

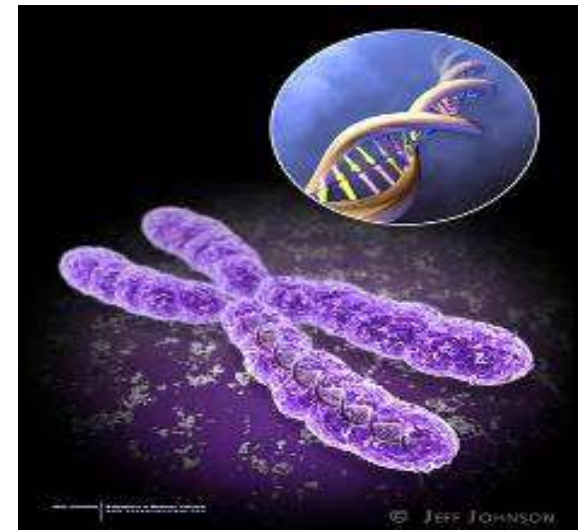
***ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРНЫЕ
ПОКАЗАТЕЛИ НАРУШЕНИЙ
ЗДОРОВЬЯ РАБОТНИКОВ
ПРЕДПРИЯТИЯ ПО ПОДЗЕМНОЙ
ДОБЫЧЕ ХРОМОВЫХ РУД***

д.м.н. Долгих Олег Владимирович

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь

Актуальность

- Внедрение новых диагностических технологий тестирования генных полиморфизмов, рецепторов и медиаторов иммунной регуляции позволяет прогнозировать и выявлять на ранних стадиях производственно обусловленные нарушения здоровья



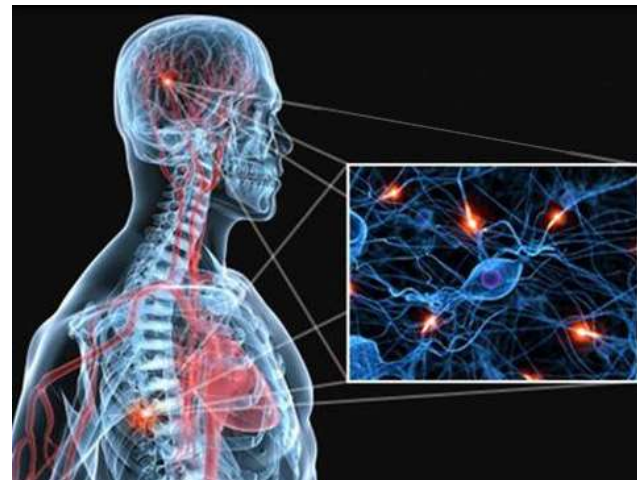
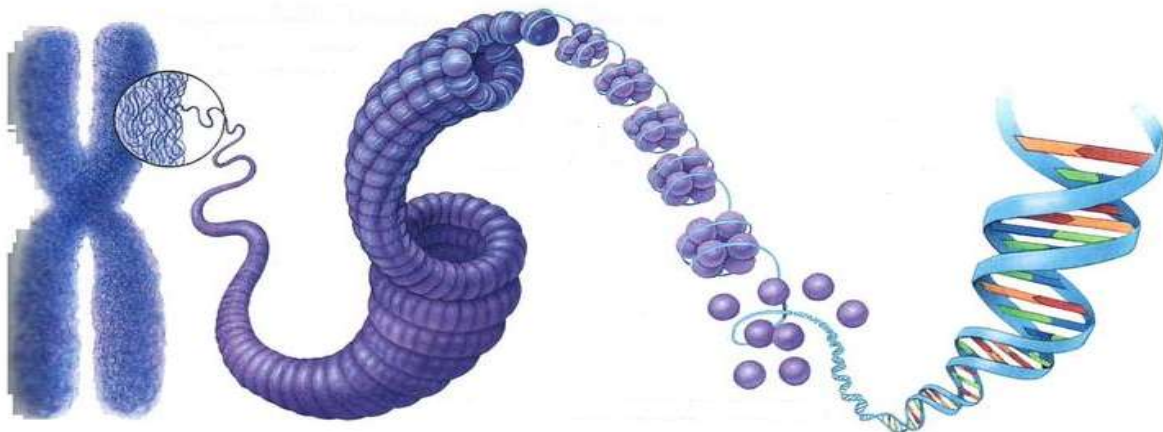
Актуальность



- Хром является высоко канцерогенным металлом и токсические процессы, развивающиеся в результате его действия на организм могут проявляться в виде ухудшения основных показателей иммунологической реактивности, включая рост злокачественных новообразований
- Существует прямая зависимость канцерогенной опасности хромовых производств от длительности контакта с хромом и степени его воздействия.
- Эпидемиологическими исследованиями установлено, что у работающих в условиях контакта с хромовыми солями отмечена повышенная смертность от раковых заболеваний легких, отмечаются изменения в иммунологических реакциях организма, снижении репаративных процессов в клетках и ингибировании ферментов.

Цель

Изучение особенностей
иммунологических и генетических
индикаторных показателей у работающих
по добыче хромовых руд.



Технологии генетического и иммунологического типирования нарушений здоровья, ассоциированных со средовыми факторами

1) Генетические исследования генома и транскриптома (сиквенс, ПЦР Real time, экспрессия генов):

Идентификация полиморфизма генов (SNP) предрасположенности к развитию иммуно- и аллергопатологии (например, **TLR4** толл-рецептор 4; **FOXP3** белок клеток супрессоров; **MMP9** ген эластазы); полиморфизм генов ферментов 1 и 2 фазы детоксикации **CYP 1A1** подсемейство генов цитохрома **p-450, GSTA4** (глутатион-трансфераза), **CPOX** копропорфириногенаксидаза, **SULT1A1** сульфотрансаминаза,

→ секвенирование участков генома - секвенатор Roche (454)



→ ПЦР в режиме реального времени - термоциклер CFX96



2) Клеточное фенотипирование и сепарация

Идентификация индикаторных показателей клеточной гибели методом проточной цитометрии: субпопуляций лимфоцитов (**CD3+**, **CD3+CD4+**, **CD3+CD8+**, **CD19+**, **CD16+CD56+**, **CD3+CD25+**, **CD3+CD95+**, **CD4+** **CD25+127-**); внутриклеточных маркеров апоптоза : **bcl-2**, **bax** **p53**; определение уровня апоптоза лимфоцитов с помощью окрашивания **Аннексином V-FITC** (Annexin) и пропидиум йодидом (Propidium Iodide)

→ цитофлуориметрия проточный цитометр FACSCalibur, BD Accuri C6



→ метод иммуномагнитной сепарации сортер autoMACS Pro



3) Аллергосорбентное тестирование

Идентификация специфических антител к металлам и органическим соединениям (специфические IgE к хрому, никелю, марганцу, формальдегиду, фталевому ангидриду, специфические IgG к бенз(а)пирену, ванадию, свинцу, стронцию, фенолу, алюминию, наноформам металлов) с использованием оригинальной каскадной технологии изготовления белково-полисахаридного иммуносорбента с конъюгированного с гаптеном

→ Аллергосорбентное тестирование и ИФА анализатор «Eix808IU».



Изучение индуцированной гаптенами и митогенами экспрессии медиаторов воспаления (лейкотриены, цитокины) - **LTE4, LTC4, LTD4, IL1-β, IL -4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, α-TNF** в плазме крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с предварительным экстрагированием

→ Система для твердофазной экстракции (Манифолд)



Материалы и методы

Наблюдение

71 человек



Режим работы подземная добыча

Возраст - $35,29 \pm 4,1$ года

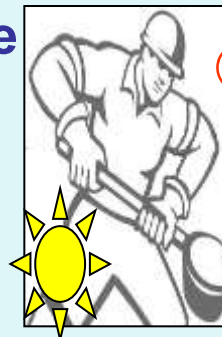
Стаж - $10,24 \pm 3,12$ года

Сопоставимы по
этническому составу

Режим работы на поверхности

Сравнение

40 человек



Возраст - $37,86 \pm 3,34$ года

Стаж - $13,82 \pm 3,19$ года

Предприятие
по
добыче
хромитовых
руд

Санитарно-гигиеническая характеристика условий труда у работников, занятых подземной добычей хромовых руд

Основными вредными производственными факторами, воздействующими на работающих при добыче хромовых руд являются:

- локальная и общая вибрация,
- шум, охлаждающий микроклимат,
- ионизирующее излучение,
- химические факторы (пыль с присутствием ультрамикроскопических и наночастиц, средне и крупнодисперсная пыль, в составе которых входят кремний диоксид кристаллический, оксиды металлов (**дихром триоксид**, диЖелезо триоксид, диАлюминий триоксид, магний оксид),
- высокая статическая и динамическая нагрузка, высокая степень психо-эмоционального напряжения.



В соответствии с ГОСТ 12.0.003-74 «Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы.

Классификация», **общая оценка условий труда работников основных групп профессий** по совокупности действующих факторов позволила определить их как вредные - **класс условий труда 3.3-3.4**

Клеточные (мембранные и внутриклеточные) индикаторные показатели

Маркеры клеточной дифференцировки

Проточная цитометрия

Фенотипы иммуноцитов: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+CD56+

Активационные мембранные маркеры: CD25+, CD95+, TNFR,

T-регуляторные лимфоциты (супрессоры) CD127-

Внутриклеточные и

транскрипционные факторы:

bax, bcl2, p53



Проточный цитометр FACSCalibur

Иммунологические индикаторные показатели

Медиаторы нейро-иммунной регуляции

VEGF – васкуло-эндотелиальный фактор роста сосудов

Серотонин – медиатор нейро-синаптической регуляции

Онкомаркеры

СА199, АФП, ПСА, КЭА – карцинальные антигены

Имуноферментный анализ



Показатели гиперчувствительности

Аллергосорбентный тест

Содержание IgE
специфического к хрому

EIх808IU (Biotek, США)

Генетические маркеры (полиморфизмы)

Полимеразная цепная реакция

иммуногенетические маркеры - ***HLA-DRA***;
гены систем детоксикации - ***CYP1A1*** (rs1048943),
метилентетрагидрофолатредуктазы (rs1801133)
MTHFR;
гены сосудистых факторов –***VEGF***;
гены иммуноассоциированных белков (в том числе
принимающих участие в апоптозе) - матриксных
протеиназ ***MMP9*** (rs17576), сиртуин ***SIRT1***,
маркеры нейро-эндокринной регуляции–рецептор
серотонина ***HTR2A*** и рецептор мелатонина
MTNR1A .

Маркеры эффекта и чувствительности воздействия факторов на здоровье работающего населения



Индикаторные показатели иммунного статуса у работников хромовых шахт

Показатель	Референтный интервал	Группа наблюдения	Группа сравнения
Абсолютный фагоцитоз, 109/дм3	0,964-2,988	2,435±0,267*	1,821±0,267
Процент фагоцитоза, %	35-60	47,886±2,898*	42,692±3,453
Фагоцитарное число, у.е.	0,8-1,2	0,905±0,086*	0,76±0,085
CD3+-лимфоциты, абс, 109/дм3	0,69-2,54	1,764±0,426*	1,185±0,21
CD3+-лимфоциты, отн., %	55-84	72,545±4,057	68,385±3,967
CD3+CD4+-лимфоциты, абс., 109/дм3	0,41-1,59	1,106±0,278*	0,724±0,163
CD3+CD4+-лимфоциты, отн., %	31-60	45,364±4,336	41,231±3,694
IgE специфический к хрому, МЕ/см3	0-1,01	0,319±0,024 *	0,237±0,032

* - разница достоверна относительно группы сравнения

Результаты сравнительного анализа ключевых показателей

клеточного иммунитета у шахтеров с различным стажем

Показатель	Норма	Стаж >5 лет (M±m)	Стаж < 5 лет (M±m)
CD16+56+-лимфоциты, абс., 10 ⁹ /дм ³	0,09-0,59	0,522±0,110**	0,218±0,038
CD16+56+-лимфоциты, отн., %	5-27	21,2±5,229**	9,182±1,212
CD3+CD95+-лимфоциты, абс., 10 ⁹ /дм ³	0,63-0,97	0,662±0,141	0,558±0,055
CD3+CD95+-лимфоциты, отн., %	25-45	24,4±3,059*	24,364±2,309
CD127_лимфоциты, абс, %	0,05-0,15	0,078±0,010*	0,094±0,014
CD127_лимфоциты, отн, %	2,8-3,2	3,216±0,69	3,90±0,36
Vαх, %	5-9	5,288±1,436	7,528±0,939
bcl-2, %	1-1,5	1,39±0,612	2,189±0,390
TNFR, %	1-1,5	1,536±0,19	1,932±0,254
СА-19-9, единиц/мл	0-35	5,067±0,316**	4,625±0,434
КЭА, нг/куб.см	0-2,9	3,7±0,178**	1,716±0,253
VEGF, пг/куб.см	100-700	153,7±22,17**	188,7±12,2
Серотонин, нг/мл	40-400	68,7±11,17**	175,7±41,7**
IgE спец. хром, МЕ/куб.см	0-0,1	0,306±0,032**	0,221±0,029

Примечание: * – разница достоверна относительно референтного интервала (p<0,05).

** – разница достоверна относительно группы сравнения (p<0,05).

Маркеры эффекта для условий производственной экспозиции хромом

- У низкостажевых обследуемых (менее 5 лет) в условиях контакта с тяжелыми металлами иммунный ответ характеризуется его активацией.
- Длительный производственный контакт (более 5 лет) рабочих с хромовыми солями приводит к нарушениям иммунологического здоровья, характеризующимся экспрессией пролиферативных белков, угнетенным апоптозом и нарастанием уровня специфической сенсибилизации к хрому.
- К индикаторным показателям, отражающим нарушения иммунологической резистентности у работников занятых на производстве по добыче хромовых руд следует отнести клеточные и внутриклеточные маркеры клеточной гибели CD127-, bcl-2, bax, TNFR, фетальные белки (CA 19-9, КЭА), а также показатель специфической сенсибилизации - IgE к хрому

Современная генетическая диагностика позволяет снизить риски потерь здоровья.

В практику внедрены современные критические технологии и методы ранней диагностики нарушений здоровья, ассоциированных с факторами риска



Особенности полиморфизма кандидатных генов у работающих на добыче хромитовых руд

	Gene	CYP1A1	HLA-DRA	HTR2A	MMP9	MTHFR	MTNR1A	SIRT1	VEGFA
	RS	1048943	3135388	7997012	17576	1801133	34532313	7069102	2010963
	Polymorphism	Ile462Val	C/T	A/G	Gln279Arg	C677T	C/T	C/G	G634C
Опыт	Норм. гомозигота	90,9	75,8	40,0	37,7	44,0	72,7	27,3	51,9
	Гетерозигота	9,1	16,1	38,2	49,4	49,3	19,5	46,8	36,4
	Вар.гомозигота	0,0	8,1	21,8	13,0	6,7	7,8	26,0	11,7
	Аллель 1	95,5	83,9	59,1	62,3	68,7	82,5	50,6	70,1
	Аллель 2	4,5	16,1	40,9	37,7	31,3	17,5	49,4	29,9
Контр	Норм. гомозигота	81,8	81,8	72,7	36,4	36,4	45,5	72,7	45,5
	Гетерозигота	18,2	18,2	27,3	54,5	46,0	54,5	27,3	54,5
	Вар.гомозигота	0,0	0,0	0,0	9,1	18,2	0,0	0,0	0,0
	Аллель 1	90,9	90,9	86,4	63,6	59,1	72,7	86,4	72,7
	Аллель 2	9,1	9,1	13,6	36,4	40,9	27,3	13,6	27,3

SNP-различия гена **HTR2A** между группами наблюдения и сравнения (**Мультипликативная** модель наследования -

тест хи-квадрат, $df = 1$)

Ген Эксперт

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Аллели	Случаи	Контроли	χ^2	p	<i>OR</i>	
	n = 71	n = 40			знач.	95% CI
Аллель <i>A</i>	0.816	0.970	14.51	0.0001	0.14	0.04 – 0.44
Аллель <i>G</i>	0.184	0.030			7.23	2.28 – 22.92

"Случаи" и «контроли» находятся в равновесии Харди-Вайнберга, поэтому данные могут быть проанализированы с применением мультипликативной модели. В нашем случае различие генотипов **HTR2A** между выборками достоверно описывается как мультипликативной, так и аддитивной моделями.

SNP-различия гена HTR2A между группами наблюдения и сравнения
 (Аддитивная модель наследования - тест Кохрана-Армитаджа для
 линейных трендов, $\chi^2 = [0,1,2]$, $df = 1$)

Ген Эксперт
 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Генотипы	Случаи	Контр оли	χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i>	
	n = 71	n = 40			знач.	95% CI
Генотип <i>A/A</i>	0.737	0.939	11.45	0.0007	0.18	0.05 – 0.67
Генотип <i>G/A</i>	0.158	0.061			2.91	0.66 – 12.82
Генотип <i>G/G</i>	0.105	0.000			28.43	1.31 – 617.71

Системы «химический агент – генотип» (SNPStats)

Ген	Генотипы	Хром (мг/см ³)			Ген	Генотипы	Хром (мг/см ³)		
		Набл	Срав	p			Набл	Срав	p
<i>HTR2A</i> A/G	A/A	0,01	0,003	0,015	<i>VEGFA</i> G634C	G/G	0,01	0,003	0,0095
	A/G	0,04	0,004			G/A	0,01	0,004	
	G/G	0,02	0,004			A/A	0,02	0,004	
<i>MTHFR</i> C677T	C/C	0,02	0,02	0,021*	<i>MTNR1A</i> C/T	C/C	0,02	0,02	0,0006
	C/T	0,01	0,001			C/T	0,01	0,001	
	T/T	0,01	0,002			T/T	0,01	0,002	
<i>MMP9</i> Gln279Arg	A/A	0,03	0,02	0,002	<i>HLA-DRA</i> C/T	C/C	0,01	0,002	0,0005 2*
	A/G	0,02	0,004			C/T	0,02	0,004	
	G/G	0,01	0,003			T/T	0,01	0,003	

Исследование взаимосвязей «ген-гаптен» на примере «ген HLA-DRA-хром в крови» в группе шахтеров, с использованием программы SNPStats

SNP: HLA_DRA
 Percentage of typed samples: 61/75 (81.33%)

Allele	Count	Proportion
C	104	0.85
T	18	0.15

частоты аллелей

Genotype	Count	Proportion	Response mean (s.e.)
C/C	47	0.77	0 (0) (n=47)
C/T	10	0.16	0 (0) (n=10)
T/T	4	0.07	0 (0) (n=4)
NA	14	---	---

частоты генотипов

	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	47	10	4	104	18	0.017

равновесие Харди-Вайнберга

Model	Genotype	n	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	47	0 (0)	0.00			
	C/T	10	0 (0)	0.00 (-0.00 - 0.00)	0.36	-550.8	-540.3
	T/T	4	0 (0)	-0.00 (-0.00 - 0.00)			
Dominant	C/C	47	0 (0)	0.00	0.38	-551.5	-543
	C/T-T/T	14	0 (0)	0.00 (-0.00 - 0.00)			
Recessive	C/C-C/T	57	0 (0)	0.00	0.59	-550.9	-542.5
	T/T	4	0 (0)	-0.00 (-0.00 - 0.00)			
Overdominant	C/C-T/T	51	0 (0)	0.00	0.17	-552.7	-544.2
	C/T	10	0 (0)	0.00 (-0.00 - 0.00)			
Log-additive	---	---	---	0.00 (-0.00 - 0.00)	0.68	-550.8	-542.4

связь с ответом

Interaction analysis with covariate group Анализ взаимодействия с ковариативной группой

	Case			Control		
	n	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	n	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)
C/C	32	0 (0)	0.00	15	0.01 (0)	0.00 (0.00 - 0.01)
C/T	9	0 (0)	0.00 (-0.00 - 0.00)	1	0.02 (---)	0.01 (0.01 - 0.02)
T/T	3	0 (0)	-0.00 (-0.00 - 0.00)	1	0.01 (---)	0.00 (-0.00 - 0.01)

Interaction p-value: 0.00052

группа внутри гена

Genotype	Case	n	Response mean (s.e.)		Difference (95% CI)
			Case	Control	
C/C	Case	32	0.00 (0.00)	0.00	0.00 (0.00 - 0.01)
	Control	15	0.01 (0.00)		
C/T	Case	9	0.00 (0.00)	0.00	0.01 (0.01 - 0.02)
	Control	1	0.02 (---)		
T/T	Case	3	0.00 (0.00)	0.00	0.00 (-0.00 - 0.01)
	Control	1	0.01 (---)		

тест на взаимодействие в тренде

Case	Response mean (s.e.)			Difference (95% CI)
	n	Case	Control	
Case	C/C	32	0.00 (0.00)	0.00
	C/T	9	0.00 (0.00)	0.00 (-0.00 - 0.00)
	T/T	3	0.00 (0.00)	-0.00 (-0.00 - 0.00)
Control	C/C	15	0.01 (0.00)	0.00
	C/T	1	0.02 (---)	0.01 (0.01 - 0.01)
	T/T	1	0.01 (---)	-0.00 (-0.01 - 0.00)

Test for interaction in the trend: 0.4

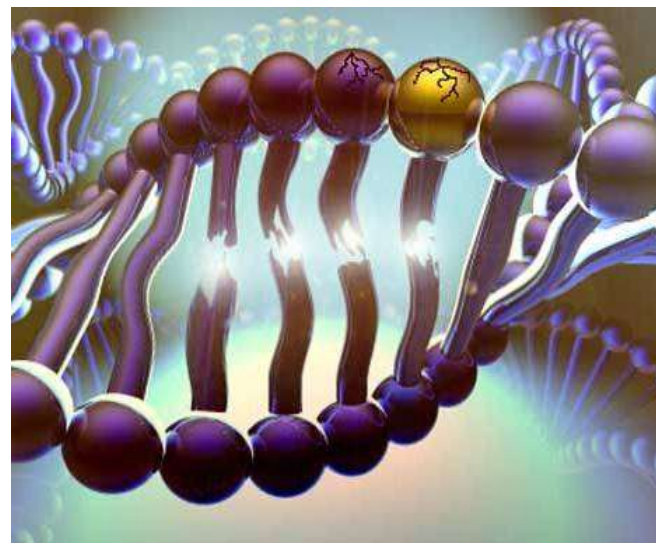
ген внутри группы

Маркеры чувствительности для условий производственной экспозиции хромом

- Проведенный сравнительный анализ генотипов кандидатных генов, ассоциированных с содержанием хрома в крови с использованием программы SNPstats позволил выявить достоверные межгрупповые различия в системах «хром - *HLA-DRA*; хром - *MMP9* (rs17576); хром - *MTNR1A*; хром- *VEGF*; хром- *MTHFR* A1298C; хром - *HTR2A*».
- Результаты анализа полиморфизма генов в условиях повышенной экспозиции хромом указывают на избыточную аллельную вариабельность генов *MMP9*, *VEGFA*, *HLADRA*, *MTHFR*, *HTR2A*, *MTNR1A*, отвечающих за особенности нейро-иммунорегуляции, онкопролиферации, состояние сердечно-сосудистой системы и детоксикации.

Резюме

Изложенные подходы к идентификации генетических вариаций и клеточных фенотипов позволили подобрать сочетание иммунологических и генетических индикаторных показателей для оценки нарушений состояния здоровья шахтеров подземной добычи хромовых руд



Спасибо за внимание!!!