Показатели иммунной регуляции у работников калийных горнодобывающих производств

Д.м.н., Долгих Олег Владимирович,
ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь

Актуальность

- Актуальным является выделение маркерных иммунологических и генетических показателей, которые могут быть использованы в качестве ранних индикаторов нарушений здоровья работающих

Цель

- Идентификация иммунных и иммуногенетических маркеров в условиях комбинированной шумовой и химической производственной факторной нагрузки

Объекты исследования

- Группу наблюдения составили 139 работников (все мужчины, средний возраст 36,6±1,0 год, средний стаж 7,3±0,9) –) занятых на выполнении подземных горных работ.
- Группу сравнения составили 53 работника (все мужчины), занятых профессиональной деятельностью на поверхности, средний возраст – 40,2±2,7 лет, средний стаж – 5,8±1,9 года.

Условия труда

- Рабочие места группы наблюдения характеризуются сходными условиями труда, выполняют однотипные профессиональные обязанности. Условия труда данной субпопуляции при интегральной оценке в соответствии с Р 2.2.2006 – 05 относятся к вредным 3 степени – класс условий труда 3.3, при априорной оценке профессиональный риск классифицируется как высокий (непереносимый).
- Основными производственными факторами, воздействующими на работников, определяя структуру риска, являются: пыль сильвинита, шум, вибрация, параметры микроклимата, тяжесть трудового процесса. .

Типирование маркеров эффекта и чувствительности

Исследуемые пробы крови

Аллергодиагностика

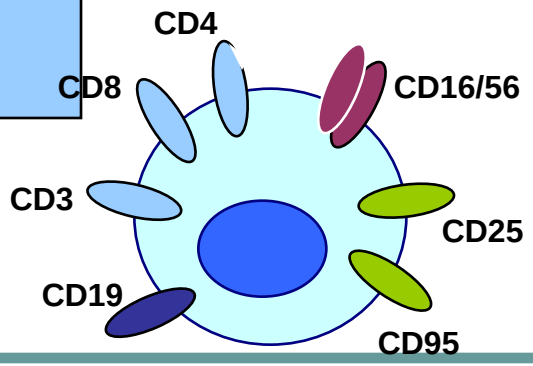
ПЦР в режиме реального времени

Проточная цитофлюориметрия

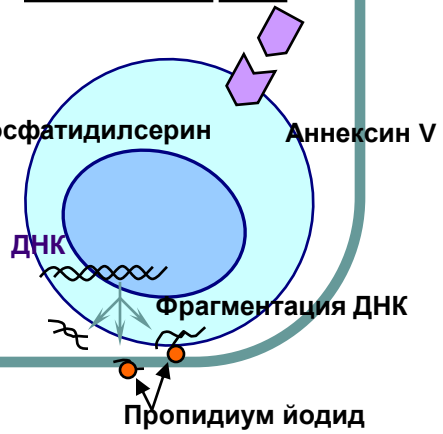
Специфические IgE и IgG

ДНК-диагностика генного полиморфизма

Субпопуляционный анализ

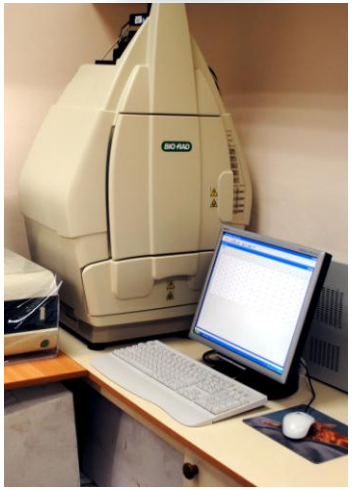


Вступление клетки в апоптоз



Генетические исследования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- Диагностика генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях воздействия химических факторов (*гены* - подсемейство CYP 1A1, метилентетрагидрофолатредуктаза, NO синтаза, *Матриксная металлопротеиназа,* Васкулярно-эндотелиальный фактор роста (*VEGF*), белок p53, аполипопротеин Е , фактор некроза опухоли)



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

Принципы генетического тестирования в условиях повышенной техногенной нагрузки

- Идентификация мутаций генов ферментов 1 и 2 фазы детоксикации
- Полиморфизм генов белков, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях
- Генотипирование предрасположенности к онкопролиферативным состояниям
- Определение иммуногенетических маркеров

Проточная цитометрия

- **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 T-reg клеток, супрессирующих иммунный ответ.**
- **Определение трансформирующего фактора p53 и ФНО-альфа, регулирующих клеточный цикл (онкопролиферативные состояния, аутоиммунитет, репродуктивные нарушения).**

BD FACSCalibur

Цитохром Р-450 (CYP)

- 1 фаза активации обеспечивается, главным образом, суперсемейством цитохрома Р-450 (CYP). Их основные функции заключаются в присоединении к молекуле ксенобиотика гидрофильных групп, благодаря чему происходит детоксикация. Однако в большинстве случаев ферменты 1-й фазы осуществляют в клетке метаболическую активацию ксенобиотиков, что сопряжено со значительной опасностью для клетки

MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза)

- Исследование полиморфизма гена MTHFR позволяет определить риск развития **онкологических** (рак молочной железы, яичников) и **сердечно-сосудистых заболеваний** (венозных и артериальных тромбозов, ишемии, инфарктов), **невынашиваемости беременности**, гестоза, дефектов внутриутробного развития во время беременности из-за нарушения в обмене фолиевой кислоты и гипергомоцистеинемии, оценить вероятность патологии у потомства.

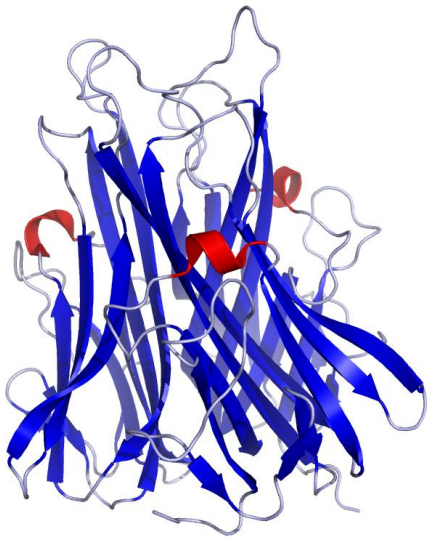
MMP
Матриксная металлопротеиназа

Семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. 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 *хемокинов* и *цитокинов* Установлено, что экспрессия MMP-1 играет важную роль в процессе метастазирования при опухолях легких и молочной железы.

Васкулярно-эндотелиальный фактор роста (*VEGF*)

- фактор и его рецепторы (VEGFR) – играют решающую роль в ангиогенезе, а следствием блока ангиогенеза являются гипоксия, эндотелиальная дисфункция, усугубление клинической картины многих заболеваний (сердечно-сосудистых, органов дыхания,

  заболеваний печени и др.)



NO синтаза

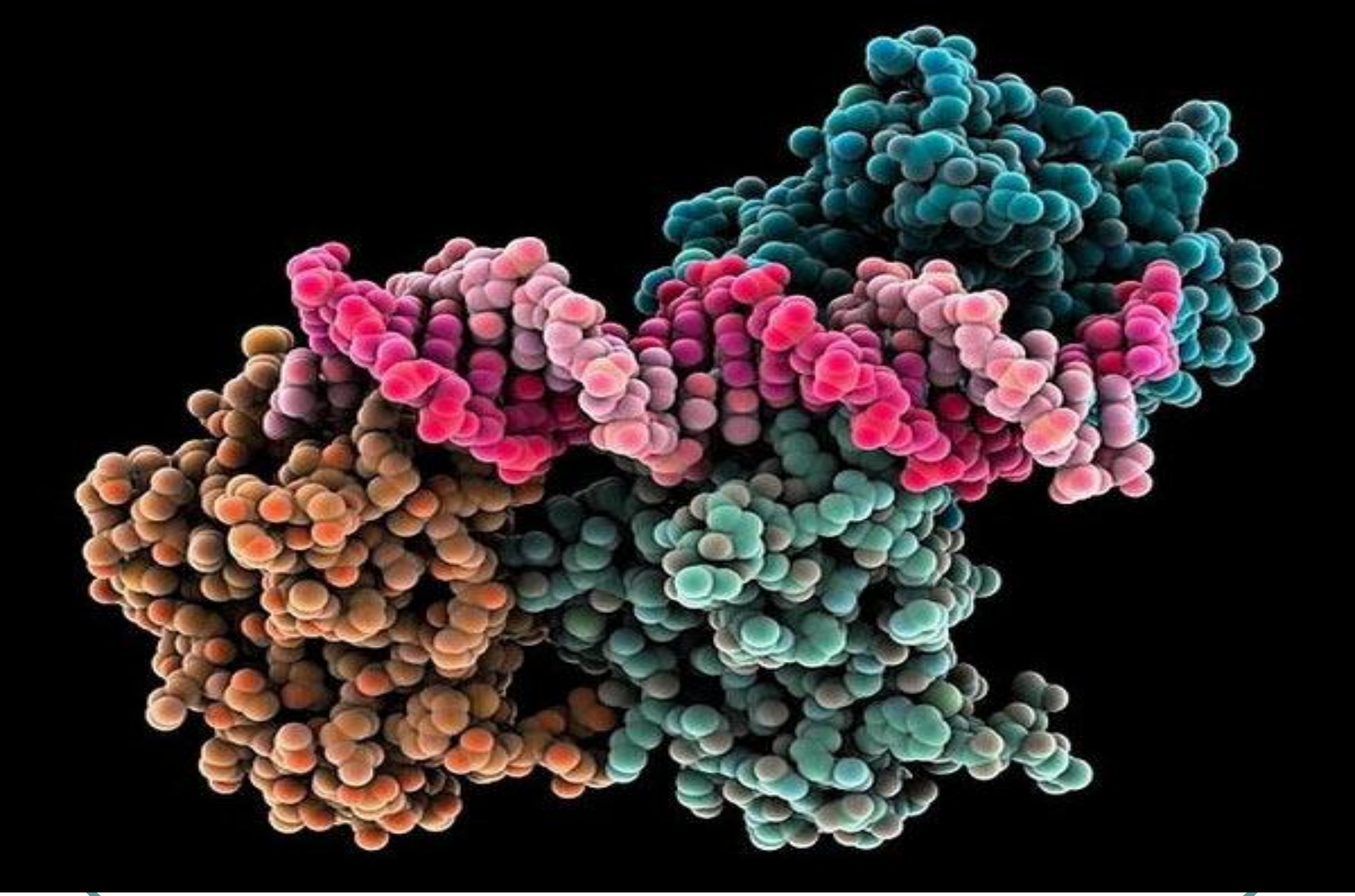
- Четко прослеживается связь между уровнем продукции NO в организме и выраженностью окислительного стресса : ингибирование синтеза и резкое снижение содержания оксида азота в кровяном русле связано с накоплением свободно-радикальных молекул.
- нарушение экспрессии гена NOS3 приводит к уменьшению выработки NO. Для данного варианта описаны ассоциации с атеросклерозом, ишемической болезнью сердца и инфарктом миокарда. Установлено, что риск атеросклеротического поражения коронарных артерий повышен у контактирующих с ПАУ (курильщики)

ApoE (ген аполипопротеина Е)

- ген аполипопротеина Е детерминирует заболеваемость семейной гиперхолестеринемией в сочетании с внешними факторами, такими, как режим питания, курение, токсичные вещества
- имеется повышенный риск развития болезни Альцгеймера в 5-15 раз, а также рассеянного склероза
- Подтверждена его ассоциация с БА

Ген p53

- Ген p53 – онкосупрессор, его продукт белок p53 контролирует ответ клетки на различные виды **стресса, включая повреждения ДНК химическими и физическими агентами**. Активация гена p53 ведет к остановке пролиферации клетки и к включению в ней программы апоптоза – запрограммированной клеточной гибели. Инактивация гена p53, наблюдаемая в большинстве опухолей, подтверждает его противоопухолевую функцию. Полиморфные варианты гена p53, по-видимому, **снижают способность клеток к апоптозу**, вследствие чего не происходит запрограммированного удаления дефектных клеток, что и является причиной патологического опухолевого и опухолеподобного процесса. При этом неблагоприятные аллельные варианты генов системы детоксикации могут существенно усиливать клеточный стресс, который в значительной степени реализуется через экспрессию гена p53.



Модель взаимодействия p53 (коричневый-синий-зелёный) с ДНК (красный).
P53 является транскрипционным фактором, запускающим синтез белков апоптоза и клеточного цикла.

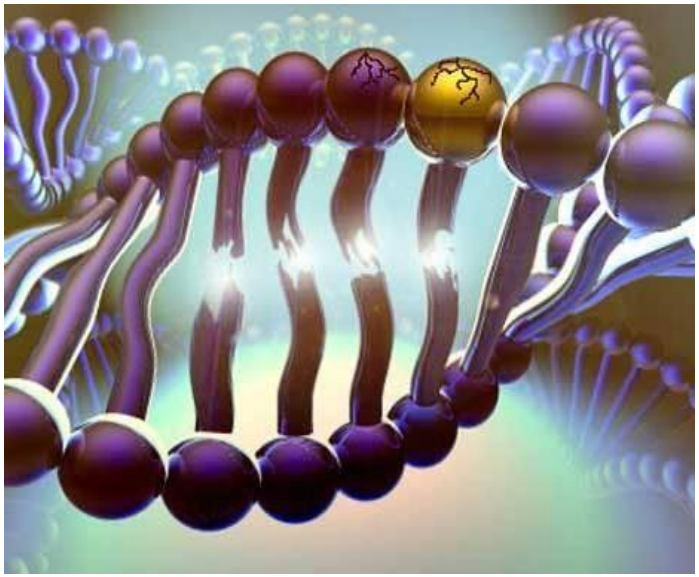
Натурные исследования

- За период наблюдения выполнялись мониторинговые исследования по определению фракционного состава (фракции с диаметром частиц менее 2,5 мкм (PM2,5) и менее 10,0 мкм (PM10)). Получены характеристики распределения взвешенных частиц по размерам в диапазоне 5 – 200 нм: средний аэродинамический диаметр составил 62,5 нм, ширина распределения составила 21 нм. На обследованных рабочих местах в общей массе взвешенных частиц преобладала доля частиц PM10 (50,2%)

Натурные исследования

- На рабочих местах уровень шума достигал 83-94 дБА. Концентрация сильвинита составляла 57-61,5 мг/м3. Работники группы сравнения, работают на поверхности при уровне шума не более 73 дБА и с отсутствием пыли сильвинита.

Маркеры эффекта



Генетическое типирование (N=225)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	УралКалий, Березники	контроль
cyp1A1(2) (A4889G)	AA	88%	91%
	AG	10%	9%
	GG	2%	0%
	A	93%	95%
	G	7%	5%
MTHFR (Ala222Val)	CC	57,5%	60%
	CT	37%	35%
	TT	5,5%	5%
	C	76%	74%
	T	24%	26%

Генетическое типирование (N=225)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	УралКалий, Березники	контроль
VEGF C(+405)G	GG	52%	54%
	GC	37%	42%
	CC	11%	4%
	G	70%	75%
	C	30%	25%
eNOS(G894T)	GG	57%	56%
	GT	35%	38%
	TT	8%	6%
	G	75%	75%
	T	25%	25%

Генетическое типирование(N=225)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	УралКалий, Березники	контроль
CPOX	GG	77,5%	86,5%
	AG	20,5%	13,5%
	AA	2%	0%
	G	88%	93%
	A	12%	7%
APOE (Cys130Arg)	TT	75%	77%
	TC	24%	20%
	CC	1%	3%
	T	87%	88%
	C	13%	12%

Генетическое типирование (N=225)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	УралКалий, Березники	контроль
TNF (G308A)	GG	78%	89%
	AG	21%	9%
	AA	1%	2%
	G	89%	94%
	A	11%	6%
MMP9 (Gln279Arg)	AA	41%	29%
	AG	44%	58%
	GG	15%	13%
	A	63%	57%
	G	37%	43%

Результаты

- Анализ результатов изучение полиморфизма генов цитохром-450 (CYP1A1), CPOX, VEGF, eNO-синтаза, TNFальфа, MMP9, APO позволил установить, что аллельный полиморфизм генов, отвечающих за иммунный ответ и апоптоз (TNFальфа) характеризуется повышенной распространенностью минорного аллеля (в 2 раза) по сравнению с уровнем группы сравнения, прежде всего за счет гетерозиготного генотипа.
- Полиморфизм гена VEGF отличался от группы сравнения преимущественной распространенностью гена в мутантном гомозиготном состоянии. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции (eNO-синтаза) был сопоставим в анализируемых группах.
- Полиморфизм генов детоксикации CYP1A1, CPOX характеризует специфические различия между анализируемыми группами. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за 1 фазу детоксикации органических токсикантов превышает показатель группы сравнения (за счет гомо– и гетерозиготного генотипа).

Результаты

- Установлены достоверные разнонаправленные изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов A, M и G с преимущественной гиперпродукцией IgA (в 87% случаев) и дефицитом IgM и IgG (88,5%, p=0,000 и 51,1%, p=0,00 соответственно) по отношению к нормативным уровням, при этом выявлено достоверное снижение Ig M по сравнению с показателями группы сравнения (p=0,012).
- Умеренно стимулирован уровень эритропоэтина по отношению к норме (превышение у 13,3% работающих). Отмечается повышение фактора некроза опухоли (ФНО) достоверное по отношению к группе контроля (в 2,1 раза, p=0,001).

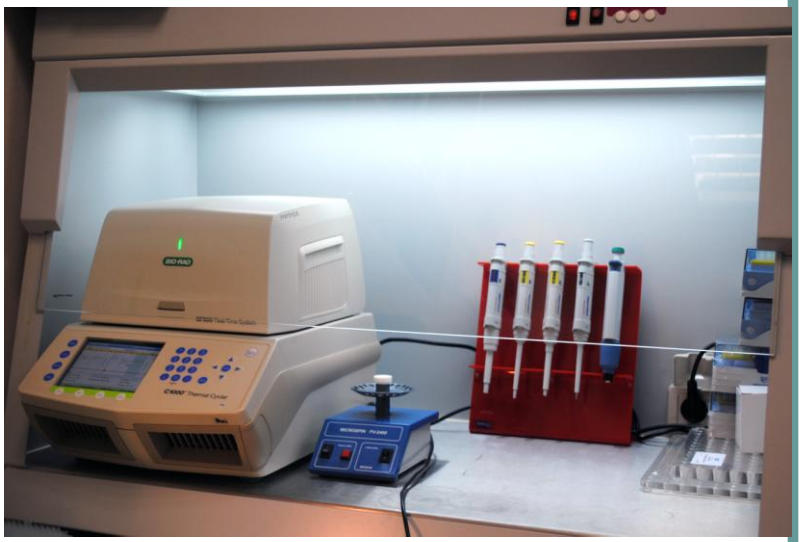
Характеристика отдельных показателей иммунной системы

Показатели	Контрольная группа (*n*=33), *M*±*m*	Основная группа (*n*=44), *M*±*m*
$CD4^+$ $CD25^+127^-$, %	0,55±0,06	1,97±0,19*
$CD4^+$ $CD25^+127^-$, 10^9/дм^3	0,01±0,001	0,038±0,004*
p53, %	3,42±0,29	1,44±0,11*
TNFR, %	3,31±0,27	1,39±0,11*
Annexin V-$FITC^+7AAD^-$, %	3,09±0,20	0,93±0,06*
Annexin V-$FITC^+7AAD^+$, %	6,96±0,51	7,57±0,47
Bcl-2, %	0,83±0,06	0,48±0,02*

Примечание. * - разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

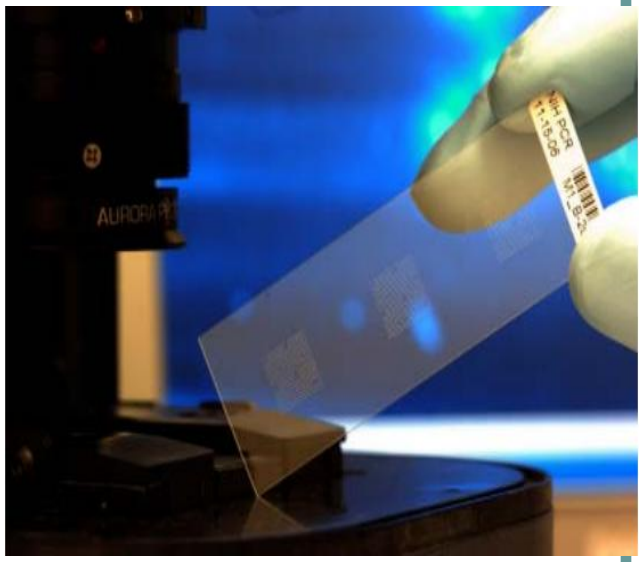
Обсуждение результатов

- Анализ результатов изучения иммуногенетических маркеров эффекта позволил идентифицировать наиболее чувствительную в отношении изучаемых факторов и контингентов комбинацию генов: **гены цитохрома, копропорфириноксидазы, васкулярно-эндотелиального фактора роста (*VEGF*), фактора некроза опухоли**, а также их ассоциацию с иммунологическими нарушениями



Резюме

- Молекулярно-генетическая и клеточная диагностика позволяет не только идентифицировать ранние нарушения здоровья работников, но и наметить их безопасный профессиональный маршрут, стать инструментом оценки риска здоровью воздействия производственных факторов



Благодарю за внимание