

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ПОКАЗАТЕЛИ У РАБОТАЮЩИХ В  
УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО  
ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЫЛИ И  
ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШУМА**

**д.м.н. Долгих Олег Владимирович**

*ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий  
управления рисками здоровью населения», г. Пермь*

# Актуальность

- Проблема генетических иммунных нарушений здоровья является актуальной для РФ, где население работает в условиях комбинированной экспозиции биологических, физических, химических и социальных факторов, обладающих мутагенным и иммунотоксическим действием

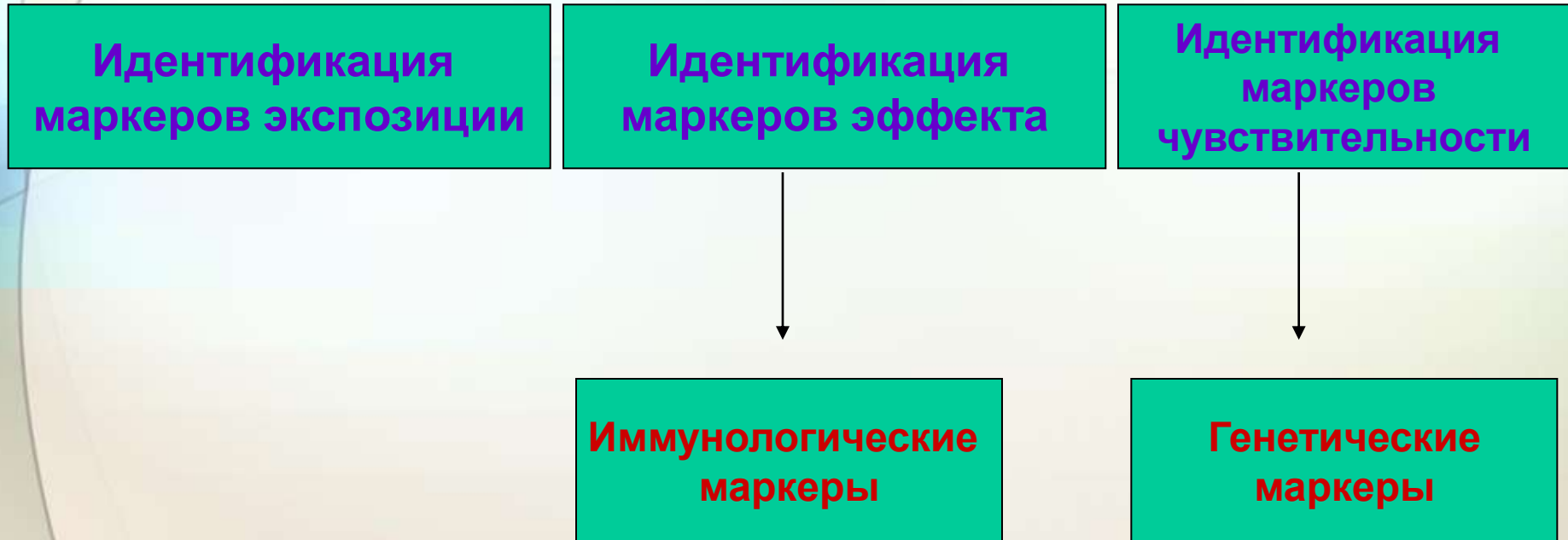


# Актуальность

- актуальным является выделение маркерных генетических показателей, которые могут быть использованы в качестве предикторов нарушений здоровья работающего населения в измененных условиях производственной среды



# Место в системе оценки риска



# Дизайн исследований

- индивидуальный уровень
- популяционный уровень

- контингент риска
- контингент сравнения
- референтный (цитируемый)  
уровень (норма)

- Стратификационные  
биологические уровни:**
- клеточный уровень
  - молекулярный уровень

# Объекты исследования

Группу наблюдения составили **66 человек**. В указанную группу включены работники с профессиями: **выбивщик, раздельщик титановой губки (ТГ) и сортировщик титановой губки (ТГ)**. В том числе **29 мужчин**, 44% от общего числа группы (выбивщики и раздельщики ТГ) и **37 женщин**, 56% от общего числа группы (все сортировщики ТГ). Средний возраст в группе наблюдения составляет  $36,9 \pm 2,4$  года. Средний стаж работников этой группы -  $8,3 \pm 1,8$  года. Группу сравнения составили инженерно-технические работники (ИТР), Численность группы - 52 человека (44,2% мужчин и 55,8% женщин), средний возраст которых составляет  $36,3 \pm 1,4$  года, средний стаж  $12,5 \pm 1,2$  года. Группы были сопоставимы по возрасту, стажу, этническому составу



# Условия труда

- При оценке риска, связанного с профессиональной деятельностью, в соответствии с отечественной методикой установлено, на работников в различной степени воздействуют несколько групп опасных и вредных производственных факторов : шум, вибрация, пыль. И по результатам проведенной на предприятии аттестации рабочих мест условия труда профессиональных групп относятся к вредным, степень вредности 3 (класс условий труда 3.3).

# Задачи, решаемые идентификацией маркеров эффекта и чувствительности

- Определение ранних нарушений в состоянии здоровья экспонированных групп и генетической предрасположенности к их развитию;
- Оценка адекватности процесса запрограммированной клеточной гибели (от иммуносупрессии до канцерогенеза и аутоагрессии)
- Изучение и оценка возможных репродуктивных нарушений с использованием патогенетических маркеров женского и мужского здоровья;
- Анализ ассоциаций аллелей генов в системах «ген-рецептор-лиганд»
- Идентификация ключевых однонуклеотидных полиморфизмов
- Проведение генодиагностики для установления риска развития конкретной патологии
- Подбор и секвенирование «виновных» локусов генома, анализ транскриптома (экспрессии генов)



# Технологии

- **генетические** - ДНК-диагностика вирусных антигенов и генного **полиморфизма** (ПЦР в режиме реального времени - термоциклер CFX96 «Биорад», США; **секвенирование** участков генома - секвенатор Roche (454) Genome Sequencer, Швейцария) и анализ **экспрессии генов**
- **клеточное фенотипирование** проточной цитометрией (проточный цитометр FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson», USA) рецепторов и транскрипционных факторов (p53, bcl2, Treg)
- **Типирование медиаторов** иммуно-нейро-эндокринной регуляции (альфа-ФНО, релаксин, серотонин, эритропоэтин) - ИФА с предварительным экстрагированием
- **измерение дисперсных параметров** (размеров частиц и функций распределения частиц по размерам) материалов в диапазонах наночастиц 10-30, 30-60, 60-100 и более 100 нм (анализатор размеров частиц Horiba LB 550 (Франция))

# Типирование маркеров эффекта и чувствительности

Исследуемые пробы крови и буккального эпителия

секвенирование



ПЦР в режиме реального времени



Сиквенс виновных генов

ДНК-диагностика  
генного  
полиморфизма

ИФА-диагностика

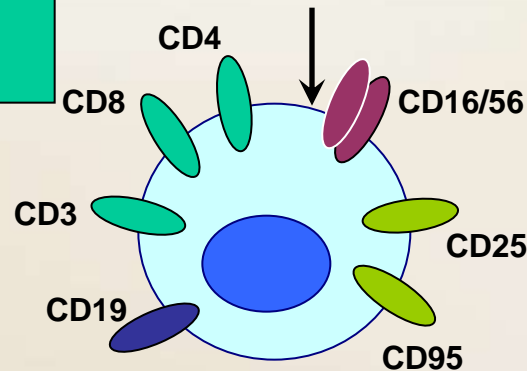


Проточная  
цитофлуориметрия



*Copmer  
AutoMACS  
Pro*

Субпопуляционный  
анализ



Спонтанная и  
индуцированная  
экспрессия гена



# Технология проточной цитометрии

- определение субпопуляций лимфоцитов (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16+CD56+, CD3+CD25+, CD3+CD95+);
- определение уровня апоптоза лимфоцитов с помощью окрашивания Аннексин V-FITC (Annexin) и пропидиум йодид (Propidium Iodide)
- определение Т-reg клеток, супрессирующих иммунный ответ.
- Определение трансформирующего фактора р53 и ФНО-альфа, регулирующих жизненный цикл клетки.
- Определение внутриклеточных маркеров апоптоза : bcl-2, bax, bad



**BD FACSCalibur**

# Технология генетических исследований с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

- Диагностика генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки (гены- подсемейство цитохрома CYP 1A1, MTHFR, GSTA4 (глутатион-трансфераза), CPOX, SULT1A1, SOD2, ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), ESR1, TERT, DRD2, SIRT1, TLR4 (толл-рецептор 4) PPAR FAS FOXP3 VEGF, APO-E, NO-синтаза, MMP, ACE, TNFальфа, p53, BRCA1, BRCA2 )



# Принципы верификации генетического полиморфизма (маркеры чувствительности)

- Идентификация мутаций генов ферментов 1 и 2 фазы детоксикации (метаболизм и конъюгация) органических и металлоорганических соединений (лекарственные вещества, техногенные химические факторы) - подсемейство генов цитохрома, метилентетрагидрофосфатредуктаза, глутатион-трансфераза, копропорфириноксидаза, сульфтрансаминаза, супероксиддисмутаза 2, цинк-металлопептидаза
- Полиморфизм генов белков, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях ген эластазы (легкие), ген эндотелиального фактора роста (эндотелий сосудов), ESR1-эстроген (женская репродуктивная сфера), DRD2-дофаминовый рецептор (нервная система), NO-синтаза (эндотелий сосудов) и обменных процессах - TERT (теломераза), SIRT1 (сиртуин), семейство генов PRAR (энергетический обмен), APO-E-аполипопротеин (жировой обмен), ACE-ген ангиотензинконвертирующего фермента (общие обменные процессы), GCCR-глюкокортикоидный рецептор (углеводный обмен).

# Принципы верификации генетического полиморфизма (маркеры чувствительности)

- Генотипирование предрасположенности к онкопролиферативным состояниям BRCA (онкология женской репродуктивной сферы), MMP-металлопротеиназа (онкология легких), TERT-теломераза (общая онкология), p53 (транскрипционный фактор, наличие которого препятствует развитию онкологического процесса)
- Определение иммуногенетических маркеров TLR4 (толл-рецептор 4) (иммунный «сигнальный рецептор» опасности), FAS (цитокиновый рецептор запускающий апоптоз), FOXP3 (белок клеток супрессоров, выполняющий функцию торможения в иммунной системе), TNFальфа (цитокин), p53 (транскрипционный белок -внутриклеточный фактор апоптоза), HLA DR (фактор гистосовместимости)

# Методическое обеспечение

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ** Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов МР 4.2.0075- 13 от 20.08.2013

Патент РФ на изобретение №2497120 от 27 октября 2013 года **Способ прогнозирования популяционных нарушений биотрансформации чужеродных веществ, обусловленных воздействием техногенных химических факторов среды обитания**

# Алгоритм ДНК-детекции

- У детей забирали образцы ДНК со слизистой оболочки щеки
- Геномную ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции
- Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику ПЦР в режиме реального времени
- Амплификацию и детекцию осуществляли с помощью термоциклера CFX96, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе
- Обработку полученных результатов проводили, используя аллельную дискриминацию
- Использованные методы позволяли различить гомозиготную замену от гетерозиготы и нормальной гомозиготы
- Статобработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт», служащей для расчета статистических параметров для исследований "случай-контроль", использующих SNP.





# Цитохром Р-450 (СУР)

- 1 фаза детоксикации обеспечивается, главным образом, суперсемейством цитохрома Р-450 (СУР). Их основные функции заключаются в присоединении к молекуле ксенобиотика гидрофильных групп. Часто ферменты 1-й фазы осуществляют в клетке метаболическую активацию ксенобиотиков, что сопряжено со значительной опасностью для клетки и вероятностью образования эндогенных мутагенов

# МТНFR

(метилентетрагидрофолатредуктаза)

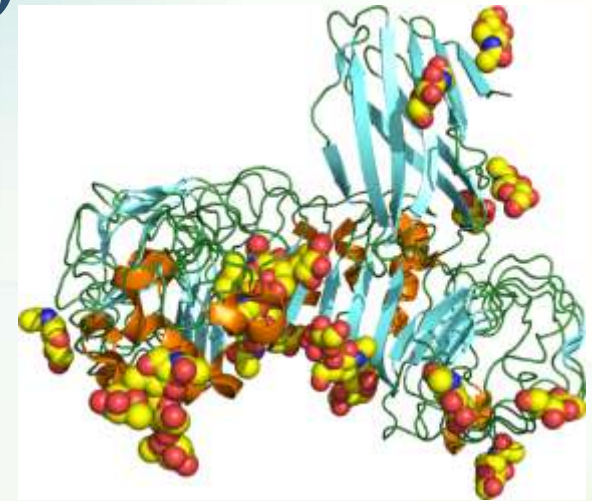
- Исследование полиморфизма гена МТНFR позволяет определить риск развития **онкологических** (рак молочной железы, яичников) и **сердечно-сосудистых заболеваний** (венозных и артериальных тромбозов, ишемии, инфарктов), **невынашиваемости беременности**, гестоза, нарушения в обмене фолиевой кислоты и гомоцистеина

# ММР Матриксная металлопротеиназа

Семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз. Играют роль в ремоделировании тканей, **ангиогенезе**, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, **апоптозе**, сдерживании роста опухолей. Задействованы в расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптозных лигандов, таких как **FAS**, а также в активации и деактивации *цитокинов*. Установлено, что экспрессия ММР-1 играет важную роль в процессе метастазирования при опухолях легких и молочной железы.

# Глутатион-S-трансферазы (GST)

- Контролируют конъюгацию различных электрофильных соединений, включая канцерогены и цитотоксические лекарства, с восстановленным глутатионом. Эти ферменты способны к прямому связыванию с такими гидрофобными соединениями, как гем, билирубин, стероидные гормоны, что позволяет им участвовать во внутриклеточном накоплении и обеспечивать транспорт биологических веществ с ограниченной водорастворимостью. Благодаря каталитической активности и способности к связыванию они участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций.



# Ген фактора некроза опухоли (ФНО-альфа)

- Продукт гена TNF альфа - фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа, кахектин) - относится к цитокиновой системе и представляет собой клеточный медиатор макрофагов и лимфоцитов, играет важную роль в регуляции процессов дифференцировки, роста и метаболизма клеток, является медиатором воспалительных процессов, инициирует образование свободных радикалов и может способствовать развитию оксидативного стресса.
- Роль TNF-альфа в развитии оксидативного стресса заключается в активации индуцибельной NO-синтетазы (NOS) - энзима, ответственного за синтез оксида азота, играющего важную роль в образовании и трансформации свободных радикалов

# Результаты. Натурные исследования

- Уровень шума на рабочем месте выбивщика достигает 88 дБА, что на 8 дБА превышает предельно допустимый уровень (ПДУ 80 дБА), и соответствует 2 степени вредности третьего класса опасности (3.2); уровень шума на рабочем месте разделщика ТГ достигает 94 дБА, что на 14 дБА превышает предельно допустимый уровень (ПДУ 80 дБА), и соответствует 2 степени вредности третьего класса опасности (3.2); уровень шума на рабочем месте сортировщика ТГ достигает 86 дБА, что на 6 дБА превышает предельно допустимый уровень (ПДУ 80 дБА), и соответствует 2 степени вредности третьего класса опасности (3.2).
- Показатели эквивалентного скорректированного уровня вибрации локальной у Выбивщика при ПДУ  $2 \text{ м/с}^2$  составляет  $4,72 \text{ м/с}^2$ , что соответствует вредным условиям труда 3 степени вредности (3.3)

# Результаты

- Результаты исследования наночастиц пыли (диапазон 0 - 30 нм) в крови работников группы наблюдения (выбивщики, сортировщики) показали их высокое содержание (в среднем 61%, группа сравнения - 48%). Возможным хроническим эффектом пылевых частиц является повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний.

# Маркеры эффекта (клеточный профиль)

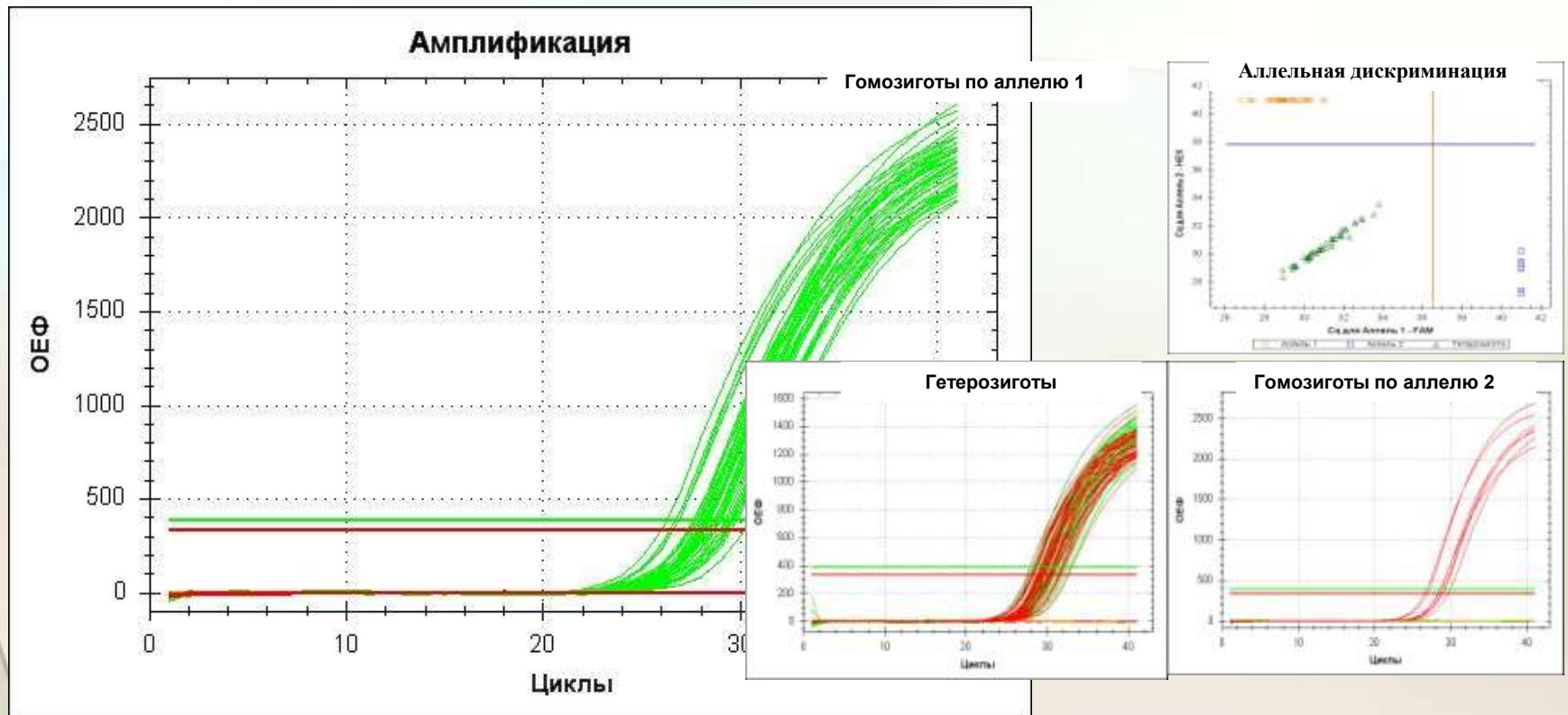
Показатели	Группа сравнения (n=20), $M \pm m$	Основная группа (n=20), $M \pm m$
CD3 <sup>+</sup> , %	74,06 ± 3,2	70,2±1,86
CD4 <sup>+</sup> , %	42,87 ± 3,92	<b>36,85±1,95*</b>
CD19 <sup>+</sup> , %	9,37 ± 1,60	9,7±0,77
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %	12,75 ± 2,64	10,75±0,81
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	7,57±0,8	7,1±0,58
CD95 <sup>+</sup> , %	29,38±2,80	<b>18,0±1,22*</b>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 127 <sup>-</sup> , %	1,51±0,35	<b>2,19±0,27*</b>
Bax,%	7,12±0,85	<b>3,78±0,25*</b>
bcl2, %	0,83±0,14	<b>0,16±0,022*</b>
p53	3,42±0,29	<b>1,21±0,14*</b>
TNFR	3,31±0,27	<b>0,97±0,18 *</b>
Annexin V-FITC <sup>+</sup> PI <sup>-</sup> , %	0,95±0,10	<b>1,53±0,09*</b>
Annexin V-FITC <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> , %	14,56±1,42	<b>9,59±0,65*</b>



# Маркеры эффекта (белковый профиль)

Параметр	Норма	Значения		
		Группа наблюдения (муж)	Группа наблюдения (жен)	Группа сравнения
ФНО, пг/мл	0-6	1,1±0,3 *	<b>1,3±0,2 *</b>	0,79±0,4
Гомоцистеин, мкмоль/дмЗ	4,6-12,44	11,589±1,05	<b>13,15±1,15 *</b>	9,594±0,92
Серотонин, нг/смЗ	80-450	187,2±42,1	<b>169,3±16,1*</b>	196,2±27,8
Релаксин, пг/смЗ	80-180	-	<b>12,1±6,7*</b>	29,4±5,2
Эритропоэтин, мМЕ/смЗ	8-30	<b>5,0±1,1 *</b>	7,4±2,1 *	22,9±6,6

# Анализ полиморфизма генов у работающих в условиях комбинированной экспозиции (шум, пыль)



Одновременное воздействие комплекса физических (шум) и химических (пыль) факторов производственной среды реализует полиморфность генов апоптоза и сосудистых нарушений

# Генетическое типирование (N=50)

SNP	Аллель/ генотип	Группа наблюдения		Группа сравнения
		Женщины	мужчины	
MMP	GG	36	44	42
	GC	<b>44</b>	32	42
	CC	20	24	16
	G	58	60	63
	C	<b>42</b>	40	37
TNF	GG	61	73	100
	GA	<b>22</b>	9	0
	AA	17	18	0
	G	72	77	100
	A	<b>28*</b> (1,32±0,26)	<b>23*</b> (1,12±0,32)	0(0,73±0,43)

# Генетическое типирование (N=50)

SNP	Аллель/ генотип	Группа наблюдения		Группа сравнения
		Женщины	мужчины	
CYP1A1	GG	92	84	100
	AG	8	<b>16</b>	0
	AA	0	0	0
	G	96	92	100
	A	4*	<b>8*</b>	0
FAS	GG	56	50	67
	GA	40	<b>46</b>	33
	AA	4	4	0
	G	76	73	83
	A	24	<b>27*</b>	17

# Генетическое типирование (N=50)

SNP	Аллель/ генотип	Группа наблюдения		Группа сравнения
		Женщины	мужчины	
ZMPSTE	ТТ	72	92	92
	ТС	<b>24</b>	8	0
	СС	<b>4</b>	0	8
	Т	84	96	92
	С	<b>16*</b>	4	8
ANKK1	СС	64	76	92
	СТ	<b>28</b>	20	0
	ТТ	<b>8</b>	4	8
	С	78	86	92
	Т	<b>22*</b>	14	8

# Генетическое типирование (N=50)

SNP	Аллель/ генотип	Группа наблюдения		Группа сравнения
		Женщины	мужчины	
HTR2A	AA	29	5	56
	AG	29	23	22
	GG	42	<b>72</b>	22
	A	44	16	67
	G	56	<b>84*</b>	33
MTHFR	GG	46	50	67
	GA	<b>50</b>	38	33
	AA	4	<b>12</b>	0
	G	71	69	83
	A	<b>29*</b>	<b>31*</b>	17

# Особенности распространённости вариантного аллеля

Группа наблюдения  
(мужчины)

Ген цитохрома  
CYP1A1,  
Ген копропорфириногенаксидазы  
CPOX,  
Ген рецептора запуска  
процедуры апоптоза  
FAS,  
Ген супероксиддисмутазы  
SOD2,  
Ген сульфотрансминазы  
SULT1A1,  
Ген рецептора серотонина  
HTR2A,  
метилентетрагидрофолатредуктазы  
MTHFR,  
Ген фактора некроза опухоли  
TNF,  
Ген аполипопротеина E  
ApoE,

Группа наблюдения  
(женщины)

Ген металлопротеиназы  
MMP,  
Ген толл-подобного рецептора  
TLR4,  
Ген цинк-металлопептидаза  
ZMPSTE,  
Ген рецептора дофамина  
ANKK1  
Ген серотонина  
HTR2A,  
Ген фактора некроза опухоли  
TNF,  
Ген глутатион-трансферазы  
GSTA4,  
метилентетрагидрофолатредуктазы  
MTHFR



# Критические системы по критерию полиморфности вариантных аллелей

Группа наблюдения  
(мужчины)

Группа наблюдения  
(женщины)

детоксикация  
(Гены CYP1A1,  
SULT1A1, CPOX)

оксигенация  
(Ген SOD2)

апоптоз  
(Ген FAS),

состояние эндотелия  
(Гены MTHFR, ApoE)

Смешанный вариант генотипа

Иммунорегуляция  
(TLR4 TNF)

Нервная регуляция  
(ANKK1, HTR2A)

Репродукция  
(ZMPSTE, GSTA4, MTHFR)

состояние эндотелия  
(Гены MTHFR, MMP)

Преимущественно  
етерозиготный вариант генотипа





SNP-различия гена TNF-альфа между группами наблюдения и сравнения (Мультипликативная модель наследования - тест хи-квадрат,  $df = 1$ )

Аллели	Случаи	Контроли	$\chi^2$	$p$	OR	
	n = 19	n = 99			знач.	95% CI
Аллель G	0.816	0.970	14.51	0.0001	0.14	0.04 – 0.44
Аллель A	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 TNF-альфа между выборками достоверно описывается как мультипликативной, так и аддитивной моделями.

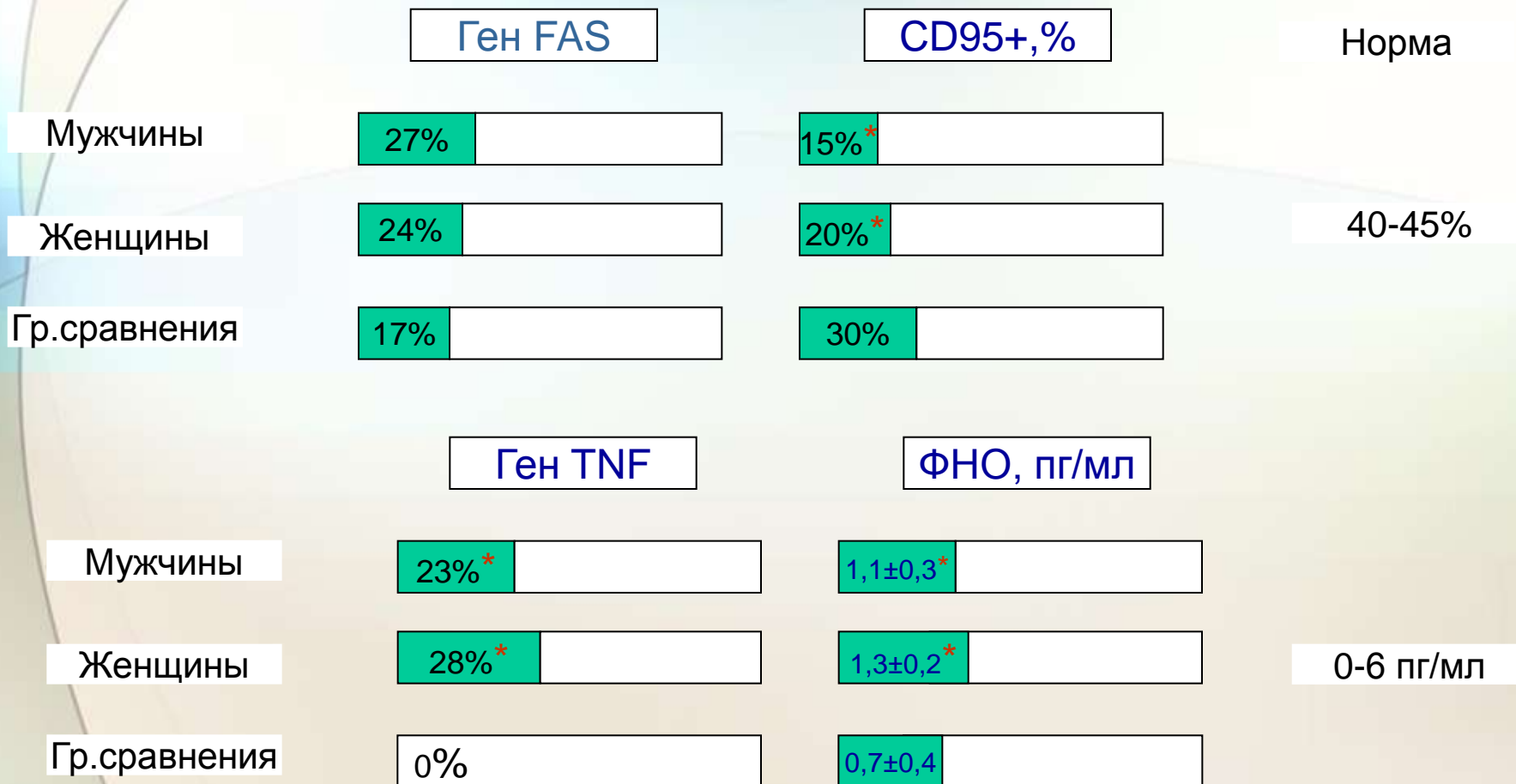
SNP-различия гена TNF-альфа между группами наблюдения и сравнения  
 (Аддитивная модель наследования - тест Кохрана-Армитаджа для  
 линейных трендов,  $\chi^2 = [0,1,2]$ ,  $df = 1$ )

Генотипы	Случаи	Контроли	$\chi^2$	<i>p</i>	OR	
	n = 19	n = 99			знач.	95% CI
Генотип G/G	0.737	0.939	11.45	0.0007	0.18	0.05 – 0.67
Генотип G/A	0.158	0.061			2.91	0.66 – 12.82
Генотип A/A	0.105	0.000			28.43	1.31 – 617.71

# Анализ причинно-следственных связей

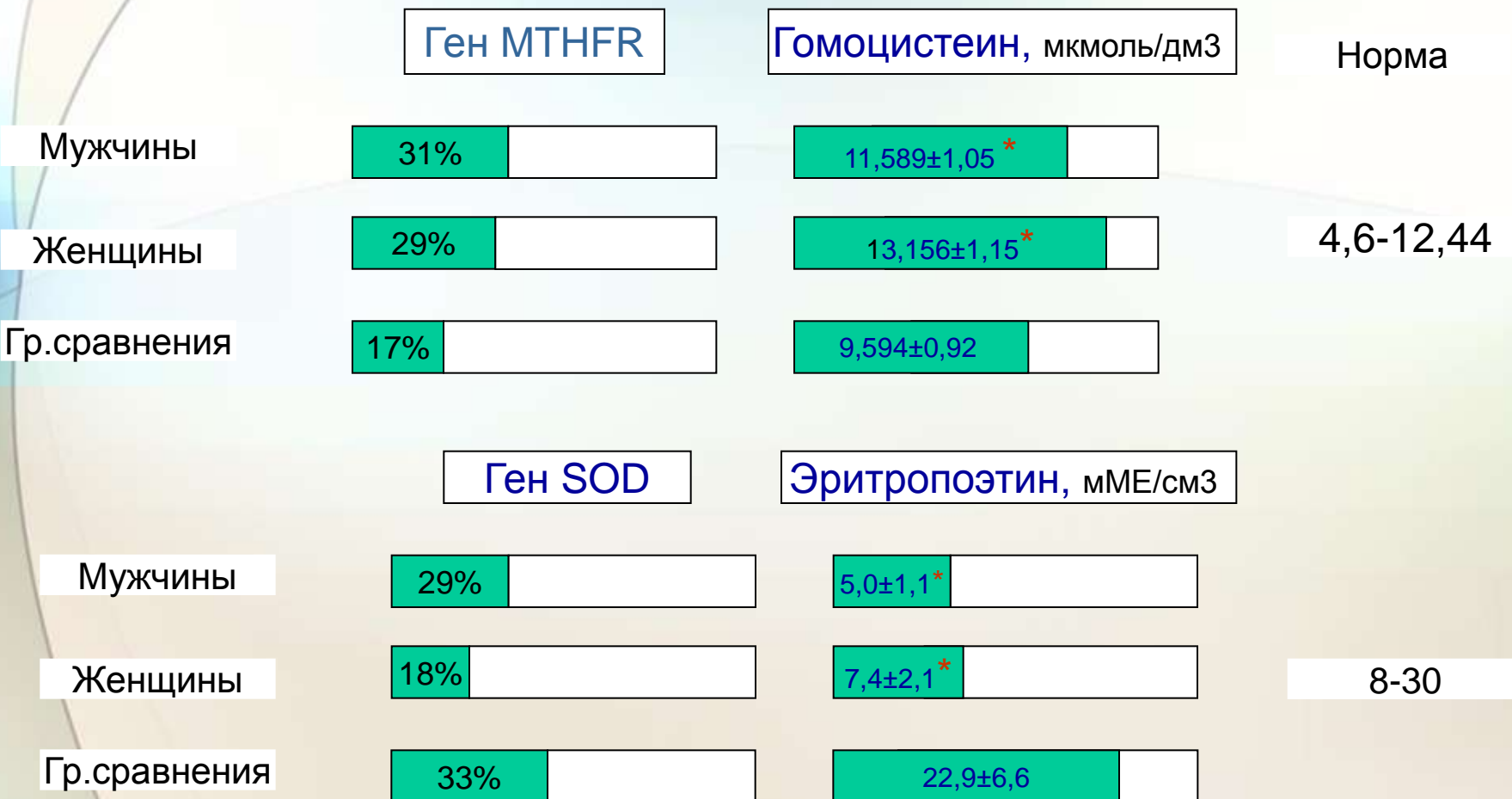
- У работников, подвергающихся воздействию вредных производственных факторов установлены показатели характеризующие наличие кардиориска: статистически достоверные причинно-следственные связи с условиями труда повышенного уровня гомоцистеина ( $RR = 21,27$  95%  $CI = 5,98-75,63$ ; этиологическая доля  $EF = 95,30 \%$ )

# Соотношение маркеров эффекта и чувствительности по распространенности мутантного аллеля (ген-рецептор-лиганд)



\* - достоверная разница с гр.сравнения

# Соотношение маркеров эффекта и чувствительности по распространенности мутантного аллеля (ген-рецептор-лиганд)



\* - достоверная разница с гр.сравнения

# Соотношение маркеров эффекта и чувствительности по распространенности мутантного аллеля (ген-рецептор-лиганд)

	Ген ZMPSTE	Релаксин, пг/см3	Норма
Мужчины	4%	-	
Женщины	16% *	12,1±6,7 *	80-180
Гр.сравнения	8%	29,4±5,2	
	Ген HTR2A	Серотонин, нг/см3	
Мужчины	84% *	187,2±42,1	
Женщины	56% (гетеро)	169,3±16,1 *	80-450
Гр.сравнения	33%	196,2±27,8	

\* - достоверная разница с гр.сравнения

# Технология и результаты секвенирования генома человека

Проведены исследования по расшифровке участка генома человека.

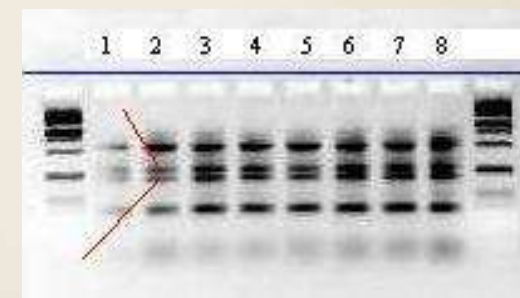
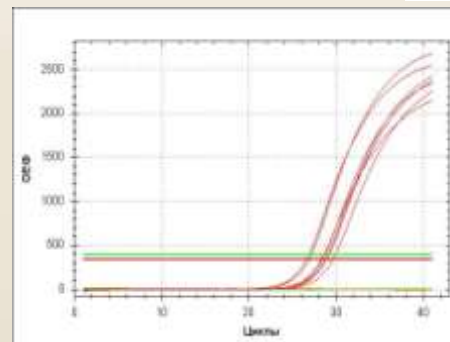
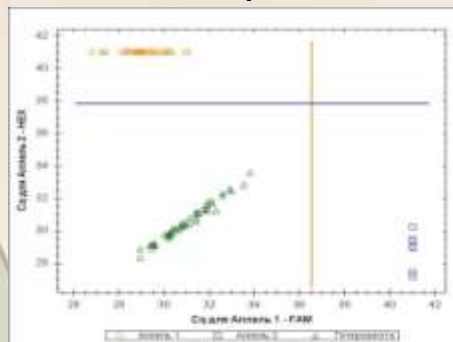
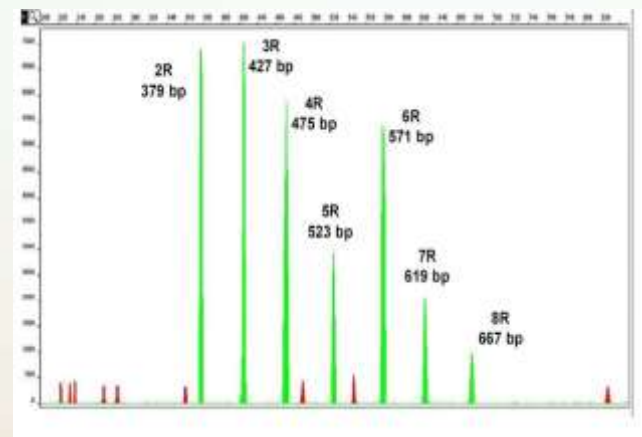
Идентифицированы распределения аллельных вариантов по тандемным генетическим маркерам гена дофамина (5 экзон), которые характеризуются высоким уровнем полиморфизма и гетерозиготности.



Идентифицирован полиморфизм триплетных повторов микро- и минисателлитных локусов.

Выявлены тандемные повторы встречающиеся в геноме с частотой 5, 8 и 3 раза.

Полученные результаты секвенса расширяют возможности изучения однонуклеотидных полиморфизмов и позволяют оценить генетическое разнообразие в различных условиях факторных комбинаций



# Преимущественные проявления иммунной и генетической дезадаптации, сопряженной с комбинированной факторной нагрузкой

- измененная генетика, ассоциированная с распространенностью минорных аллелей генов риска развития патологии ССС и репродуктивных нарушений, состояния иммунной и нервной регуляции, детоксикации
- снижение кластеров дифференцировки CD25, CD95,
- дисбаланс мембранных и внутриклеточных транскрипционных факторов апоптоза (ФНО-альфа, bcl-2, bax, p53, CD127-(Т-рег), угнетение экспрессии лимфоцитов в аннексиновом тесте)
- нарушения состояния сосудистой стенки и активации атеросклеротического процесса, а также вегетативной регуляции ее тонуса преимущественно у женщин (повышение уровня гомоцистеина, снижение содержания релаксина и серотонина)



# Резюме

- Белки иммунной регуляции (витальный рецептор, фактор некроза опухоли альфа, гомоцистеин) и Кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров эффекта и чувствительности при оценке риска здоровью анализируемых комбинаций вредных производственных факторов.



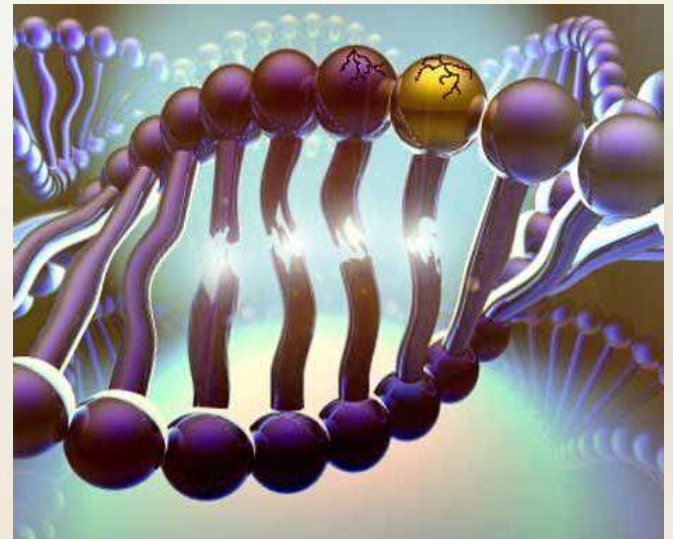
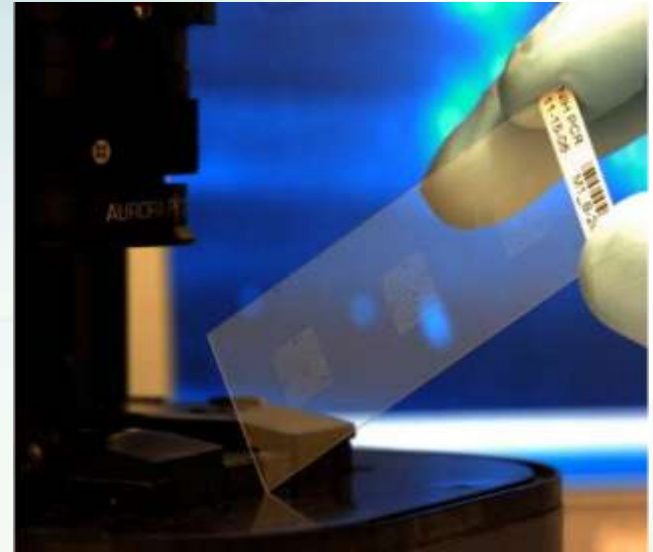
# Резюме

- Дополнительно для женской выборки рекомендуется диагностическая комбинация - «серотонин-ген серотонина», «релаксин-ген цинкметаллопептидазы», для мужской - «эритропоэтин-ген супероксиддисмутазы»



# Резюме

Изложенные подходы и принципы идентификации проявлений генетической и иммунной дезадаптации позволяют подобрать оптимальное сочетание маркеров эффекта и чувствительности для доказательства вреда здоровью для конкретных условий экспозиции производственных факторов



**Благодарю за внимание!!!**

