

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОБОСНОВАНИЮ БИОМАРКЕРОВ ЭКСПОЗИЦИИ И ЭФФЕКТА В СИСТЕМЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ПРИЧИНЕНИЯ ВРЕДА ЗДОРОВЬЮ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ НЕПРИЕМЛЕМОГО РИСКА, ОБУСЛОВЛЕННОГО ФАКТОРАМИ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ



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

д.м.н. Марина Александровна Землянова

Приоритетное направление исследований – разработка научно-методического обеспечения доказательства негативного воздействия факторов среды обитания на здоровье

По мнению экспертов ВОЗ основным инструментом установления причинно-следственных связей является обоснование биомаркеров экспозиции и эффекта



Принципы оценки рисков для здоровья, связанных с воздействием химических веществ: Критерии гигиены окружающей среды 237 (ВОЗ, Европейское региональное бюро, 2006, 2011)



- Контрольно-надзорные функции.
- Мониторинг объектов среды обитания.
- Биомониторинг.
- Гигиеническое нормирование.

Биомаркеры экспозиции

Биомаркеры эффекта

Причинно-следственные связи в системе «среда - здоровье»

Разработка и апробация технологий обоснования биомаркеров экспозиции и эффекта для задач установления причинно-следственных связей

Технологии обоснования биомаркеров экспозиции и эффекта

Системный характер

Гармонизация с требованиями международной практики (стандарты GCP, GLP, GMP)

Научный анализ опасности и риска
(Руководство Р.2.1.10.1920-04, Р 2.2.2006-05)

Эпидемиологические исследования
(медико-биологические наблюдения)

Теоретические знания о реализации эффекта
(базы данных ВОЗ, ЕРА, АРИПС «Опасные вещества», профайлы ATSDR)

Многолетними **масштабными наблюдениями** охвачено порядка **20 тыс.** детского и взрослого населения, более **8 тыс.** работающих

Научные подходы, применяемые для установления вредного воздействия химических факторов среды обитания на здоровье, реализуются в трех ведущих направлениях

При обосновании
**маркеров
экспозиции**

При обосновании
маркеров ответа
организма на
воздействие

При выявлении
устойчивых
**достоверных
причинно-
следственных
связей**

- отдельные факторы;
- комплекс факторов;
- сочетания факторов;
- различные пути поступления;
- различные уровни воздействия, в т.ч. низкоуровневое.

- экспозиция – маркер экспозиции;
- маркер экспозиции – маркеры ответов.

Обоснование маркеров экспозиции, как подтверждение контакта человека с фактором внешней среды

1. Химико-аналитическое исследование качественного и количественного содержания в биосубстратах химических веществ, адекватных факторам риска

Целевые группы обследуемых

- **Население** в зонах экспозиции:
 - дети от 0 до 14 лет,
 - беременные,
 - женщины фертильного возраста.
- **Работающие** с вредными производственным и факторами

Методы химико-аналитического контроля (порядка 35 методов)

Биологические среды

- кровь,
- плазма крови,
- сыворотка крови
- моча
- желчь
- желудочный сок
- грудное молоко
- волосы

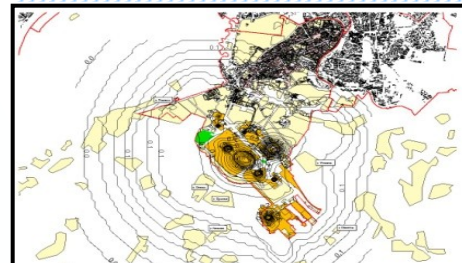
Химические факторы риска (более 50 веществ)

Химические вещества

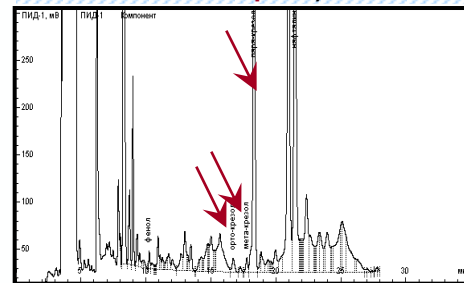
- металлы
- альдегиды
- ароматические углеводороды
- алифатические спирты
- ароматические амины
- предельные углеводороды

Обследование проводится с соблюдением этических принципов, изложенных в **Хельсинкской декларации (1975, 1983 гг.)**, получением информированного согласия добровольца (волонтера)

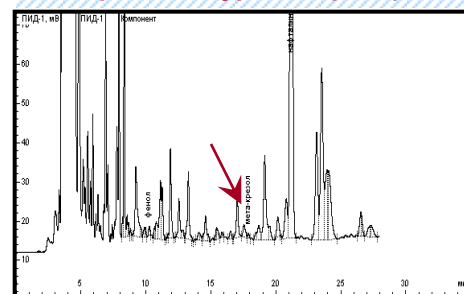
Население в зоне экспозиции крезолом



Хроматограмма крови ребенка в зоне экспозиции (содержит м-, о-, п-крезол достоверно выше фона)



Хроматограмма крови ребенка вне экспозиции (содержит м-крезол на уровне фона)

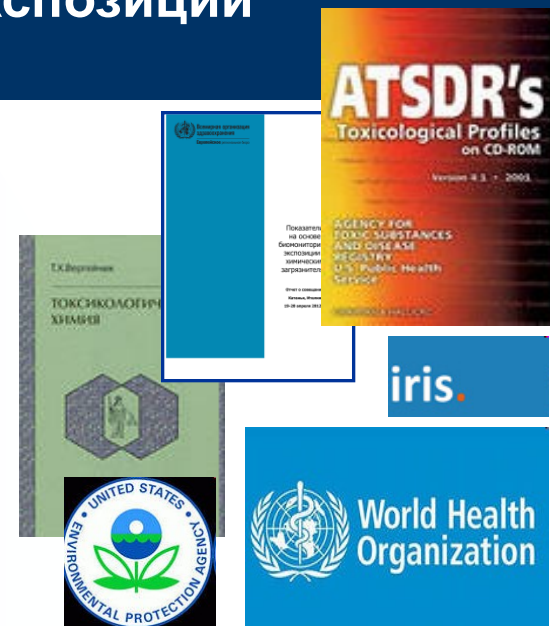


Критерии для включения химических веществ в перечень приоритетных при обосновании маркеров экспозиции

2. Формирование перечня приоритетных веществ, идентифицируемых в биосредах

Критерии:

- ❖ подтверждение научными данными возможности присутствия вещества из среды обитания или устойчивого метаболита в биосреде в условиях известной экспозиции (**базы данных ВОЗ, US EPA, АРИПС «Опасные вещества», ATSDR**);
- ❖ достоверное превышение уровня содержания химического вещества в биосубстрате в группе наблюдения относительно показателя в группе сравнения: $(M_n \pm m_n) > (M_k \pm m_k) (p \leq 0,05)$.



Содержание загрязняющих веществ в крови детей, мг/дм³

Вещество	Группа наблюдения	Группа сравнения	Кратность различий с группой сравнения	Достоверность различий ($p \leq 0,05$)
	$M \pm m$	$M \pm m$		
Марганец	$0,029 \pm 0,002$	$0,013 \pm 0,005$	2,2	0,021
Медь	$1,357 \pm 0,024$	$0,969 \pm 0,021$	1,4	0,001
Формальдегид	$0,068 \pm 0,006$	$0,022 \pm 0,002$	3,1	0,000
Бензол	$0,0865 \pm 0,0016$	ниже предела обнаружения	-	0,000
Этилбензол	$0,0174 \pm 0,001$	-/-	-	0,416
О-ксилол	$0,0794 \pm 0,003$	-/-	-	0,000

Ведение информационной базы данных (более 1 млн. ед.инф.)

Количественная оценка экспозиции для установления связи «экспозиция – маркер экспозиции»

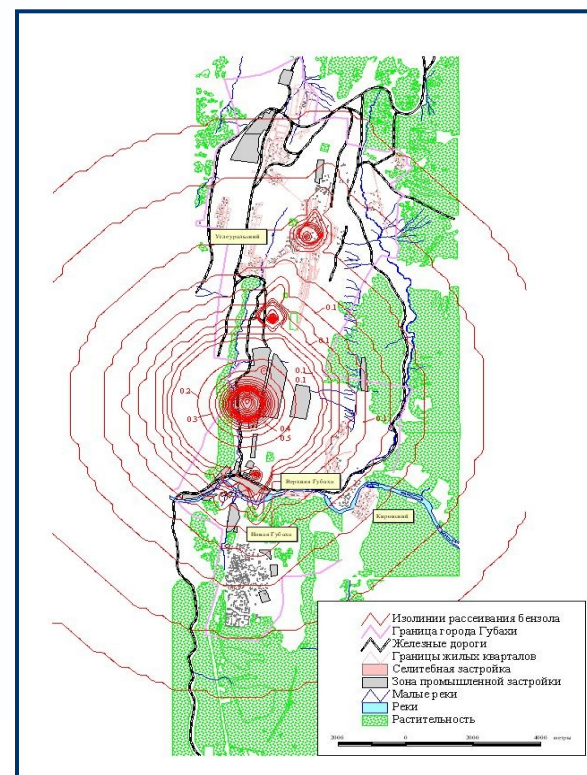
3. Выявление достоверной связи между уровнем приоритетных химических веществ в биосредах с уровнем экспозиции ($p \leq 0,05$)

❖ Количественная мера экспозиции - **потенциальная доза** с учетом сценария экспозиции (Руководство Р.2.1.10.1920-04)

Суммарная хроническая средняя суточная доза загрязнений с направленным действием на желудочно-кишечный тракт (дети)

Химический фактор	Доза, мг/(кг*сут)				Суммарная доза, мг/(кг*сут)	
	источники химического производства		источники металлургического производства		источники химического производства	источники металлургического производства
	с воздухом	с водой	с воздухом	с водой		
Марганец	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$1,72 \cdot 10^{-2}$	$1,16 \cdot 10^{-2}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$
Свинец	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$6,0 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	-	$7,0 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$
Хром	$1,0 \cdot 10^{-6}$	-	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$
Бензол	$1,1 \cdot 10^{-2}$	-	$4,4 \cdot 10^{-4}$	-	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$
Толуол	$9,8 \cdot 10^{-5}$	-	$6,7 \cdot 10^{-5}$	-	$9,8 \cdot 10^{-5}$	$6,7 \cdot 10^{-5}$
Фенол	$7,0 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	$7,0 \cdot 10^{-5}$	-
Метанол	$7,9 \cdot 10^{-4}$	-	-	-	$7,9 \cdot 10^{-4}$	-

Изолинии рассеивания метанола от источников выбросов

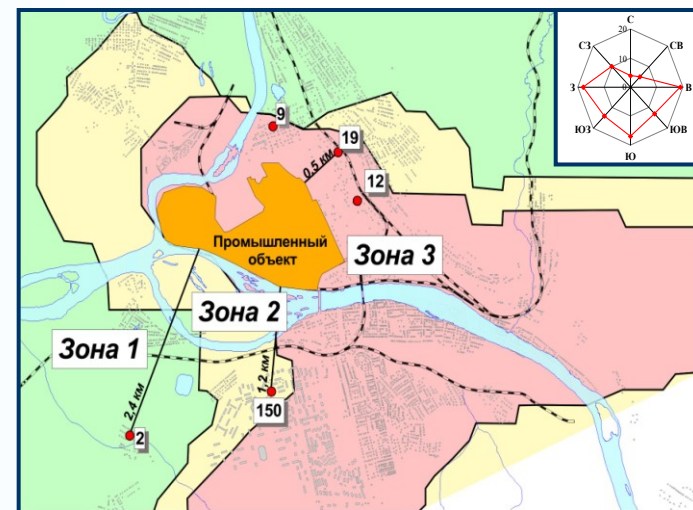


Количественная оценка экспозиции для установления связи «экспозиция – маркер экспозиции»

Суммарная хроническая средняя суточная доза формальдегида для детей в зоне влияния источников химического производства

Зона экспозиции	Доза, мг/(кг·сутки)		Суммарная доза, мг/(кг·сут)	Долевой вклад аэрогенного фактора, %
	атмосферный воздух	питьевая вода		
Отсутствие экспозиции	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$0,5 \cdot 10^{-5}$	$1,85 \cdot 10^{-4}$	72,6
1	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$5,9 \cdot 10^{-4}$	86,4
2	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	90,9
3	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-3}$	93,4

Зоны экспозиции формальдегида

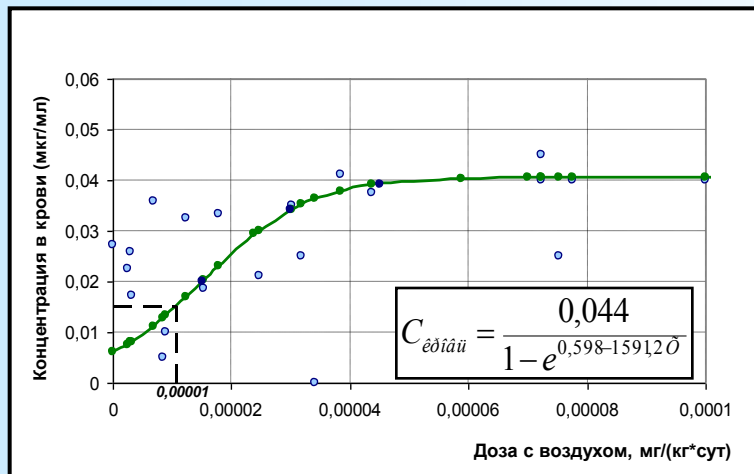


Критические органы и системы при ингаляционном поступлении формальдегида:

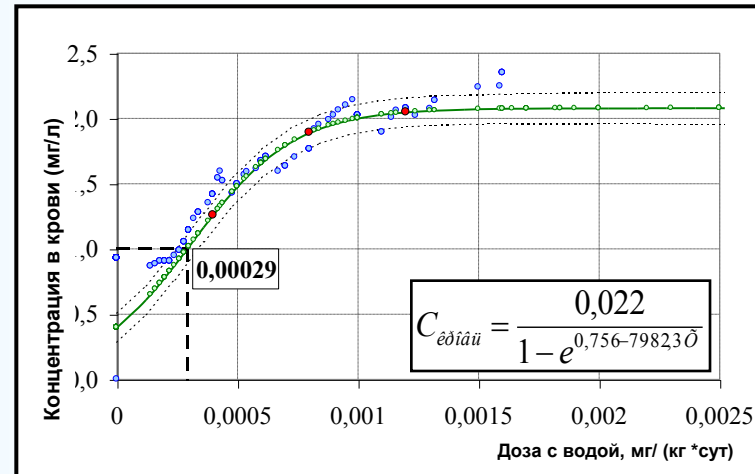
- Органы дыхания.
- Глаза.
- Иммунная (сенсibilизация).

Обоснование маркеров экспозиции

Зависимость концентрации формальдегида в крови от суммарной дозы хронической экспозиции ($R^2 = 0,64$, $p \leq 0,05$)



Зависимость концентрации марганца в крови от суммарной дозы хронической экспозиции ($R^2 = 0,55$, $p \leq 0,05$)



Факторы
экспозиции
атмосферного
воздуха

- марганец
- хром
- бензол
- формальдегид
- метанол

- марганец – в 2,4 - 3,5 раза выше Rfc
- хром – в 7- 8,5 раз выше Rfc
- бензол – 0,0012 - 0,01 мг/дм³
- формальдегид – 4 - 6 раз выше Rfc
- метанол – в 3,5 - 4,5 раза выше Rfc

Маркеры
экспозиции
в крови

Обоснование маркеров эффекта

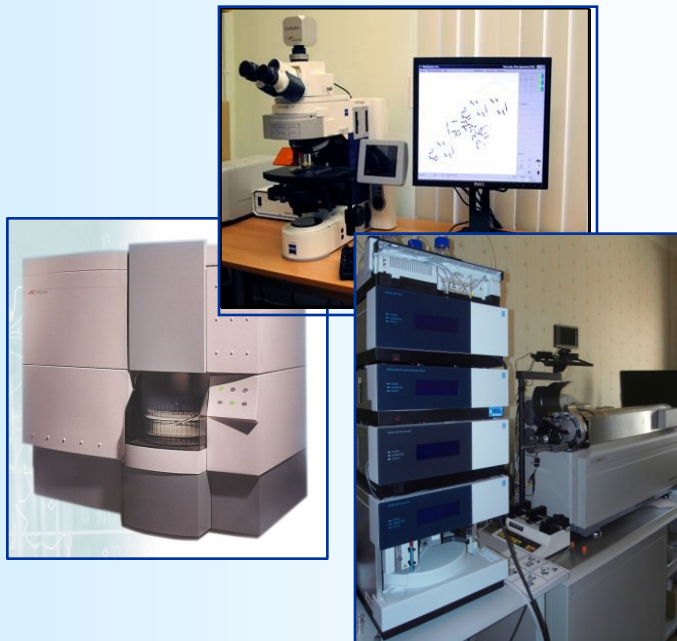
1. Исследование ответных реакций организма на повышенное содержание приоритетных веществ в биосредах, обусловленное экспозицией

❖ **Перечень показателей для исследования – базы данных ВОЗ, US EPA, ATSDR, АРИПС «Опасные вещества»**

Показатели ответа организма
на системном,
органо, клеточном,
молекулярном уровне

Методы аналитического исследования биосубстратов

Аналитическое оборудование экспертного класса



- **Электрофоретические**
- **Биохимические**
- **Иммуногенетические**
- **Молекулярно-цитогенетические**
- **Хромато-масс-спектрометрические**
- **Морфологические**

Принцип обоснования перечня диагностических показателей для исследований ответных реакций: адекватность характеру и уровню нагрузки



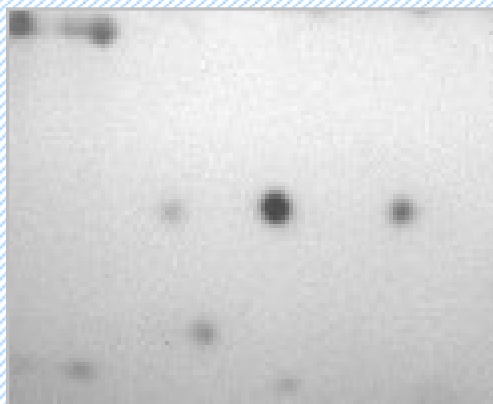
Технологии протеомного анализа – для задач обоснования принципиально новых маркеров эффекта

Факторы экспозиции – **металлы (Ni)**

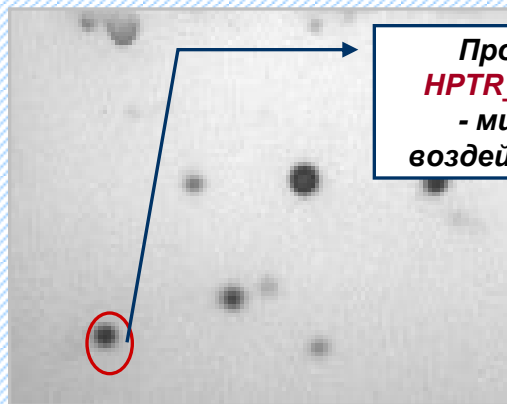
Молекулярный уровень

1. 2D электрофореграмма плазмы крови ребенка

2. Идентификация по масс-спектру



Вне зоны экспозиции:
Ni в крови на уровне 1 **RL**

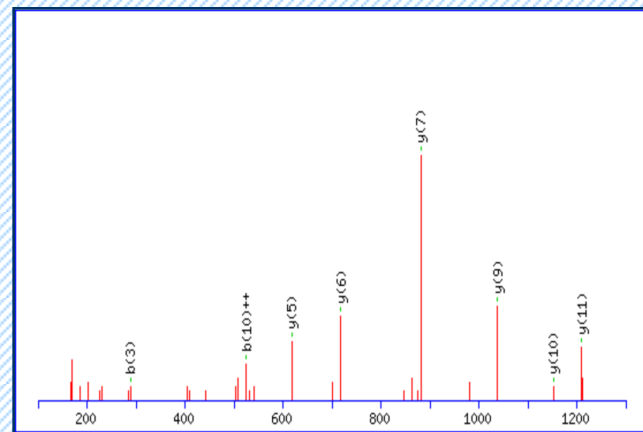
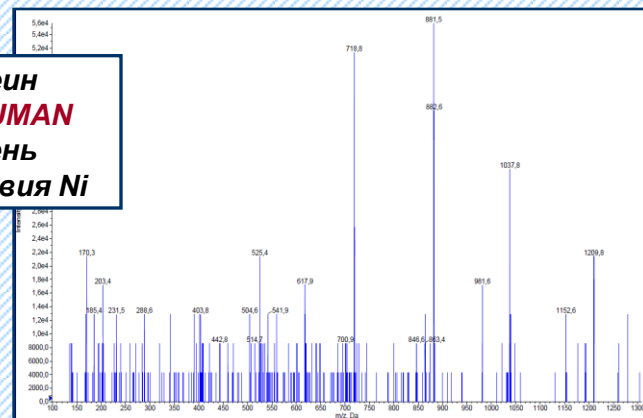


В зоне экспозиции: **Ni**
в крови на уровне 2 **RL**

Протеин
HPTP_HUMAN
- мишень
воздействия **Ni**

HPTP_HUMAN (гаптоглобин
связанный протеин)
обеспечивает нормальный
метаболизм гемоглобина

Нарушение
структуры и
функции
гемоглобина



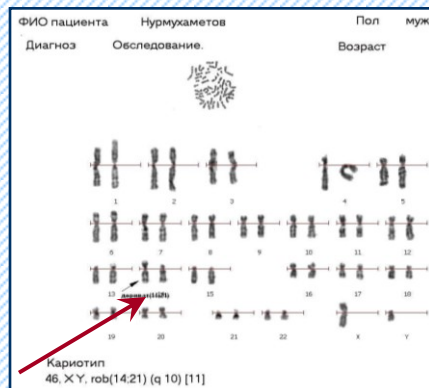
Технологии цитогенетического анализа – для задач обоснования маркеров эффекта в условиях воздействия химических мутагенов и репротоксикантов внешней и производственной среды

Факторы экспозиции - мутагены, репротоксиканты

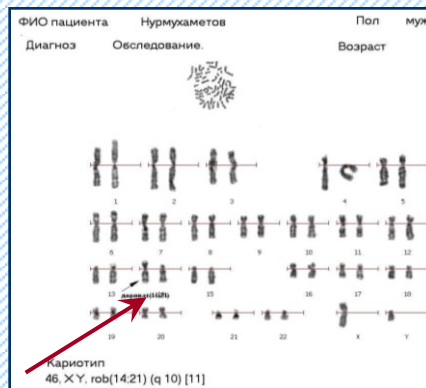
Клеточно-молекулярный уровень

Хромосомные аномалии

(химические факторы риска населенных мест OR >7 , факторы риска производства OR >10 : ВПР, бесплодие, невынашивание беременности)



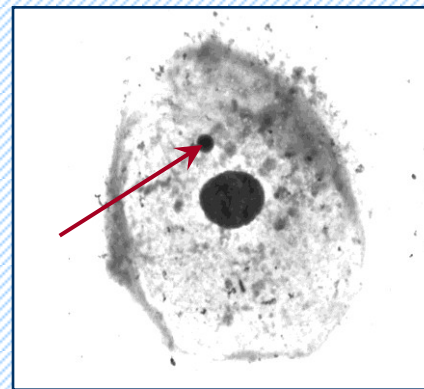
Мать – полиморфизм 14 и 21 хромосомы.
Формальдегид в крови – 10RL



Плод – хромосомная патология (синдром Дауна).
Формальдегид в крови – 5RL

Ядерные аномалии

(химические факторы риска населенных мест OR >5 , факторы риска производства OR >13)



Мать – микроядро.
Бензол в крови – 0,03 мг/дм³



Новорожденный – многоядерность клеток.
Бензол в крови – 0,02 мг/дм³

Выявление и оценка отклонений показателей ответа для задач обоснования маркеров эффекта

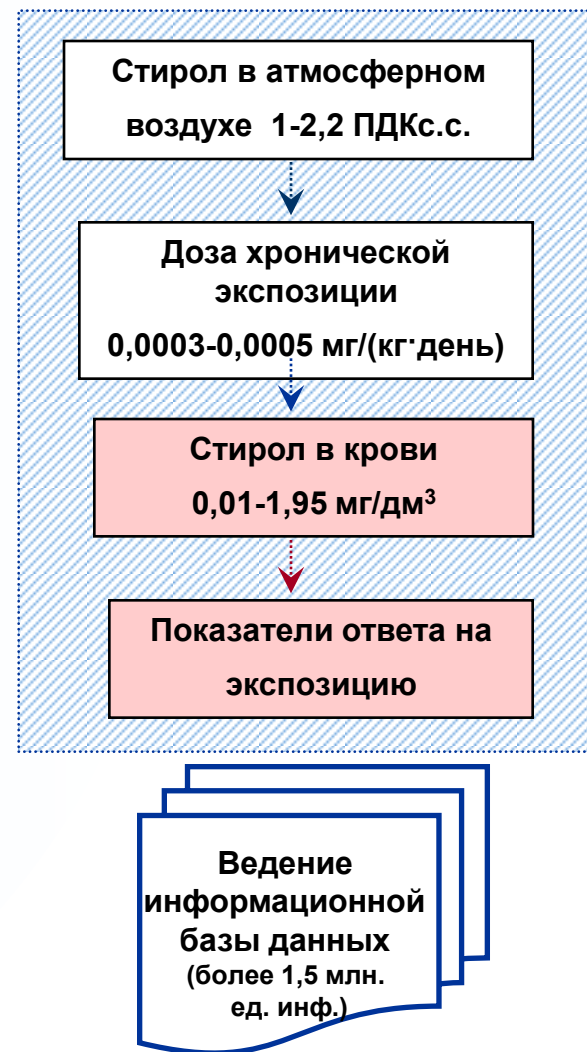
2. Формирования профиля приоритетных лабораторных показателей ответа

Критерии:

- ❖ достоверное различие значений показателя в группе наблюдения и сравнения $(M_n \pm m_n) > (M_k \pm m_k)$ ($p \leq 0,05$).
- ❖ направленность изменения показателя должна отражать характер воздействия химического вещества.

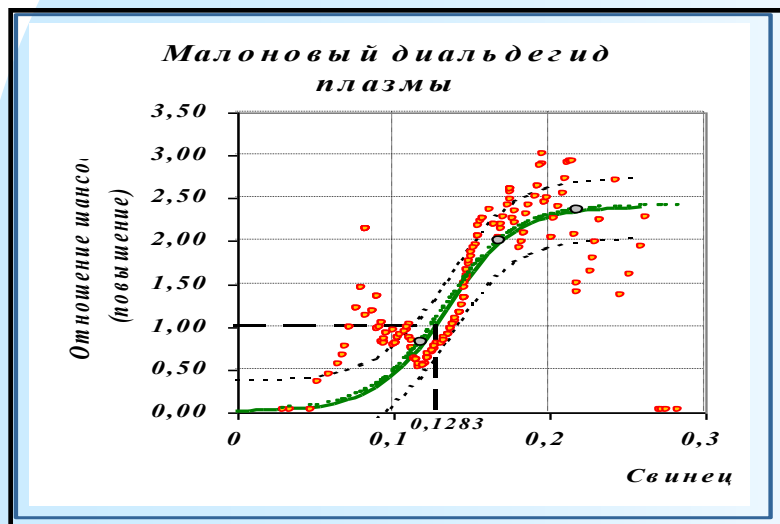
Перечень приоритетных показателей ответа у детей 4-7 лет в условиях экспозиции стирола ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показатель ответа	Группа наблюдения	Группа сравнения
Гематологические показатели		
Гемоглобин, г/дм ³	110,02±0,60	126,46±1,63
Лимфоциты, %	48,93±2,62	39,94±0,48
Биохимические показатели		
γ-глутамилтранспептидаза, Е/дм ³	33,94±4,66	17,51±0,73
Антиоксидантная активность, %	30,21±0,33	36,50±0,49
Гидроперекись липидов, мкмоль/дм ³	461,14±20,4	194,21±24,2
Цитогенетические показатели		
Микроядра	12,09±1,50	9,86±0,19
Ядерные протрузии типа «язык»	0,95±0,24	0,59±0,15

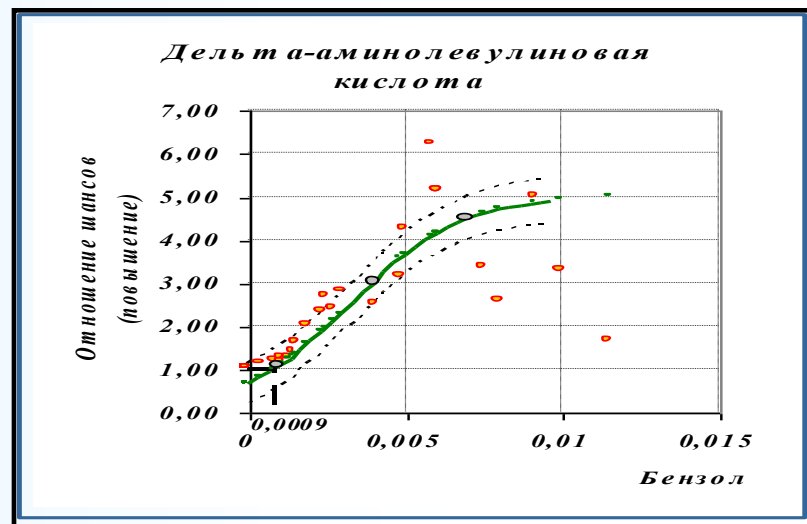


Установление и оценка причинно-следственных связей «маркер экспозиции – маркер ответа»

Зависимость «концентрации свинца в крови - уровень МДА в крови» при аэрогенной экспозиции



Зависимость «концентрация бензола в крови – уровень дельта-АЛК в моче» при аэрогенной экспозиции



Модели зависимости «маркер экспозиции марганца – маркер ответа» при пероральной экспозиции

Маркер экспозиции	Маркер ответа	b0	b1	R ²	F	P
Марганец	ГАМК ↑	-0,21 ± 0,02	5,24 ± 0,001	0,55	255,6	0,001
	Глутамат ↓	0,92 ± 0,05	31,03 ± 0,50	0,69	206,8	0,000
	Ca ²⁺ ↓	-7,66 ± 0,01	99,12 ± 0,05	0,48	178,4	0,001

Обоснованы маркеры эффекта для доказательства причинно-следственных связей



Расширение методов оценки ответа организма на воздействие химических факторов в микро- и нанодиапазоне в условиях токсикологического эксперимента

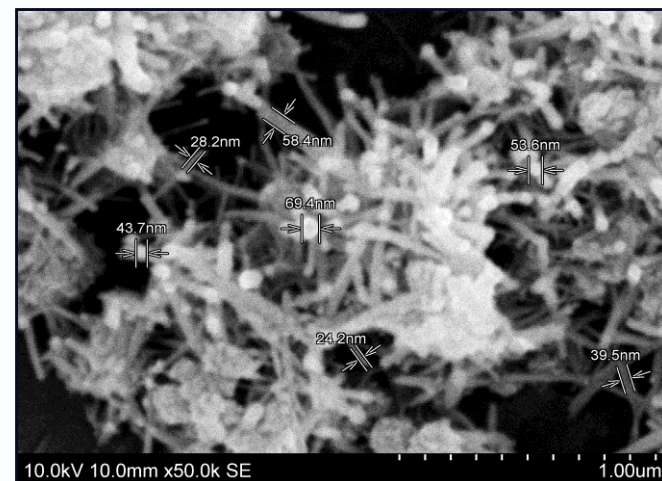
Направления исследований

- моделирование воздействия наноматериалов при ингаляционном, пероральном с питьевой водой, перкутанном путях поступления (**нанодисперсный оксид Mn, диоксид Si, кластерное серебро «Арговит»**),
- отработка методических подходов к обоснованию маркеров негативных эффектов и мишеней воздействия наночастиц,
- разработка методов идентификации наноматериалов в объектах среды обитания (атмосферном воздухе, воде) и в бисредах (крови).

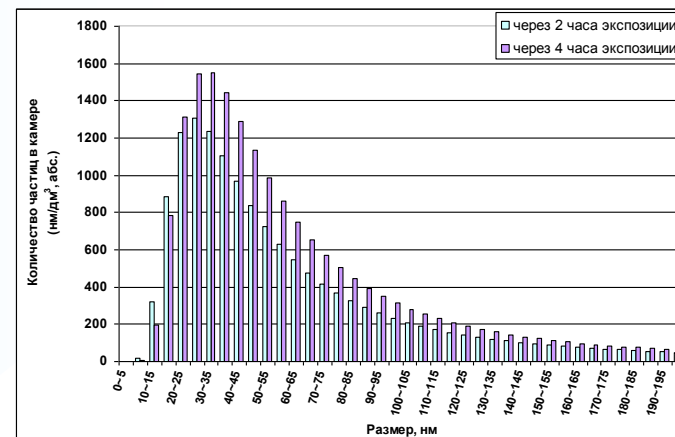
Применение результатов

- обоснование ГН содержания наноматериалов в объектах среды обитания (**2 ОБУВ в атмосферном воздухе и 2 ОДУ в воде водоемов нанодисперсного оксида Mn и оксида Si**),
- идентификация наночастиц в крови и маркеров негативных эффектов у населения и работающих, обусловленных воздействием наноматериалов.

Нанодисперсный оксид марганца
(электронная микроскопия)

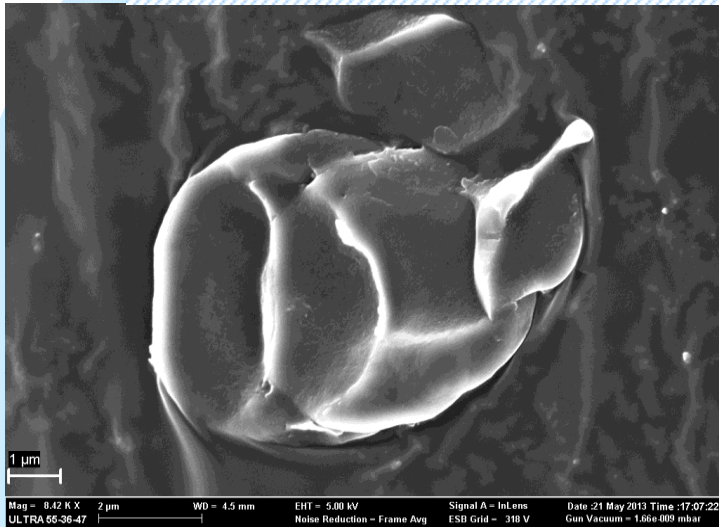


3D-конфигурация частиц
нанодисперсного оксида марганца

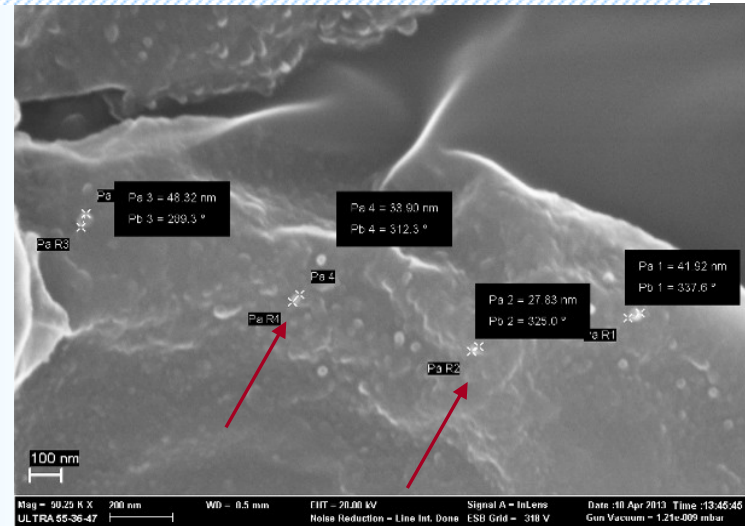


Идентификация наночастиц в крови в условиях токсикологического эксперимента

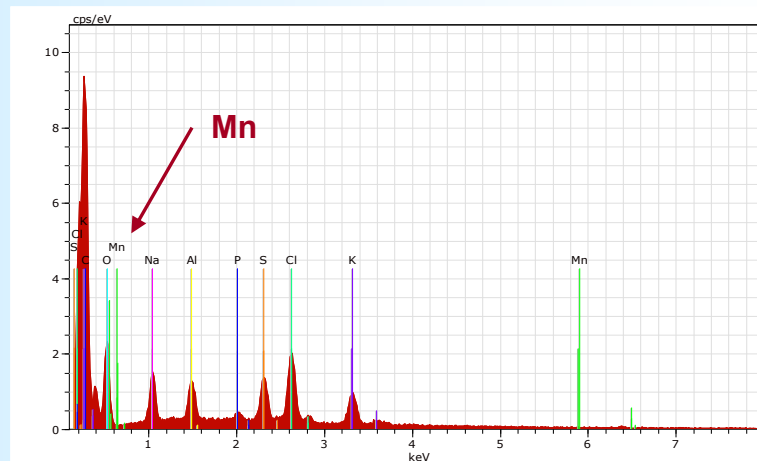
Электронный снимок крови экспериментального животного (крыса)



Контроль (ув. 25000)



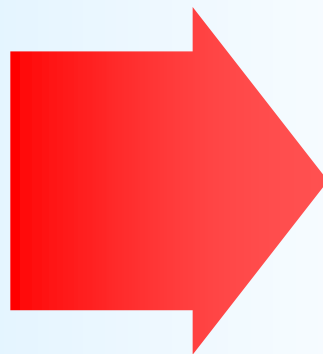
Опыт: нанодисперсный оксид Mn, доза 257 мг/кг (ув. 10000)



Рентгеноспектрограмма образца крови

Внедрено в практику гигиенических исследований и экспертиз

- **25 маркеров** эффекта для ранней диагностики
- **30 критериев** для биомониторинга
- **50 критериев фоновых уровней** маркеров эффекта
- **20 биомаркеров** для оценки эффективности профилактики



Причинно-следственные
связи в системе
«среда - здоровье»



Доказательство причинения
вреда здоровью

Благодарю за внимание !