, 2007. С. 15-20
4. Patching S.G., Gardiner P.H.E. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review [Text]// J. Trace Element Med. Bio. 1999. Vol. 13. P.193-214.

КРИТЕРИИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Буханцев В.А., Довженко Е.И., Минин В.В., Ошурков П.А.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Makeev O.Г.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава

ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Обобщение результатов многолетних исследований в области культивирования постнатальных человеческих клеточных линий, предназначенных для применения в клинике, позволило разработать четырехэтапную схему отбора по критериям включения/исключения, направленную на обеспечение безопасности клеточной терапии.

Схема отбора сформирована на основании анамнестических данных и данных врачебного осмотра, результатов лабораторных исследований, включающих исследования клеточных культур, а также результатов тестового введения клеток.

Одним из ключевых принципов обеспечения безопасности является непрерывность мониторинга. Он осуществляется на каждом этапе по определенным критериям. При заборе материала – отбор пациентов по критериям исключения участников испытаний. К абсолютным критериям относятся острые и хронические заболевания в стадии обострения, в том числе сопровождающиеся тканевой дезорганизацией, а также аутоиммунные заболевания соединительной ткани (коллагенозы) и иммунодефицитные состояния. К критериям исключения относится потенциальная инфицированность возбудителями социально-значимых заболеваний.

Важной составляющей мониторинга является оценка неоплазии в культурах. В наших исследованиях для анализа мутаций используется ДНК, выделенная из культивируемых клеток, культуральной жидкости и, с целью подтверждения неогенеза, – из крови испытуемых. Анализируются мутации в генах p53 кодон 175 (1 мутация), кодон 248 (3 мутации), кодон 273 (4 мутации), B-gal (2 мутации), K-ras (2 мутации) [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Цель исследования – разработка эффективных критериев безопасности применения аутологичных клеточных культур при проведении клинических испытаний.

Материалы и методы исследования

Потенциальную инфицированность возбудителями социально-значимых заболеваний (ВИЧ, вирусные гепатиты В, С, цитомегаловирусная инфекция, туберкулез, токсоплазмоз, инфекции, вызываемые *Chlamydia spp.*) устанавливали иммунофлуоресцентным и иммунополяризационным методами с использованием закрытых систем (AbbotLab) на анализаторе AxSym или с помощью ПЦР-анализа (с применением наборов Flash).

Для анализа использовали ДНК, выделенную из культивируемых клеток, культуральной жидкости и ядродержащих клеток крови доноров.

Кровь отбирали в одноразовые вакуумные полистироловые пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА (Vacutest, Италия), в количестве 9 мл. После чего кровь центрифугировали в мягких условиях при 350g, для сохранения ядродержащих клеток в течение 10 мин при 4°C. На этом этапе использовали рефрижераторную центрифугу MLW K23D (Германия). Далее отбирали ядродержащие клетки с 200-250 мкл плазмы в 1,5 мл полипропиленовую пробирку, не захватывая эритроцитов, и осаждали на центрифуге «MicroSpine» фирмы «Erpendorf» при 8000g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ядродержащих клеток сохраняли до выделения ДНК при -85°C.

Выделение ДНК проводили по методике фенольной депротеинизации. Для чего в культуральную жидкость добавляли 10% SDS в соотношении 1:10 и NaCl до 1M. После перемешивания проводили последовательную экстракцию фенолом, смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24/1). Водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли в качестве соосадителя раствор гликогена. Содержимое пробирки тщательно перемешивали на Vortex-центрифуге и добавляли 2 объема 96% этилового спирта. Смесь выдерживали в морозильной камере при -25°C в течение 1,5 часов, ДНК осаждали при 13000g в течение 10 мин. Осадок растворяли в деионизованной воде, обработанной DEPC, и сохраняли при -30°C до проведения исследования.

Для выделения ДНК из ядродержащих клеток крови и культивируемых клеток, суспензию предварительно обрабатывали протеиназой К в течение 5 часов, с последующей фенольной депротеинизацией по вышеописанной методике.

Анализ ДНК на наличие мутаций проводили в соответствии с трехэтапной схемой: 1) скрининг на наличие изменения структуры экзонов генов-супрессоров опухолевого роста и протоонкогенов с использованием SSCP-анализа; 2) уточнение структурных изменений в экзонах посредством аллель-специфичной ПЦР и рестрикционного анализа экзонов; 3) верификация типа и положения мутации, а также количества мутантных аллелей в образце в ходе RT-ПЦР.

На первом этапе выделенную из культивируемых клеток и культуральной жидкости ДНК подвергали амплификации со специфическими праймерами (Табл.1), подбор которых осуществлялся на основании сиквенсов генов GeneBank, RefSeq, UniGene и программ Vector NTI 7.0 (Infor Max Inc.), OligoAnalyzer 3.0, PrimerQuest (IDT SciTools).

Амплификация проводилась на термоамплификаторе «Терцик МС-2» (НПО «ДНК-Технология», Россия) с использованием программного обеспечения TherCyc 2.2 (firmware). Объем реакционной смеси – 25 мкл. Температурный режим: 93°C – 1 мин, денатурация цепей 93°C – 15 сек, отжиг праймеров 59-62°C – 30 сек, в зависимости от нуклеотидного состава, элонгация цепи - 72°C – 30 сек, количество циклов – 35.

Гель-электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (соотношение акриламид-бисакриламид: 49/1) с 1xTBE-буфером (pH-8,3) при напряжении 130 В. В качестве маркеров длины использовались готовые фрагменты по 100 bp («СибЭнзим», Россия). В гель вносили продукты ПЦР. Гель окрашивали бромидом этидия в концентрации 0,1мг/100 мл окрашивающего раствора. Продолжительность инкубации в окрашивающем растворе – 15 минут. После окрашивания гель помещали на трансиллюминатор и при помощи видеосистемы для документирования гелей «Gel Imager» («Helicon») фиксировали изображение геля.

При проведении SSCP-электрофореза продукты ПЦР вместе с денатурирующим буфером (на 1 мл: 980 мкл динитрированного формамида, 20 мкл ЭДТА, pH-8,0, 0,25 мг ксиленианола, 0,25 мг бромфенолового синего) в соотношении 1/1 инкубировали при 99°C в течение 5 мин, после прогревания пробы немедленно переносили на лед, а затем вносили в гель. Электрофорез выполняли в 8% полиакриламидном геле. Для приготовления геля использовался 40% раствор акриламид-бисакриламид (5 мл), 2,5 мл 10xTBE буфера, 30 мкл TEMED, денитрированная вода до 25 мл.

Таблица 1

Первичный скрининг культуры клеток на наличие изменения структуры в экзонах генов-супрессоров опухолей и протоонкогенов с использованием SSCP-анализа

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	p53 - ex 5 – Fw	5'-TCATATGCTTGCCTGATAGGA-3'
2	p53 - ex 5 – Rt	5'-AGGGACTAATTTAATGCACACCCGG-3'
3	p53 - ex 6 – Fw	5'-GCTGCCGTGTCATCCAGTTGCGTATC-3'
4	p53 - ex 6 – Rt	5'-AGGGGGCCCGACCTATGAAGCATCAG-3'
5	p53 - ex 7 – Fw	5'-TTGCCAGGTCCAGGCACCTCTGATTC-3'
6	p53 - ex 7 – Rt	5'-ACTGCTCACCAGAGCCACCTGACAAC-3'
7	p53 - ex 8 – Fw	5'-GCCTCATTCGTGGACCTGTGTATC-3'
8	p53 - ex 8 – Rt	5'-ATGTGATGAGACGTGGATGTAGTAG-3'
9	B-raf – Rev N3	5'-GCCTCTGCTTCTCTCAGCTACCTGAG-3'
10	B-raf – Fw N3	5'-TCTGAGGCATAACTCGACTGCCTTGGTC-3'
11	K-ras – Rev N12	5'-TCCGGTCAGCAGTCCTGACTCGCC-3'
12	K-ras – Fw N12	5'-TCTTCGAGAATGGTCCGGACGC-3'

Таблица 2

Рестрикционный анализ выявленных изменений в экзонах в сочетании с SSCP-анализа

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	K-ras – wt 3	5'-ACTGAAGTCTGCGATGTTGGACCT-3'
2	K-ras – Fad	5'-CCACGTCCACGTGCAAGAACT-3'
3	K-ras – Fc	5'-CCAGGTCCGGTAAGCGCTCACT-3'
4	p53 - ex 8 – Hpl	5'-GCCTCATCTACATAGCCTGTGTTATC-3'
5	p53 - ex 8 – Hpl	5'-AAATGTGATGAGATGGATGTTTCATAG-3'

**Алель-специфичная ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией
в системе резонансного тушения флюоресценции**

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	p53 - ex 5 – FR 15	5'-FAM-TGAGTACCCAGCTGCACAGACTCA-Dab/-3'
2	p53 - ex 6 – FR 16	5'-FAM-AGGAGAGTTAGTGGATGGCTCCT-Dab/-3'
3	p53 - ex 7 – FR 48	5'-FAM-ATTCTGAAGAAGTAAGGACGCAAT-Dab/-3'
4	p53 - ex 5 – Fw 2	5'-TTTGACTCTAACTGTGGC-3'
5	p53 - ex 5 – Rt 45	5'-CTCATGGTGGGCAGCATAG-3'
6	p53 - ex 6 – Fw 12	5'-GCTCCTGAGGTGTAGACCAA-3'
7	p53 - ex 6 – Rt 41	5'-AGTTACCGGCACTACACTCT-3'
8	p53 - ex 7 – Fw 9	5'-TGAGTTCACGCCCGATCTGCACTC-3'
9	p53 - ex 7 – Rt 42	5'-CCACTGCAGGCATGAAACACG-3'

Электрофорез проводился в вертикальной камере в 1хTBE-буфере при постоянном напряжении 380В в течение 5 часов. Результаты SSCP-электрофореза визуализировали при помощи окрашивания геля 0,1% раствором нитрата серебра. Фиксацию ДНК в геле проводили фиксирующим раствором (смесь 10% раствора технического этилового спирта и 0,5% ледяной уксусной кислоты в соотношении 1/1) в течение 5 мин, затем трехкратно в течение 5 мин отмывали гелевые пластины бидистиллированной водой от уксусной кислоты. После этого 15 мин инкубировали гель в 0,1% растворе нитрата серебра и однократно промывали бидистиллированной водой. Гель помещали в проявляющий раствор (1,5% NaOH, 0,15% формальдегид), приготовленный непосредственно перед применением, дважды промывали бидистиллированной водой, затем помещали гель в 0,75% раствор Na₂CO₃ на 15 мин. Все операции проводились при постоянном перемешивании растворов. Для получения изображения гель после просушки на сушильной рамке сканировали в проходящем свете на сканере Epson Perfection 3200 Photo.

На втором этапе работ проводилась алель-специфичная ПЦР с флюоресцентными зондами типа beacon собственного дизайна (Табл. 3), меченых 5'-FAM и 3'-Dabsyl (синтез – НПФ «Литех»). Объем реакционной смеси 25 мкл. Суммарный объем праймеров и зонда 10 мкл (по 4мкл/5пкмоль каждого праймера, 2мкл/ 5пкмоль зонда), 5 мкл 10кратного реакционного буфера (набор для проведения ПЦР с Taq-ДНК-полимеразой), 5 мкл смеси dNTP по 0,25 мМ каждого, 5 мкл опытной ДНК, 0,5 мкл (0,5U) глициринового раствора Taq-ДНК-полимеразы, денонизованная вода до 25 мкл.

Температурный режим - 93°C – 1 мин, денатурация цепей 93°C – 5 сек, отжиг праймеров 59-62°C – 5 сек, в зависимости от нуклеотидного состава, элонгация цепи - 67°C – 10 сек, количество циклов – 35.

Для детекции и документирования результатов использовался флюоресцентный детектор «Джин» (НПО «ДНК-Технология», Россия) и программное обеспечение Gene 3.3i (firmware). Детекция проводилась непосредственно после окончания ПЦР, пробирки с реакционной смесью охлаждали до 5°C, затем переносили в барабан флюоресцентного детектора.

Элементом второго этапа исследования является SSCP-электрофорез в сочетании с рестрикционным анализом исследуемого фрагмента гена (Табл. 2). Работы разделены на две части: предварительная амплификация с обогащением реакционной смеси после проведения реакции. Обогащение производили путем обработки амплификата рестриктазами, расщепляющими продукты генов «дикого» типа, в то время как мутантные формы не содержали сайтов рестрикции и, таким образом, не были затронуты. Для осуществления данной задачи для каждого гена был использован дополнительный праймер, вводящий точечную мутацию в синтезируемый продукт для обеспечения уязвимости амплифицируемых копий генов «дикого» типа для рестриктаз. Дизайн дополнительных праймеров таков, что при амплификации мутантных аллелей сайт рестрикции в них не вводится.

Реакции проводили в объеме 25 мкл. Суммарный объем растворов праймеров 5 мкл (по 2,5мкл/5пкмоль каждого праймера), 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера (набор для проведения ПЦР с Taq-ДНК-полимеразой), 2,5 мкл смеси dNTP по 2,5 мМ каждого, 2,5 мкл опытной ДНК, 0,5 мкл (0,5U) глициринового раствора Taq-ДНК-полимеразы, денонизованная вода до 25 мкл.

Температурный режим - 93°C – 1 мин, денатурация цепей 93°C – 1 мин, отжиг праймеров 59-62°C – 45 сек, в зависимости от нуклеотидного состава праймеров, элонгация цепи - 72°C – 1 мин, количество циклов – 25 для первого этапа, 35 для второго этапа амплификации. На первом этапе в реакцию вводили праймеры 5'-стандартный и 3'-вводящий сайт рестрикции. При этом амплификации подвергались как нормальные, так и мутантные формы исследуемых генов.

После проведения ПЦР 5 мкл продукта подвергали воздействию эндонуклеаз рестрикции. Инкубация проводилась при 60°C в течение одного часа. При этом ДНК-последовательности, соответствующие генам дикого типа, гидролизуются и в дальнейшей амплификации участия не принимают.

На втором этапе в реакцию вводили стандартные праймеры. В качестве матрицы использовались продукты ПЦР первого этапа после обработки рестриктазой. В ходе реакции амплифицировались мутантные

формы исследуемых генов. После завершения реакции, амплификат вторично обрабатывали эндонуклеазами рестрикции.

Электрофорез проводился в 8% полиакриламидном геле (49/1) в однократном TBE-буфере при постоянном напряжении 160 В. В качестве маркеров длины использовались готовые фрагменты по 100 bp («СибЭнзим», Россия). В гель вносили продукты второго этапа ПЦР до и после рестрикции. Гель окрашивали бромидом этидия в концентрации 0,1 мг/100 мл окрашивающего раствора. Продолжительность инкубации в окрашивающем растворе – 15 минут. После окрашивания гель помещали на трансиллюминатор и фиксировали изображение в ультрафиолетовом свете при помощи видеосистемы для документирования гелей «Gel Imager» («Helicon»). В случае присутствия в пробе мутантных форм исследуемых генов, на электрофореграмме продуктов ПЦР были видны полосы, обусловленные мутантным аллелем в сопровождении минорных полос (по видимому, остаточные рестрикционные фрагменты генов дикого типа). При отрицательном результате – продукт ПЦР на втором этапе не визуализировался. В качестве положительного контроля использовали образцы ДНК, содержащие мутантные формы генов, полученные из разных источников.

На заключительном этапе для количественного определения мутантного аллеля применяли метод ПЦР в реальном времени. Амплификация проводилась на детектирующем амплификаторе АНК-32 (ЗАО «Синтол», Россия), с использованием программного обеспечения qPCR 2.1 (firmware) и флюоресцентно меченых 5'-FAM и 3'-Dabsyl зондов собственного дизайна (синтез НПФ «Литех»).

Таблица 4

Окончательная верификация типа и положения мутации, определение количества мутантных аллелей в исследуемом образце

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	p53 - ex 5 – Fw 12	5'-GCTCCTGAGGTGTAGACGCCAA-3'
2	p53 - ex 5 – Rt 31	5'-TGAGATCACGCCACTGCATC-3'
3	p53 - ex 6 – Fw 13	5'-TTTGGGACCTCTAACCTGTGGC-3'
4	p53 - ex 6 – Rt 32	5'-CTCATGGTGGGGCAGCG-3'
5	p53 - ex 7 – Fw 14	5'-GCTCATGGTGGGGCAGT-3'
6	p53 - ex 7 – Rt 33	5'-AGATCACGCCACTGCCTCCG-3'
7	p53 - ex 8 – Fw 15	5'-AGATCACGCCACTGCCTCCA-3'
8	p53 - ex 8 – Rt 34	5'-AGATCACGCCACTGCCTCT-3'
9	B-raf – Rev V2	5'-AGATCACGCCACTGCCTCA-3'
10	B-raf – Fw V2	5'-CCAGGACAGGCACAAACAG-3'
11	K-ras – Rev 12	5'-CCAGGACAGGCACAAACACA-3'
12	K-ras – Fw 12	5'-CCCAGGACAGGCACAAACAA-3'
13	K-ras – Rev 61	5'-CCCAGGACAGGCACAAACAG-3'
14	K-ras – Fw 61	5'-CCCAGGACAGGCACAAAAT-3'

В состав реакционной смеси входили 2,5 мкл смеси dNTPs по 2,5 мМ каждого в растворе, 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера, содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I и пассивный референсный краситель ROX, раствор хлорида магния 25 мМ – 1 мкл, образец ДНК – 2,5 мкл, растворы праймеров – 5 мкл (по 2,5 мкл/5пкмоль каждого праймера), денонизованная вода – до 25 мкл. Все используемые в данной реакции реактивы – ЗАО «Синтол» (Россия). Температурный режим - 93°C – 30 сек, денатурация цепей 92°C – 5 сек, отжиг праймеров 58-63°C – 5 сек, в зависимости от нуклеотидного состава, элонгация цепи - 67°C – 10 сек, количество циклов – 30.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе культивирования критерии мониторинга включают в себя определение вторичной контаминации микоплазмой, ДНК которой, по нашим данным, выявляется в 16% культур клеток кожи. Последнее относится к относительным критериям исключения, так как преодолевается двадцатикратным увеличением концентрации тилозина в культуральной среде.

К относительным критериям относится наличие IgG к цитомегаловирусу в сыворотке крови, выявляемое у 95% испытуемых. Последнее свидетельствует о ранее перенесенной инфекции, так как специфических антител IgM к цитомегаловирусу в сыворотке крови испытуемых найдено не было ни в одном случае.

В предварительных слепых исследованиях 33 образцов крови больных с морфологически идентифицированной онкологической патологией I-II стадий различной локализации и 8 контрольных образцов было подтверждена высокая достоверность метода – 94% (от 1 до 2 исследуемых мутаций было выявлено в 31

образце крови, в 2 образцах крови больных и в 8 контрольных образцах мутаций не обнаружено; вероятность ложноотрицательного результата 6%).

В 152 исследованных краткосрочных культурах аутогенных фибробластов неогенез мутаций *in vitro* был подтвержден. Так, в клетках одной из культур, полученной из кожи испытуемой Н., была выявлена мутация в 248 кодоне гена p53 (G248C), получившая подтверждение в процессе выполнения всех этапов определения мутантных генов. Мутация была выявлена в клетках одной из культур испытуемой Н. после 3-го пассажа клеток. Однако в других параллельных культурах испытуемой, а также в образцах ее периферической крови мутации в гене p53 не найдено, что послужило основанием для выбраковки единичной культуры, содержащей мутантную ДНК.

Полученные результаты хорошо согласуются с проведенными за рубежом исследованиями, подтверждающими наличие элементов генетической нестабильности при длительном культивировании клеточных линий, а единичный положительный результат может свидетельствовать о том, что при сроках культивирования до 30 суток зарегистрированное генетическое событие является сравнительно редким.

Наряду с этим, как показывают проведенные исследования, необходимо одновременное исследование как ДНК культивируемых клеток донора, так и ядросодержащих клеток крови пациента, в связи с возможностью проявления уже имеющейся в клетках организма мутации. Отсутствие изменений ДНК в клетках периферической крови будет свидетельствовать о возникновении мутации *de novo*.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о возможности использования разработанной методики для многоступенчатого поэтапного контроля генетической стабильности культивируемых клеток.

Выводы

1. Разработанная высокоинформативная трехэтапная технология мониторинга генетической нестабильности культивируемых клеток, которая позволяет проводить выбраковку клеточного материала, являющегося возможным источником опухолевой трансформации в организме реципиента.

2. Исследование культур должно производиться в сочетании с анализом генома ядросодержащих клеток крови, что позволяет исключить возможность проявления уже имеющихся в геноме пациентов мутаций генов-супрессоров опухолевого роста и протоонкогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия, 2000, 65, 5-33.
2. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия, 2000, 65, 34-47.
3. Arguello, J R., A.-M. Little, A.L. Pay, D. Gallardo, I. Rojas, S.G.E. Marsh, J.M. Goldman, and J.A. Madrigal. 1998. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double strand conformation analysis. *Nat. Genet.* 18:192-194.
4. Prives, C. and Hall, P.A. The p53 pathway. *J. Path.*, 1999, 187, 112-126.
5. Woods, D. B. & Vousden, K. H. Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.*, 2001, 264, 56-66
6. Zhou B.-B.S., Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, 408, 433-439.

АНТИМУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ БИОПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ С ВЫСОКИМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

Буханцев В.А., Минин В.В., Довженко Е.И., Ошурков П.А.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Макеев О.Г.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава,

ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий.

ФГУН «ЕМНЦ профилактики и охраны здоровья рабочих промышленных предприятий Роспотребнадзора»

В продолжение испытания репарогенных/антимутагенных эффектов биопрофилактического комплекса (БПК), разработанного совместно с ФГУН «ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора», нами было проведено исследование на двух группах женщин с высоким риском развития онкопатологии, проживающих на территории города Карпинска.

Проведенный анализ экологических и медицинских данных по территории г. Карпинска позволили предположить, что основными факторами мутагенеза, обуславливающими превышение уровня онкопатологии, по сравнению с показателями других территорий Свердловской области, являются сочетание и усиливающее действие природных факторов среды в комплексе с высоким содержанием в почве и подземных водах металлов так называемого «тухололитового комплекса»: урана, титана, циркония, цинка, меди, свинца, хрома, бериллия и других редко встречающихся в природе элементов, а также техногенными поллютантами – бензо(а)пиреном (образующимся при сгорании местного угля) и фторсодержащей пылью (определяемой в выбросах Богословского алюминиевого завода). При этом естественная радиоактивность