

**Особенности полиморфизма генов детоксикации
и иммунорегуляции у работающих и детского
населения в условиях экспозиции
химическими факторами**

Кривцов Александр Владимирович

**Зав. лаб. иммуногенетики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических
технологий управления рисками здоровью населения»**

17 мая 2018
Пермь

Актуальность работы:

Выявление структуры генов, кодирующих все белковые молекулы человека, а также внедрение в рутинную лабораторную практику новых диагностических технологий тестирования различных генных полиморфизмов (варианты одного и того же гена в популяции) позволяет предсказывать риски развития производственно обусловленных заболеваний в условиях влияния вредных производственных факторов и их комбинаций, особенно у детского населения, проживающего вблизи предприятий. В частности, генетическое тестирование позволяет выяснить, есть ли нарушение процессов апоптоза, работы систем детоксикации, являющихся мишенью ряда вредных факторов среды.

Развитие исследований и методической базы в этом направлении необходимо для профилактического обеспечения путей защиты и стабилизации генома человека в условиях возрастающего загрязнения среды его обитания.

История

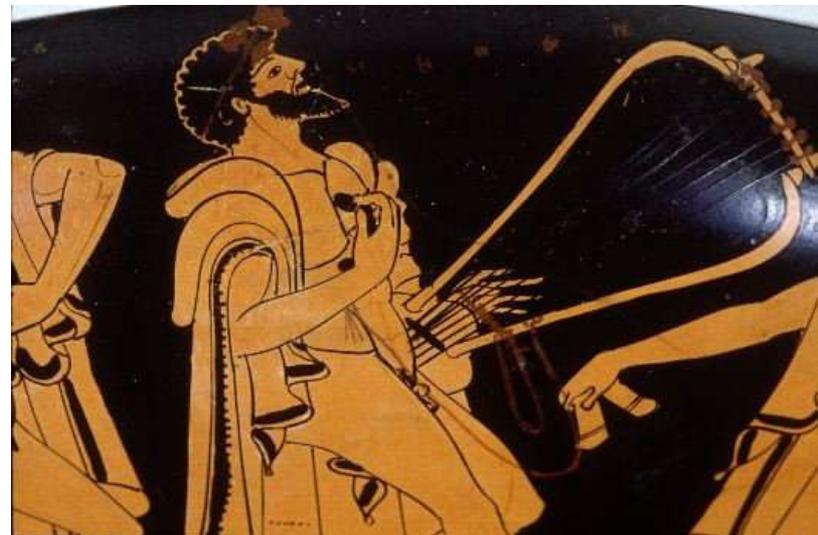
Целую ночь распевая с кифарой, убил всех соседей

Пеньем Симил — кифарист. Жив лишь один

Ориген: Он от рождения глух. Так природа, лишив его слуха,

В вознагражденье дала более долгую жизнь.

(Лукиллий)



Приоритетные направления выявления действующих факторов внешней среды на здоровье работающих

Цель – оценить особенности иммунного и генетического статуса работников химического производства и детей в условиях комбинированного воздействия вредных факторов (соединения алюминия) .



оценить уровень воздействия гаптена;



исследовать иммунологические показатели, характеризующие воздействие гаптена;



определить полиморфизм генов детоксикации;



корреляционный анализ между уровнем контаминантной нагрузки и иммунологическими показателями, характеризующ. возд. гаптена;

Объекты, материалы и методы

Выполнено иммунологическое и генетическое диагностическое обследование детского населения в возрасте от 3 до 7 лет (48 детей, 24 мальчика и 24 девочки, средний возраст $5,54 \pm 0,103$ лет), постоянно проживающего в зоне промышленного воздействия ОАО «**Русал Братский алюминиевый завод**» (г. Братск Иркутской области), занимающегося производством первичного алюминия, Группу сравнения составили 21 ребенок (9 мальчиков и 12 девочек, средний возраст $5,57 \pm 0,177$ лет) из «условно чистого» района, пос. Листвянка Иркутской области.

Исследования биологических сред включало определение **массовых концентраций алюминия** в биосредах детей проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

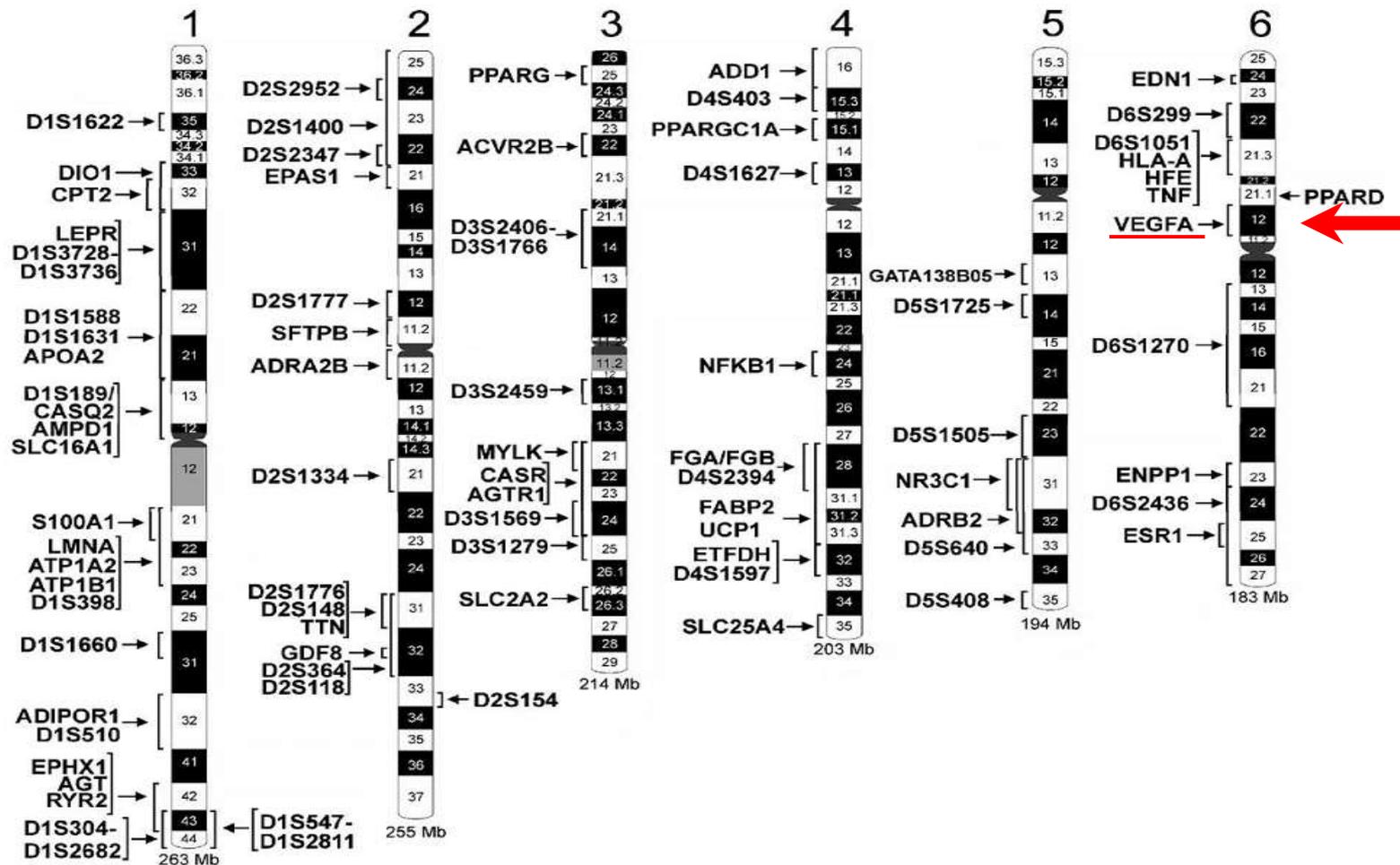
Содержание VEGF и GAD1, ИЛ17 определяли методом иммуноферментного анализа, специфические антитела к нитрозаминам – аллергосорбентным тестированием с ферментной меткой.

Изучение маркеров клеточной дифференцировки проводили методом проточной цитометрии - определение активационного маркера лимфоцитов (CD25+) и проапоптотического фактора bax на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson».

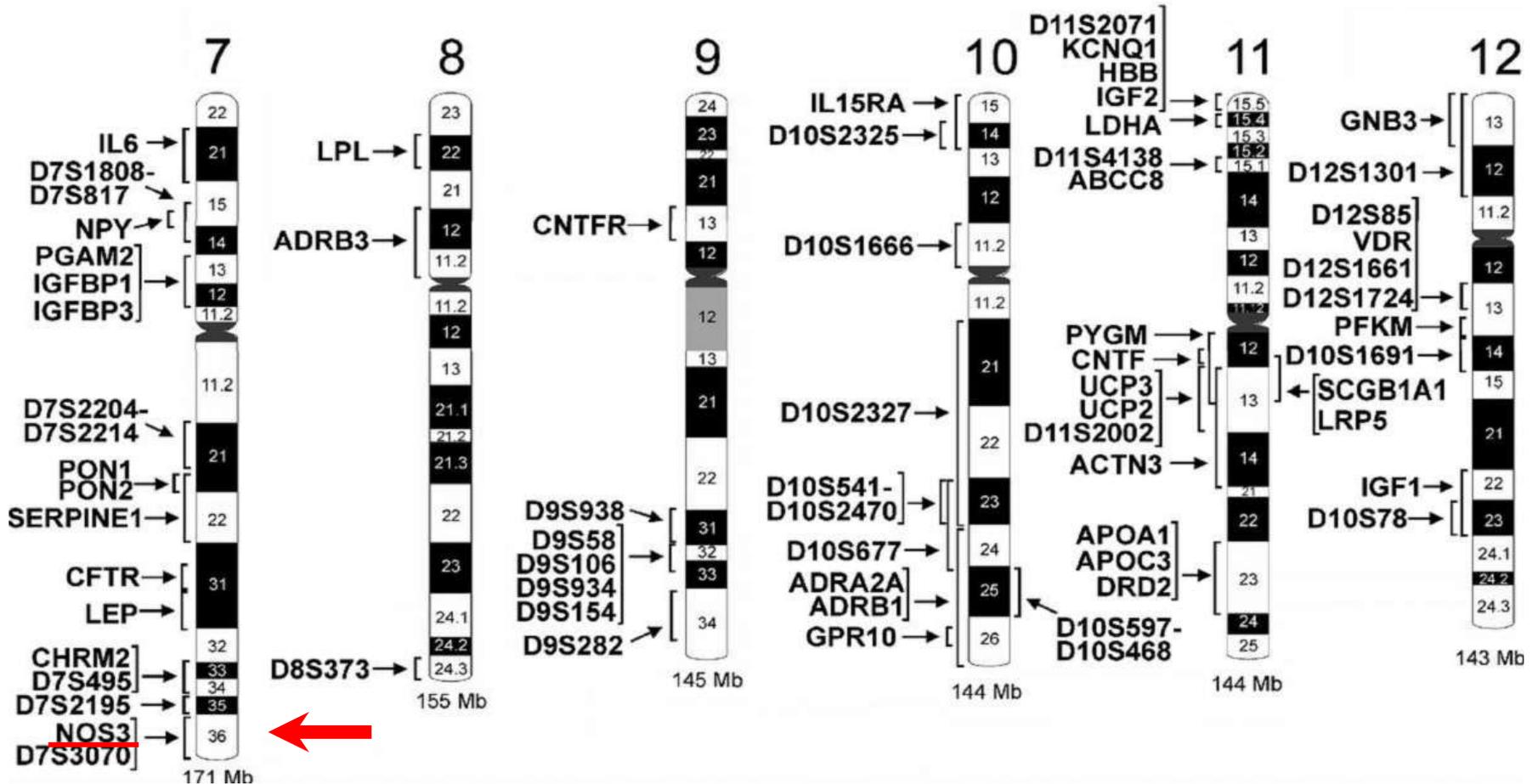
При статистическом анализе полученных данных использовали метод вариационной статистики с расчетом средней арифметической и её стандартной ошибки и t-критерия Стьюдента, оценку зависимостей между признаками проводили методом корреляционно-регрессионного анализа с расчетом критерия Фишера и коэффициента детерминации (R^2). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Материал для генетического исследования получали с помощью мазков со слизистой оболочки ротоглотки, и выделяли ДНК разрушением клеток и дальнейшей сорбцией на сорбент. Для определения генотипов использовали полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени и метод аллельной дискриминации. Различия между вариантами генотипов устанавливали по особенностям протекания реакции амплификации соответствующих праймеров с флюоресцентными метками. Изучали полиморфизмы следующих патогномоничных генов – Проведено изучение полиморфизма 24 генов: *гены*- подсемейства цитохрома **CYP1A1**, **CYP1A1_3**, CYP17, ANKK, MTHFR, CPOX, SULT1A1, ESR1, SIRT1, система генов пероксисом PPAR, VEGF, **APO-E**, MMP, p53, TP53_2, BRCA1, BRCA2, NR3C1, HTR2A, PER, **eNOS**, IL17F фактора некроза опухоли **TNF**, рецептора запуска апоптоза FAS и транскрипционного фактора p53 (TP53).

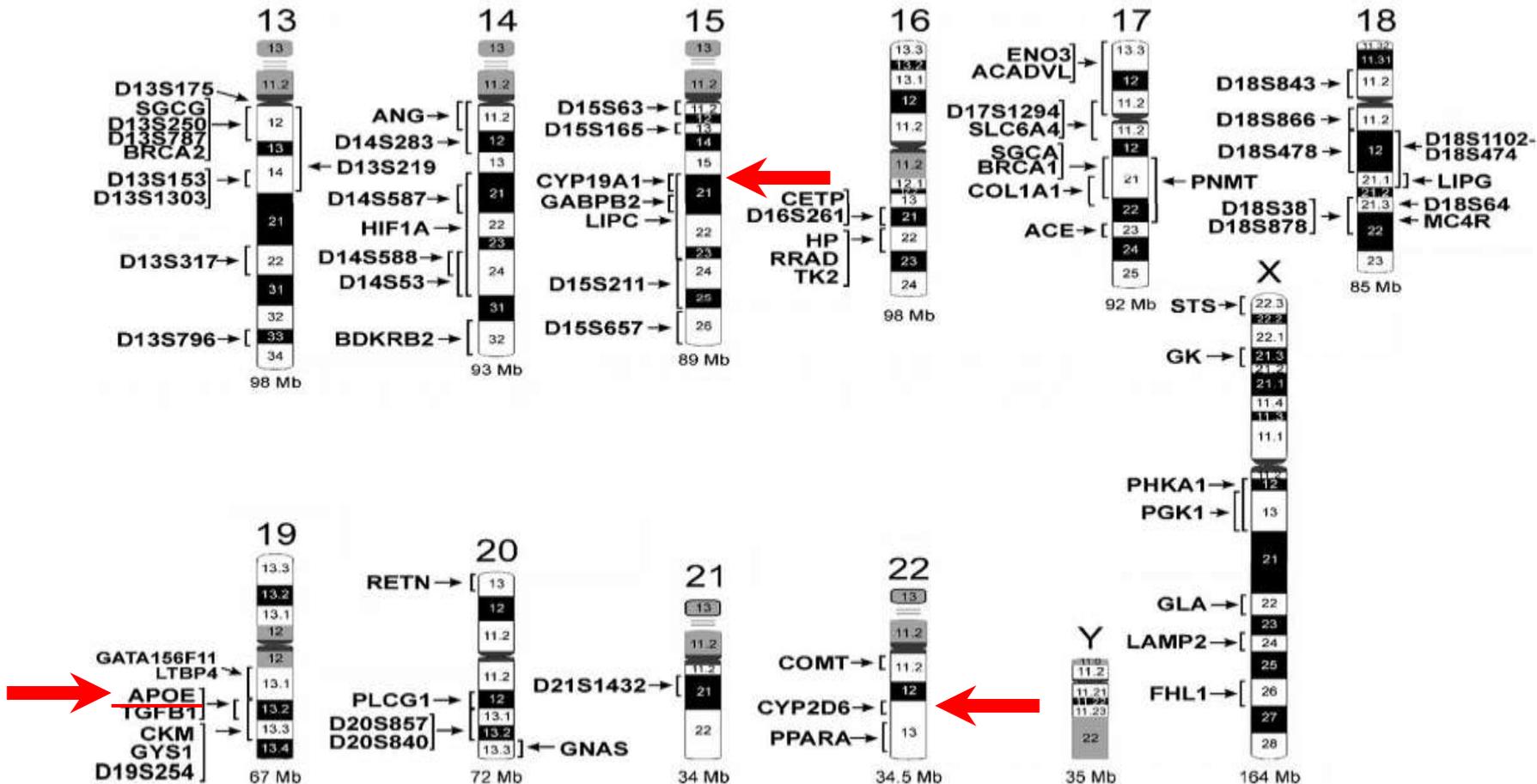
Гены, отвечающие за детоксикацию и иммунный ответ



Гены, отвечающие за детоксикацию и иммунный ответ



Гены, отвечающие за иммунный ответ и детоксикацию



Итого: около 250 генов, включая гены на аутосомах и на X-хромосоме, а также митохондриальные гены.

Характеристика некоторых генов

Ген	Хромосомная локализация	Тип полиморфизма	Биохимическая и физиологическая роли	Ассоциации с заболеваниями
ACE	17q23	вставка/делеция Alu-повтора	Влияние на тонус сосудов поперечнополосатой мускулатуры	СД, ИБС, ГМЛЖ
APOE	19q13.2	ПДРФ	Участие в транспорте липидов	Болезнь Альцгеймера, гломерулопатии, макулодистрофии
HIF1A	14q23.2	SNP	Энергетический метаболизм	Онкологические заболевания
PPAR γ C1A	4p15.1	SNP	Контроль окислительного фосфорилирования	ГМЛЖ, ожирение, СД, АГ,
PPAR α	2p25	ПДРФ	Регуляция липидного и углеводного обменов	СД, ИБС, ожирение, атеросклероз, ГМЛЖ
PPAR δ	6p21.2	SNP	Передача сигнала в клетке, регуляция липидного обмена, термогенез	Ожирение, ИБС, атеросклероз, ГМЛЖ
PPAR γ	3p25	SNP	Передача сигнала в клетке, регуляция липидного обмена	Ожирение, ИБС, ГМЛЖ, АГ
VEGFA	6p12	SNP	Формирование сосудистой сети	СД, болезнь Альцгеймера
NOS3	7q36	SNP	Регуляция сосудистого тонуса гладкой мускулатуры	Эндотелиальная дисфункция при воспалении, АГ, ИБС, СД

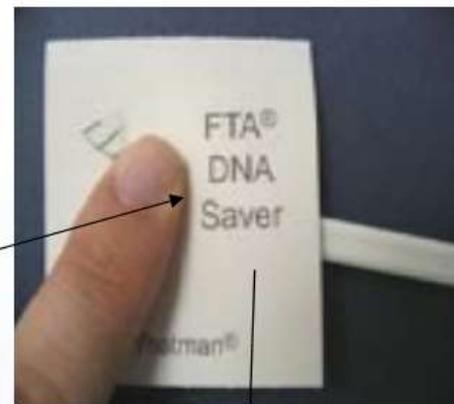
Забор образца ДНК



1



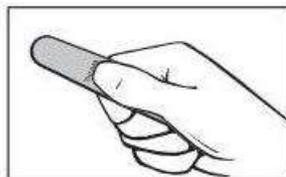
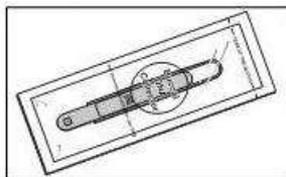
2



3

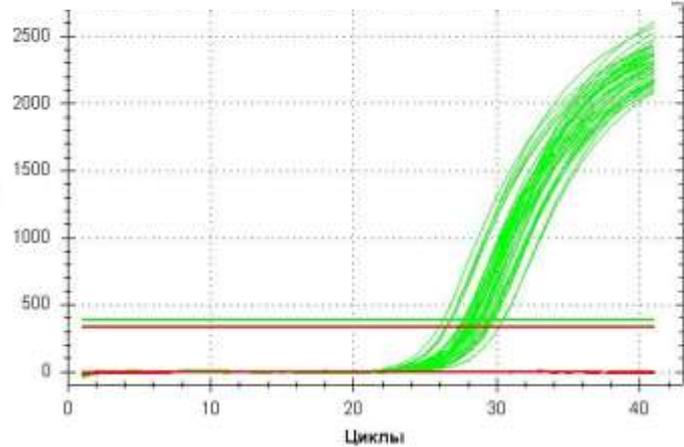


Просто, как раз, два, три - Так собирается достаточно ДНК для хранения и производства десятков тестов панелей из одного образца ДНК заказчика. Образец ДНК заказчика хранится в течение 18 месяцев, что позволяет клиентам приобрести дополнительные тесты

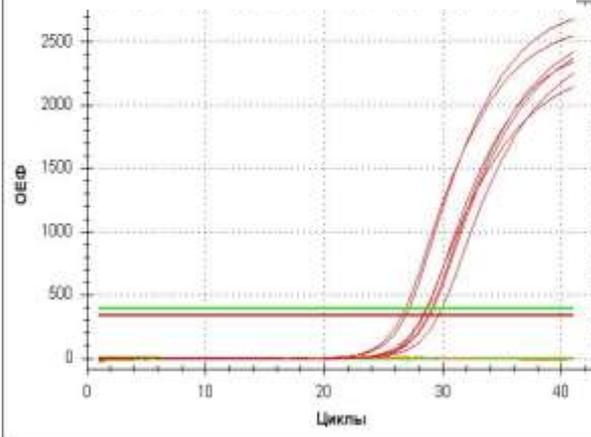


Технология выполнения исследований

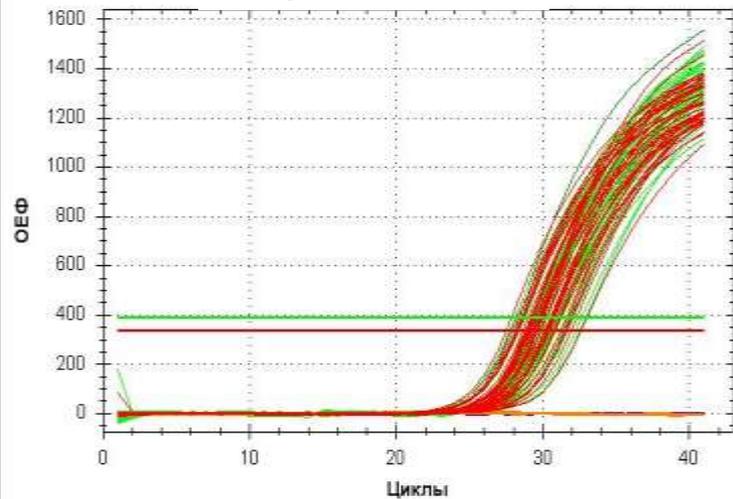
Гомозиготы по аллелю 1



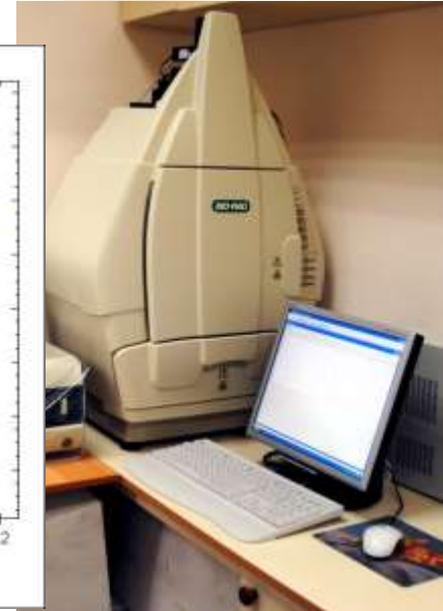
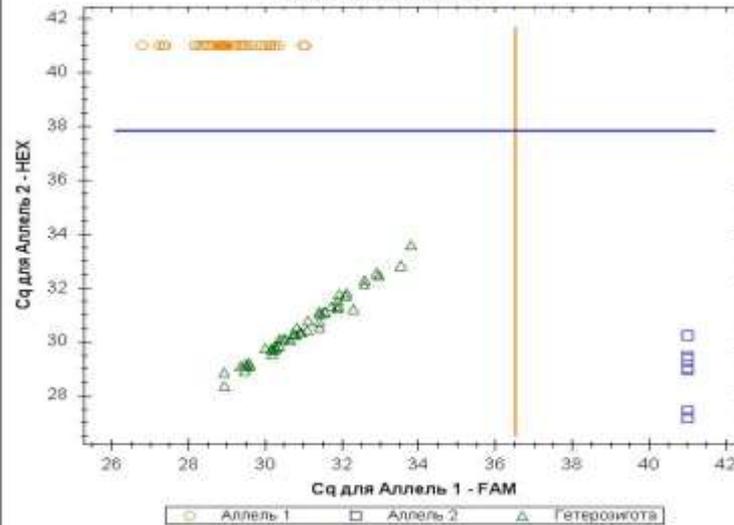
Гомозиготы по аллелю 2



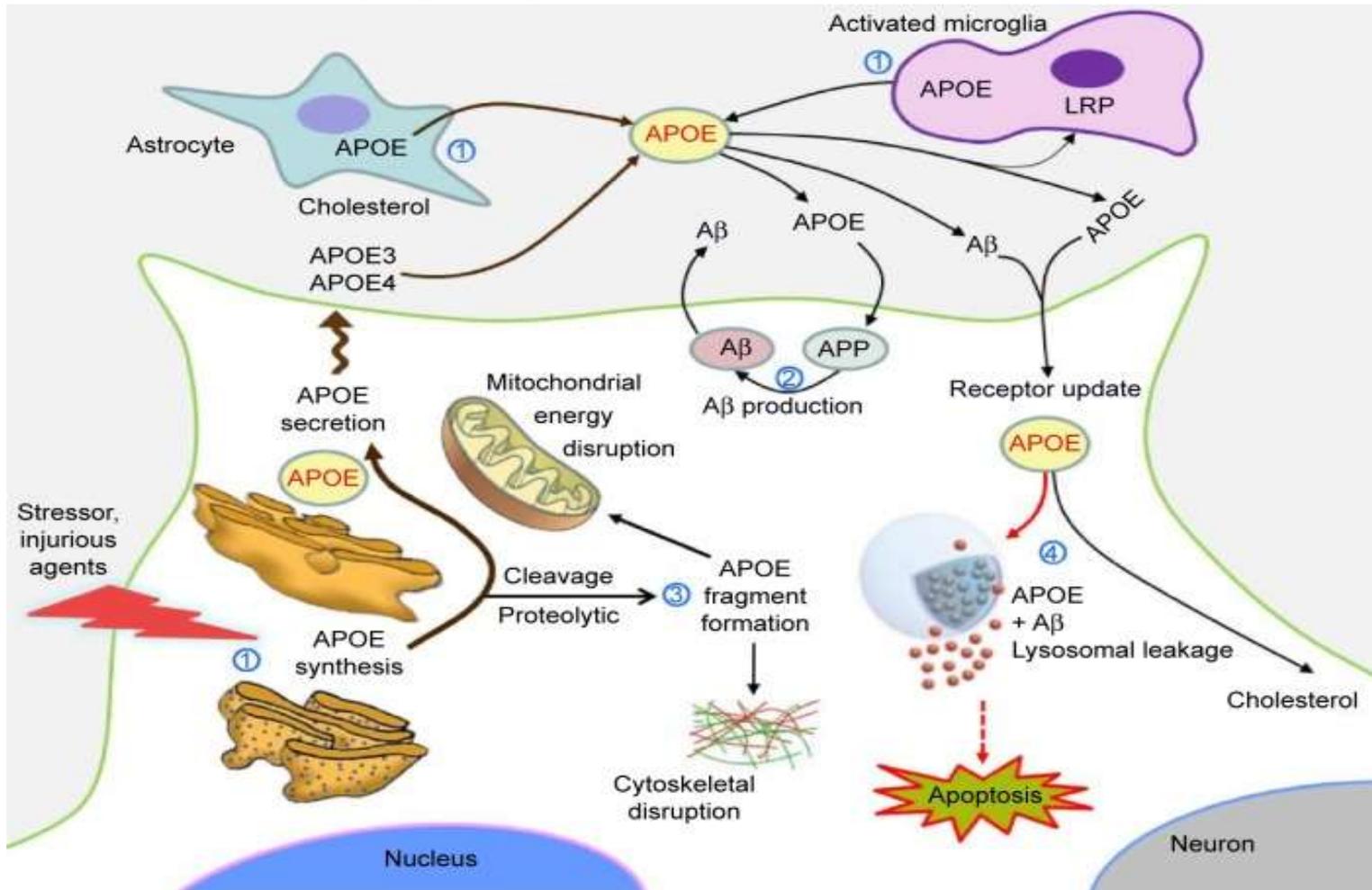
Гетерозиготы



Аллельная дискриминация

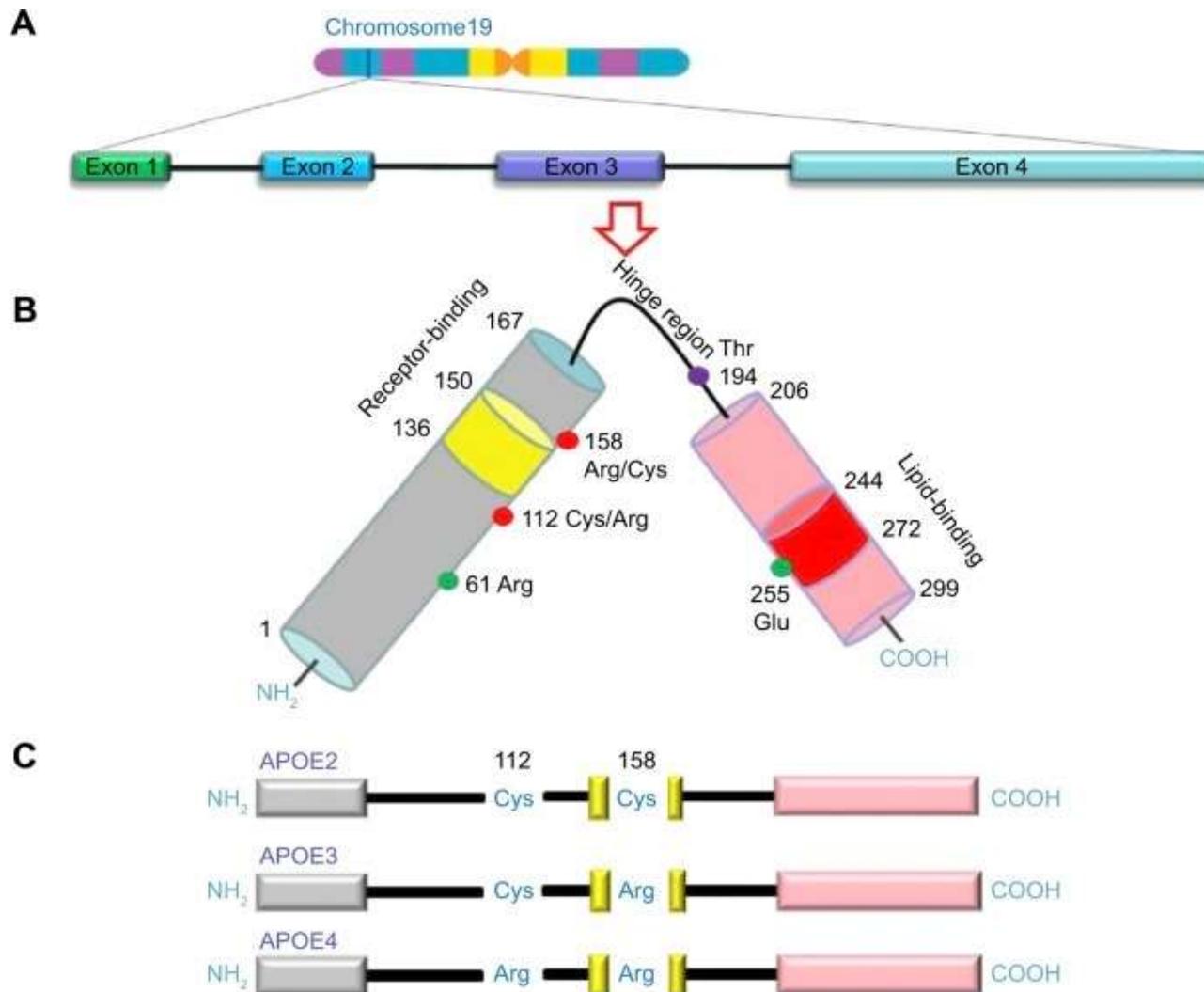


Роль АРОЕ в формировании патологии нервной ткани

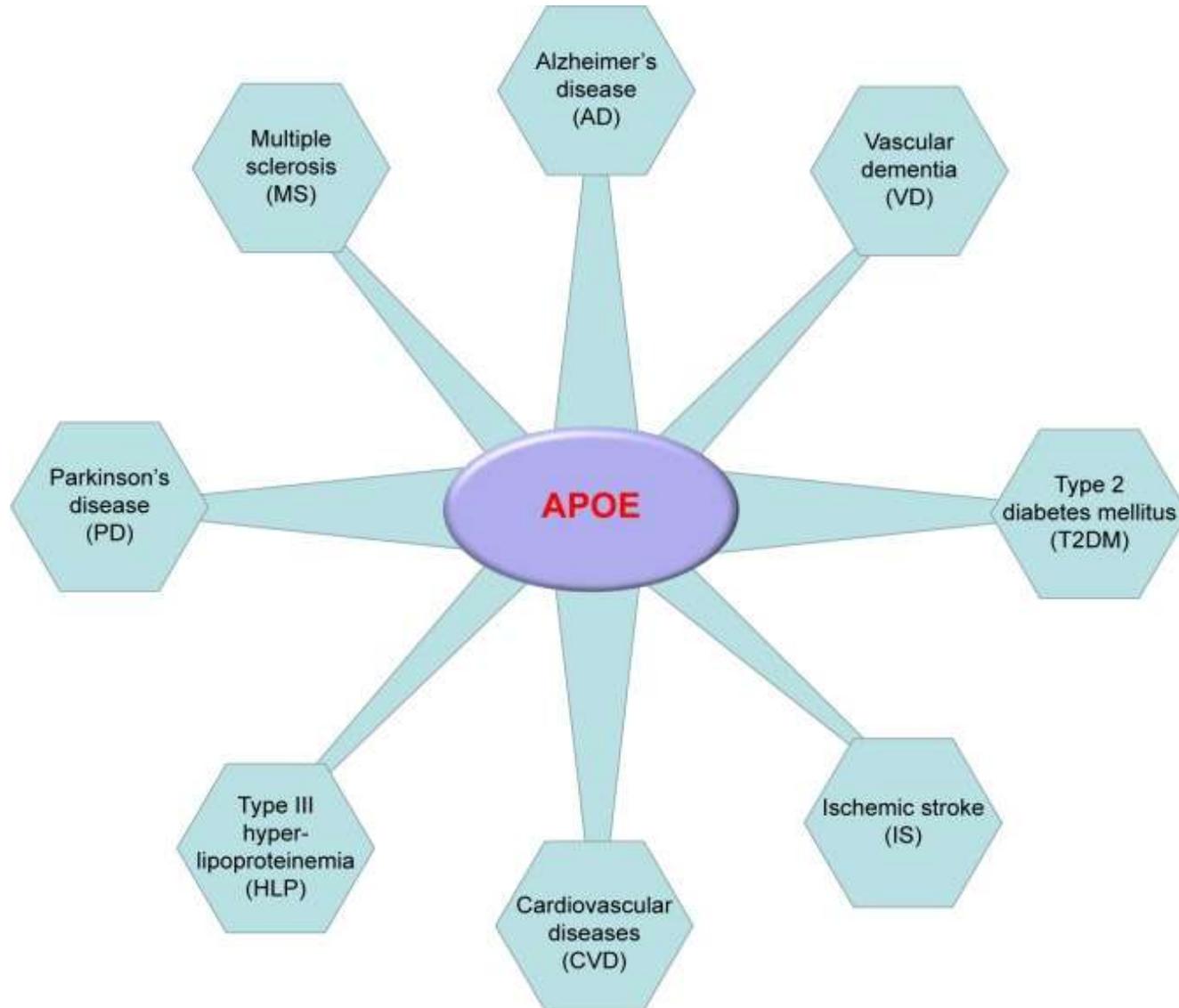


1 - АРОЕ производится астроцитами, микроглией при некоторых патологических состояниях (стресс, вредные агенты и т. д.). 2 - АРОЕ запускает образование амилоида β ($A\beta$) из белка предшественника (APP). 3 – В результате фрагментации АРОЕ, он связывается с белками цитоскелет, изменяя их, и вызывает нарушение функции митохондрий. 4 - Изоформы АРОЕ и амилоид β индуцируют апоптоз.

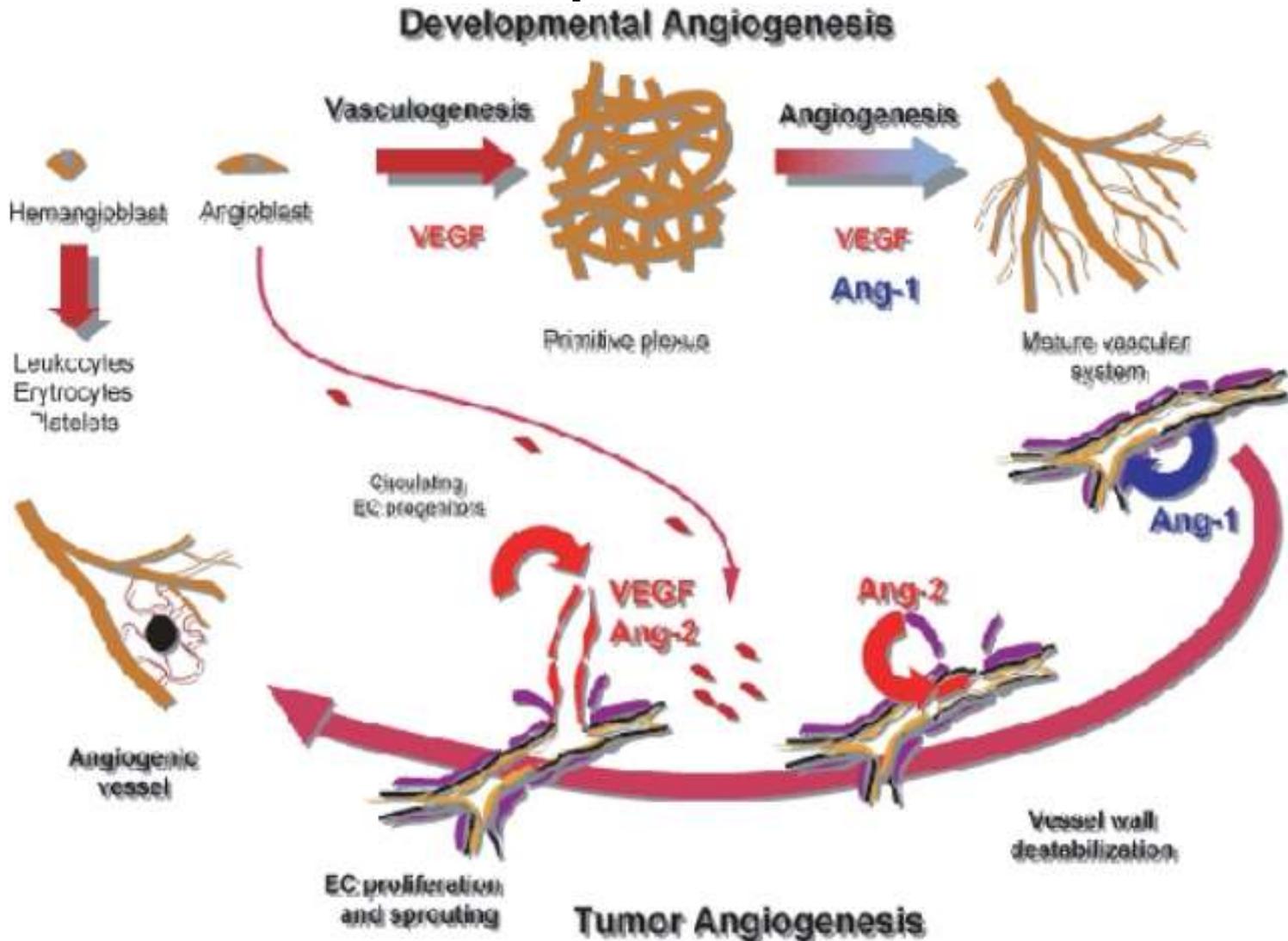
Структура гена и белка АРОЕ



Ассоциации полиморфизма гена APOE с болезнями



VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор, маркер ангиогенеза и ряда заболеваний



Ген NOS3 – синтаза оксида азота



По результатам проведенной аттестации рабочих мест установлено что, согласно Руководства Р 2.2.2006-05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда», на всех рабочих местах группы наблюдения условия труда оценены как **вредные**. На работников, включенных в группу наблюдения воздействуют следующие химические факторы: углеводороды алифатические предельные C1-10 (в пересчете на C), максимально-разовая концентрация которых составила 100мг/м³, при ПДК до 900 мг/м³.

В воздухе рабочей зоне присутствуют пары акрилонитрила, концентрация которого составила 0,010 мг/м³ у машиниста резиносмесителя и 0,007 мг/м³ у вальцовщика резиновых смесей, при ПДК 0,5 мг/м³. На рабочих местах машиниста резиносмесителя и вальцовщика резиновых смесей присутствуют аэрозоли преимущественно фиброгенного действия (АПФД) - углерода пыли (сажи черные промышленные с содержанием бенз(а)пирена), среднесменная концентрация которых составила 1,84 мг/м³ при ПДК 4,0 мг/м³. Условия труда – допустимые (2 класс).

Уровень производственного шума на рабочих местах подготовительного цеха у машиниста резиносмесителя и вальцовщика резиновых смесей составил 85 дБА, при ПДУ 80 дБА, что соответствует 1 степени 3 класса (3.1). Тяжесть трудового процесса соответствует 2 степени 3 класса (3.2).

Результаты

Сравнительная оценка содержания алюминия в моче и крови детей (группа наблюдения, n=48) и группа сравнения (n=21)

Исследуемая среда	Группа наблюдения (M±m)	Группа контроля (M±m)	Межгрупповое различие по средним (p)
Моча	0,0012±0,00097 *	0,00022±0,00006	0,04
Кровь	0,0002±0,0004	0,0003±0,0007	0,81

* - достоверные межгрупповые различия ($p < 0,05$).

•В результате проведенных исследований по содержанию алюминия в моче, потребляемой детьми группы наблюдения и группы контроля зарегистрированы превышения концентраций в воде относительно группы контроля в 5,5 раза ($p \leq 0,05$).

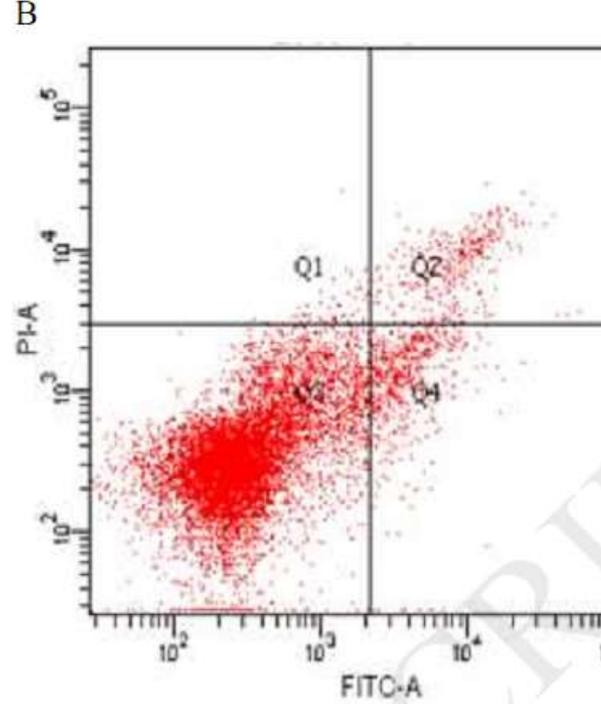
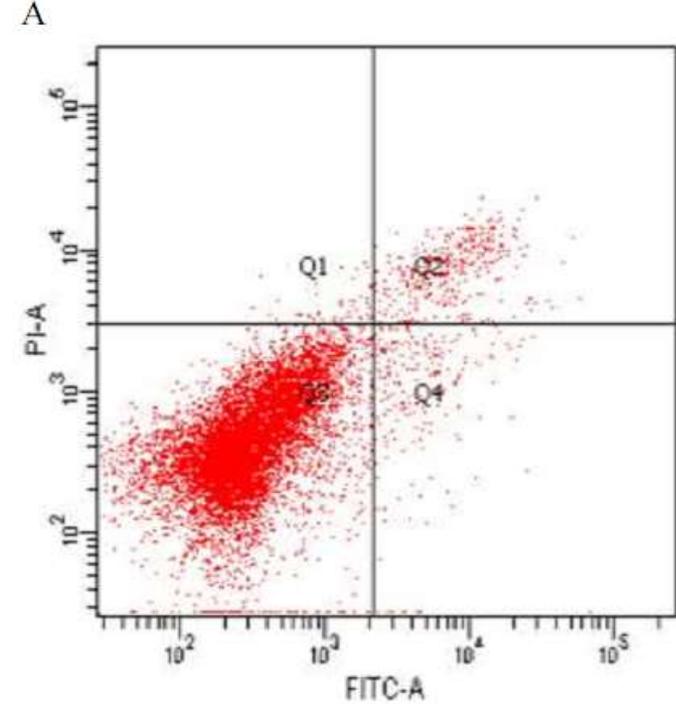
Иммунологические маркеры эффекта у работников химического производства

Показатель	Группа исследования n=48	Контрольная группа n=21
	Среднее значение (M±m)	Среднее значение (M±m)
IgG к алюминию, у.е.	0,147±0,079	0,118±0,08
GAD1, нг/см ³	0,638±0,107***	0,976±0,245
VEGF, пг/см ³	119,765±23,308	99,732±24,909
Антитела к ТПО, МЕ/см ³	102,341±69,824	17,543±15,821
Интерлейкин-17, пг/см ³	10,763±7,788	5,612±2,913
Вах, %	5,518±0,304*	3,916±0,176
CD3+CD25+-лимфоциты, отн., %	15,6±3,891*	22,9±2,845
Липопротеин(а), мг/100 см ³	36,771±15,052**	56,828±14,013

* – разница достоверна относительно контрольной группы (p<0,05);

** – разница достоверна относительно нормы (p<0,05);

*** – разница достоверна относительно контрольной группы и нормы (p<0,05);



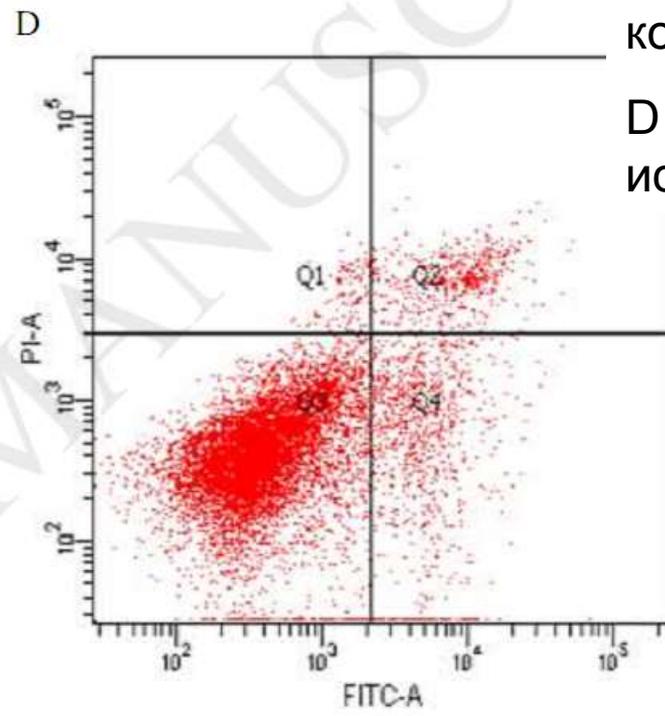
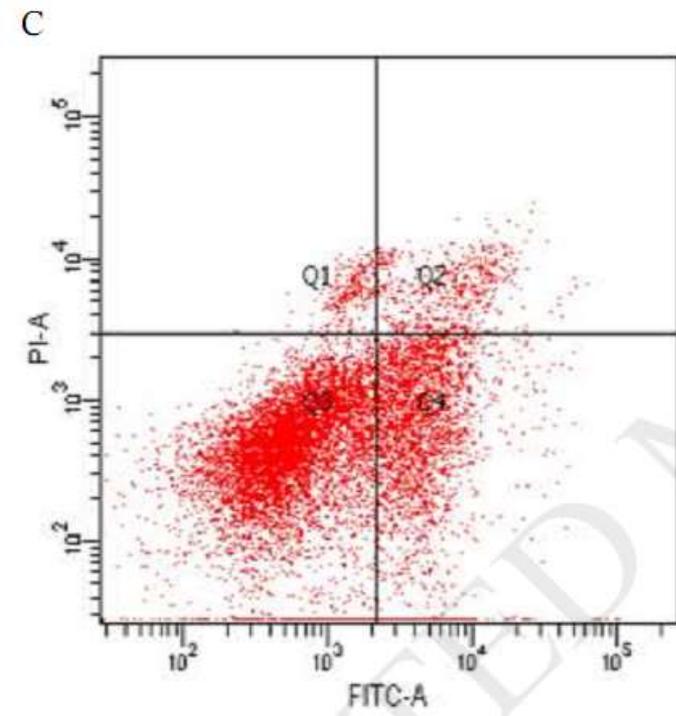
Показатели клеточной гибели лимфоцитов *in vitro*

A – контрольная группа

B – исследуемая группа

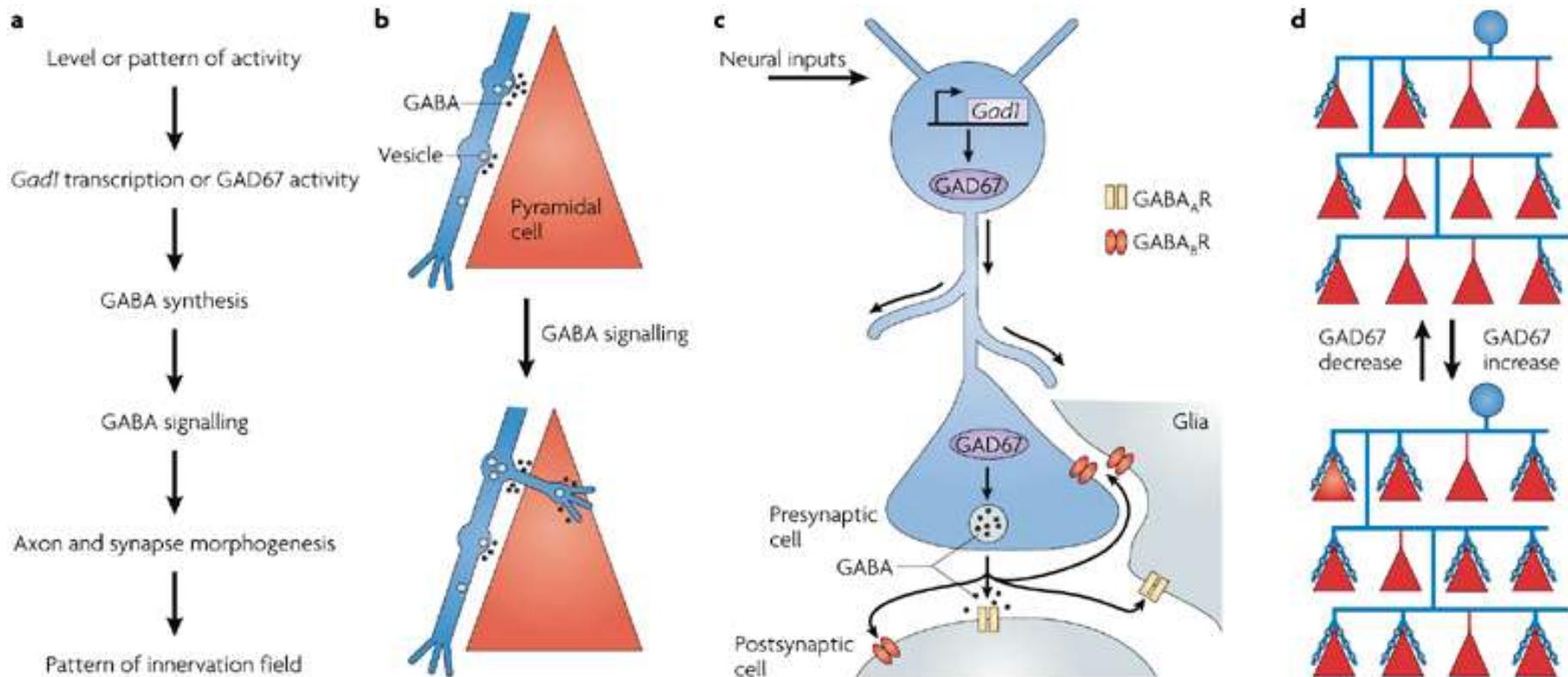
C – нагрузка AI на контрольную группу

D – нагрузка AI на исследуемую группу



- Установлены достоверные отклонения от нормы и контроля показателей CD-иммунограммы. У детей в условиях комбинированной нагрузки процесс перестройки рецепторов иммунокомпетентных клеток протекает с признаками угнетения T-клеточных рецепторов CD25+ и активации проапоптотических маркеров bax ($p < 0,05$).
- Анализ показателей цитокиновой регуляции VEGF и GAD1, позволил установить достоверный дефицит GAD по отношению к норме и снижение показателя в 1,5 раза по отношению к контролю. Анализ отношения шансов изменения содержания цитокинов при возрастании концентрации контаминантов в выдыхаемом воздухе позволил установить достоверное ($p < 0,05$) снижение концентрации GAD при увеличении концентрации акрилонитрила в выдыхаемом воздухе ($R^2 = 0,69$ при $p < 0,05$)
- Экспрессия ИЛ17 почти в 2 раза превышала уровень нормы и контроля.

Участие декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD) в метаболизме ГАМК (GABA)



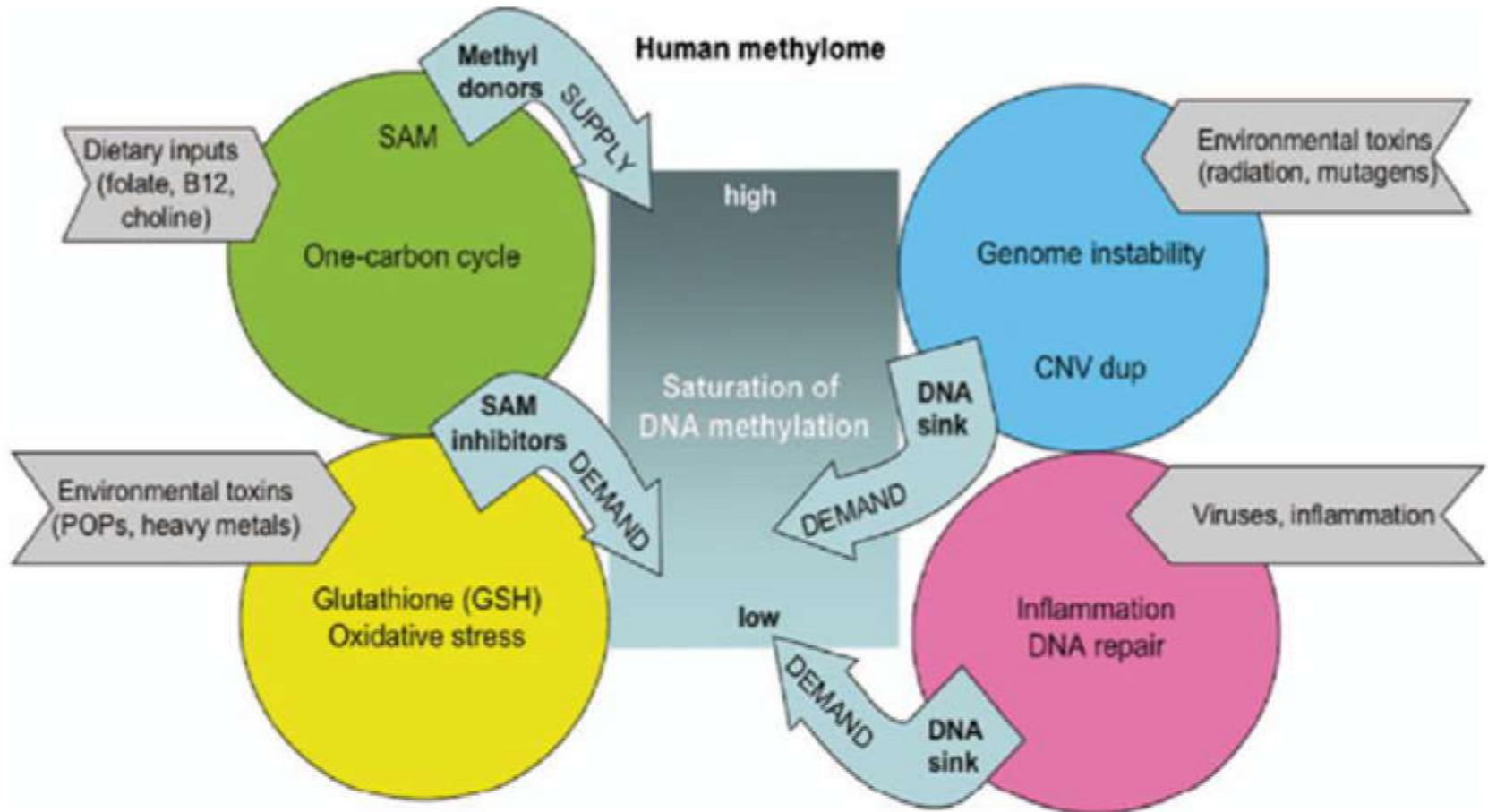
Снижение GAD приводит к уменьшению количества синапсов на нейронах для ослабления тормозного влияния ГАМК. В результате могут меняться поведенческие реакции

- Результаты генетического анализа 24 генных полиморфизмов у детей позволили выявить ключевые гены исследуемой группы работающих, распространенность полиморфизмов которых достоверно отличалась от группы контроля ($p < 0,05$): ген АРО-Е, ген eNOS, ген VEGF.
- Генотип основной группы характеризовался следующими особенностями полиморфности по отношению к группе контроля: ген аполипопротеина Е (АРО-Е) отличался повышенной встречаемостью вариантного аллеля (в 2,5 раза по отношению к контролю) за счет гетерозиготного вариантного генотипов (в 2,2 раза выше контроля); ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), преимущественный вариант генотипа которого – гомозиготный встречался в 1,5 раза чаще контрольной группы, что и предопределило более высокую распространенность мутантного аллеля в исследуемой группе; ген эндотелиального фактора роста (VEGF), отвечающий за состояние эндотелия сосудов, характеризовался высокой распространенностью мутантного аллеля (в 1,8 раза выше контроля) прежде всего за счет гетерозиготного вариантного генотипа (превышение уровня контроля в 2,3 раза).

Особенности генетического полиморфизма у детей

Ген	Генотип/аллель	Группа сравнения, % n=48	Группа наблюдения, % n=21
VEGF	GG	72	45
	GC	20	45
	CC	8	10
	G	82	67
	C	18	33
eNOS	GG	68	53
	GT	24	34
	TT	8	13
	G	80	71
	T	20	29
ApoE	TT	88	72
	CT	12	26
	CC	0	2
	T	94	85
	C	6	15

Интегративная модель, связывающая энвайронментальные влияния и генетические пути

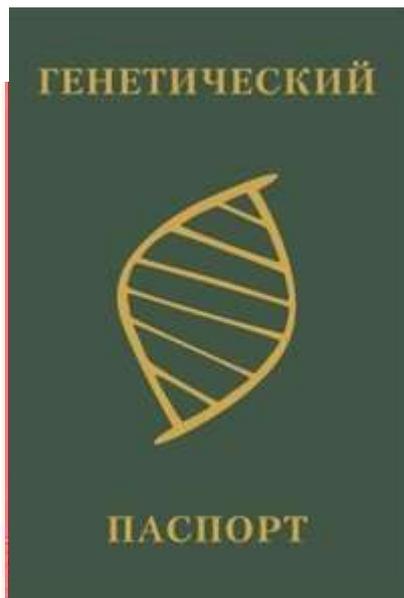
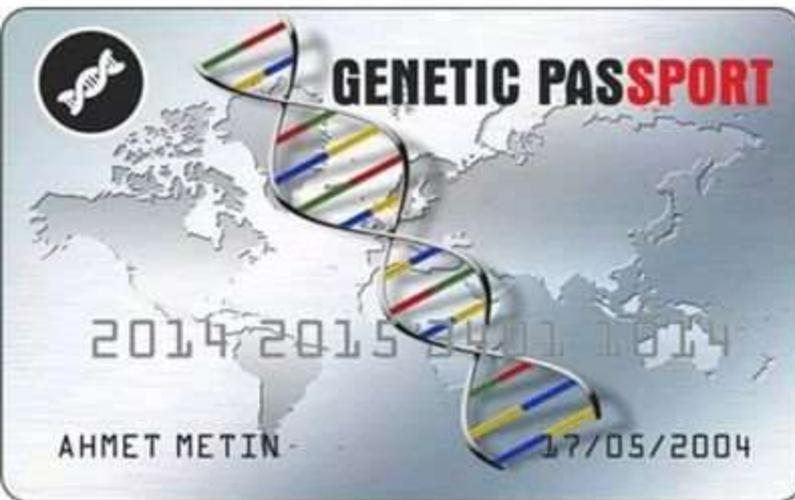


Будущее

- Медико-генетическое консультирование работающих и их детей
- Секвенирование индивидуального генома человека (ген. паспорт)
- Генная инженерия
- Эпигенетический контроль



Ген. паспорт



ATHLETE - GENETIC PROFILE

KGACOI

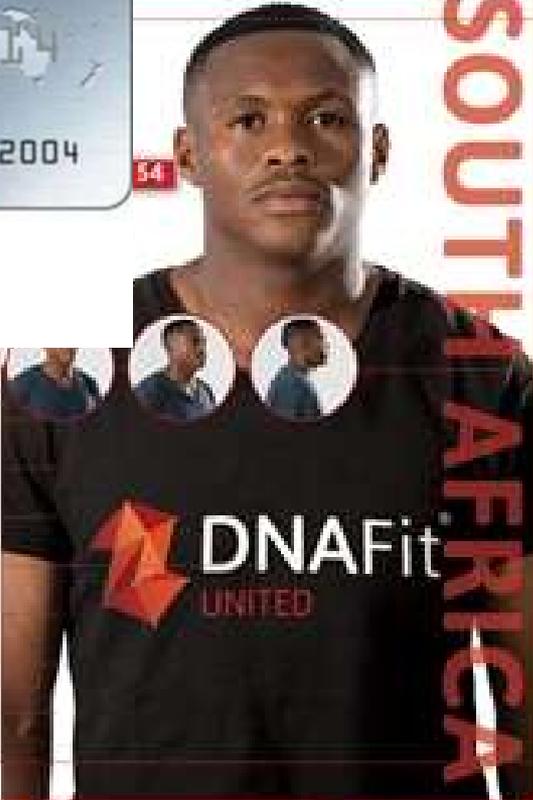


SOUTH AFRICA

- ★ Kagiso DikgacoI, born 24.11.84, Bransford, South Africa
- ★ Defensive / Central midfielder
- ★ International debut - 2007 (vs Mauritius)
- ★ Scored twice against Equatorial Guinea in 2008
- ★ Founder of the Kagiso DikgacoI-Foundation
- ★ Participated in 2010 World Cup

POWER / ENDURANCE & VO2 MAX GENES		
GENE	ALLELE	RESULT EFFECT
ACE	I	Endurance profile
ACE2	AA	Increased VO2 max capacity
ACT	CC	Great association with Power
ACTN3	CC	Advantage for sprint and power profile
BDNF	CC	No measured impact
CMR	GA	Favouring positive for VO2 max / Endurance profile
EA	CC	Associated with power performance
EPOR	AA	No measured impact on fitness
EPAS1	GA	Associated with endurance
EPAS2	GG	Power / Endurance mix
EPAS3	AA	No measured impact on fitness
IGFBP3	CC	Reduced IGF1R production that may reduce effect of training
IGFBP5	TT	No measured impact on fitness

RECOVERY GENES		
GENE	ALLELE	RESULT EFFECT
CMR	GA	Regular exercise has positive impact on recovery
EA	CC	No measured impact on fitness
EPOR	AA	No measured impact on fitness
IGFBP3	CC	Minimal impact for endurance benefits
IGFBP5	GG	Regular exercise has positive impact on recovery



DNAFit UNITED

#DNAFitUnited dnafit.com +44 (0) 845 463 4653 info@dnafit.com

Выводы

- По результатам проведенного иммунологического и генетического обследования детей в условиях комбинированного воздействия вредных факторов производственной среды (соединения алюминия) выявлены существенные нарушения гуморального звена иммунитета, которые характеризовались угнетением Т-клеточных рецепторов CD25+, CD95+, снижением уровня сосудистого фактора GAD1 – достоверное по отношению к референтному уровню и контролю.
- Результаты анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения по критерию распространенности минорных аллелей генов ответственных за развитие нарушений сердечно-сосудистой системы (ген APO-E, ген eNOS, ген VEGF), систем детоксикации (CYP) и иммунорегуляции (TNF)
- Показатели иммунной регуляции (CD25+, *bax*, GAD1, IgG к алюминию), а также варианты аллели кандидатных генов (APO-E, eNOS, VEGF, TNF, CYP) рекомендуется использовать в качестве маркеров эффекта и чувствительности при оценке риска здоровью комбинаций вредных производственных факторов – воздействие химических факторов (соединения алюминия).

Спасибо за внимание !