

Особенности запрограммированной клеточной гибели в условиях воздействия техногенных химических факторов

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

Актуальность

- Проблема иммуноопосредованных нарушений здоровья является актуальной для всех регионов России, где население проживает и работает в условиях экспозиции химических веществ, обладающих иммунотоксическим действием



Актуальность

- Актуальным является выделение маркерных показателей изменения иммунного статуса, которые могут быть использованы в качестве ранних индикаторов нарушения гомеостаза и диагностических критериев, отражающих характер и степень техногенной нагрузки



Цель

- Идентификация иммунных и иммуногенетических маркеров повышенной контаминантной нагрузки биосред техногенными химическими факторами



Направления

- иммуногенетические исследования с использованием метода качественной и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени – ДНК-диагностика генного полиморфизма (термоциклер CFX96 «Биорад», США)
- клеточные технологии на основе метода проточной цитофлюориметрии - фенотипирование лимфоцитов (проточный цитометр FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson», USA)
- аллергодиагностика с использованием технологии аллергосорбентного теста - определение специфических IgE к профессиональным аллергенам (хром, никель, марганец, формальдегид), специфических IgG к бенз(а)пирену, ванадию, стронцию
- Иммуно-нейро-эндокринная регуляция (ИЛ1-бета, ИЛ - 4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ-гамма, альфа-ФНО, p53, bcl2, FOXp3, АКТГ, серотонин, лейкотриены и др.)

Иммуногенетические исследования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- Диагностика генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях воздействия химических факторов (подсемейство CYP 1A1,1B1, CYP2D6, TNF, HLA-DR)



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).

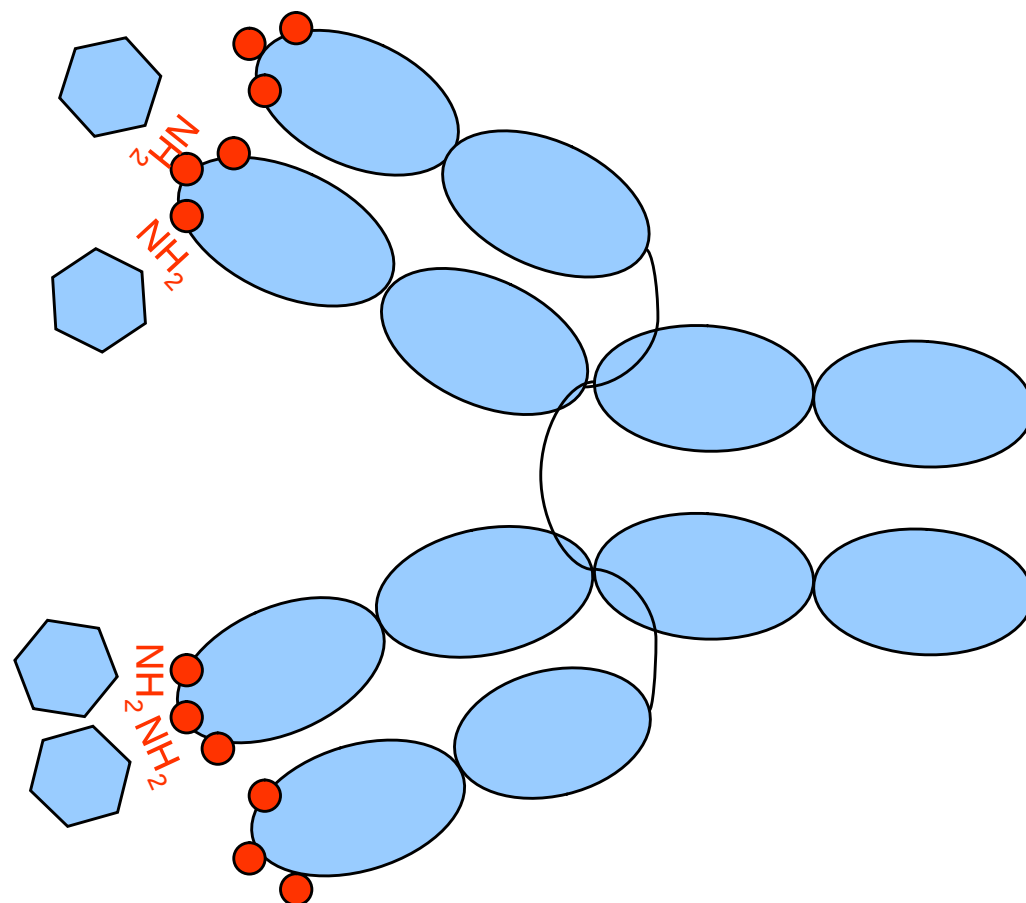


BD FACSCalibur

Аллергодиагностика с использованием белково-полисахаридного диагностикума



Механизм инициации гаптеном реакции гиперчувствительности немедленного типа



Вещества, вызывающие выработку специфического IgE

Входящие в список
профессиональных аллергенов

Хром

Никель

Марганец

Кобальт

Формальдегид



Не входящие в список
профессиональных аллергенов

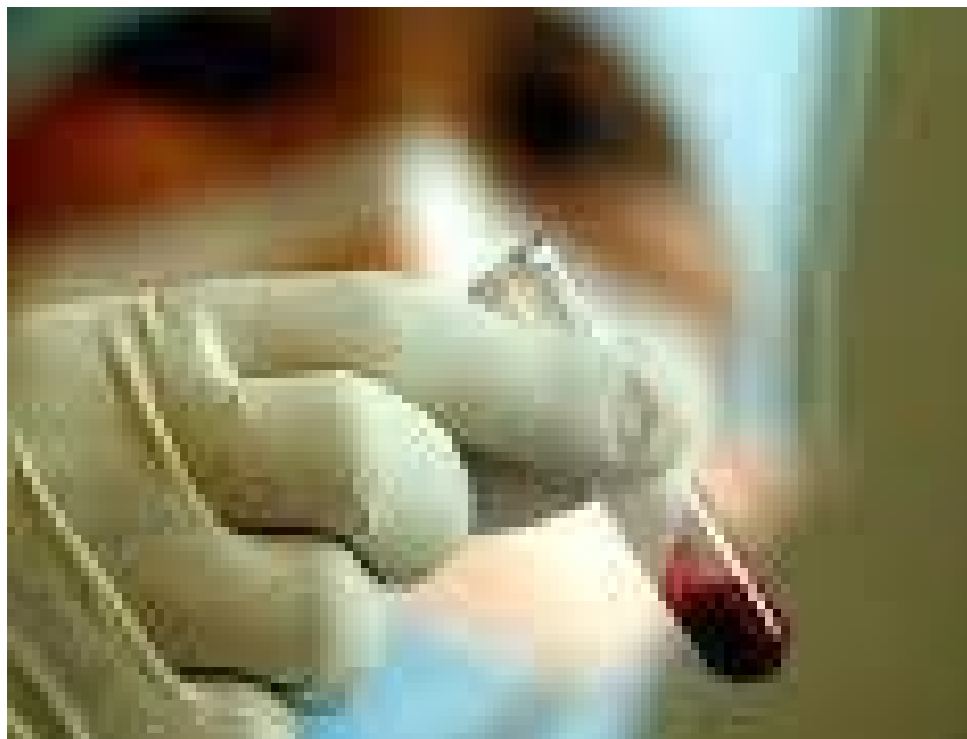
Бензол

Дихлорэтан

Свинец

Фенол

Маркеры эффекта



Объекты исследования

- Исследования выполнены на примере детского населения Пермского края на территориях с различным уровнем воздействия промышленных химических факторов (274 ребенка в возрасте 4 – 9 лет с территории с высоким уровнем техногенного воздействия) и когорты работающих в условиях профессиональных вредностей (176 человек в возрасте 20 – 60 лет – изолировщики на химическом производстве)



Содержание низкомолекулярных химических соединений в крови работающих в условиях производства

(* - разница достоверна по сравнению с группой контроля, $p < 0,05$)

Показатели	Контроль ($n=39$) $M \pm m$	Основная группа ($n=110$), $M \pm m$
Стронций	$0,017 \pm 0,004$	$0,0350 \pm 0,008$
Никель	$0,127 \pm 0,02$	$0,152 \pm 0,006$
Марганец	$0,0204 \pm 0,003$	$0,0240 \pm 0,001$
Фенол	$0,0531 \pm 0,002$	$0,0710 \pm 0,004$
О-крезол	0 ± 0	$0,0005 \pm 0,0003$
М-крезол	0 ± 0	$0,0062 \pm 0,002^*$
П-крезол	0 ± 0	$0,0040 \pm 0,0007^*$

Результаты генотипирования

ген	генотип	Контрольная группа	Основная группа	Группа сравнения
	N=	33	110	66
CPOX	CC	3% (1)	5% (5)	3% (2)
	AC	21% (7)	30% (33)	23% (15)
	AA	79% (25)	65% (72)	74% (49)
	C	10 %	20 %	14 %
	A	90 %	80 %	86 %
TNF	AA	0% (0)	3% (3)	5% (3)
	AG	6% (2)	24% (26)	12% (8)
	GG	94% (31)	73% (81)	83% (55)
	A	3 %	14 %	11 %
	G	97 %	86 %	89 %

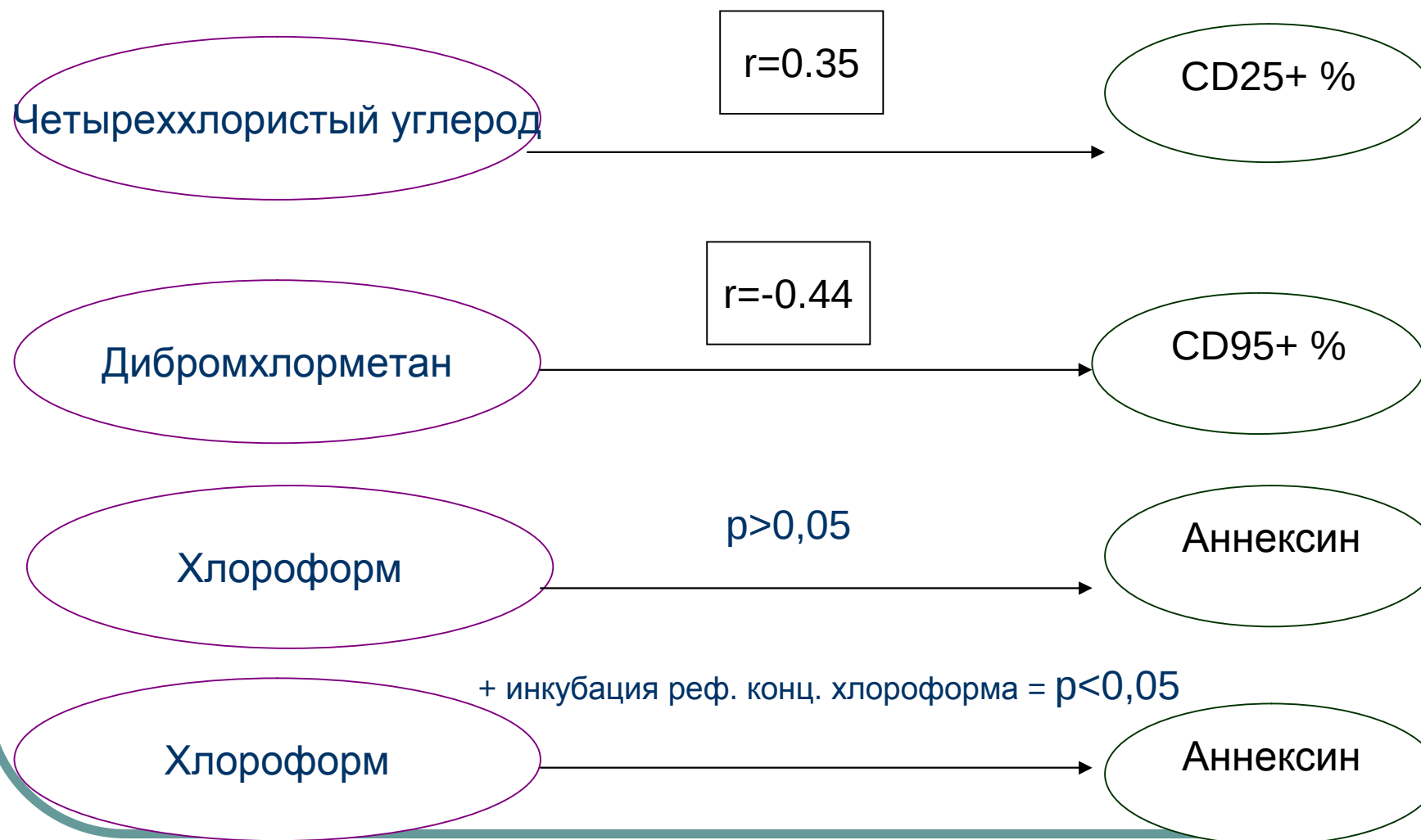
Иммунный профиль работающих

Показатели	Группа контроля (n=39), $M \pm m$	Основная группа (n=110), $M \pm m$
CD3 ⁺ , %	73,00 ± 1,16	68,19±0,67*
CD4 ⁺ , %	43,10 ± 0,90	39,32±0,89*
CD19 ⁺ , %	9,39 ± 0,48	11,08±0,41*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	14,46 ± 1,22	12,54±0,51*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	7,82±0,39	11,33±0,33*
CD95 ⁺ , %	35,14±1,55	31,34±0,77
CD4 ⁺ CD25 ⁺ 127 ⁻ , %	0,55±0,06	0,81±0,05*
CD4 ⁺ 127 ⁻ , %	1,26±0,11	2,16±0,11*
p53	3,42±0,29	1,44±0,11*
TNFR	3,31±0,27	1,39±0,11*
Annexin V-FITC ⁺ PI ⁻ , %	4,77±0,42	2,17±0,09*
Annexin V-FITC ⁺ PI ⁺ , %	13,06±1,17	7,69±0,25*

Содержание и распространенность IgG специфического к бенз(а)пирену в крови детей (n=240)

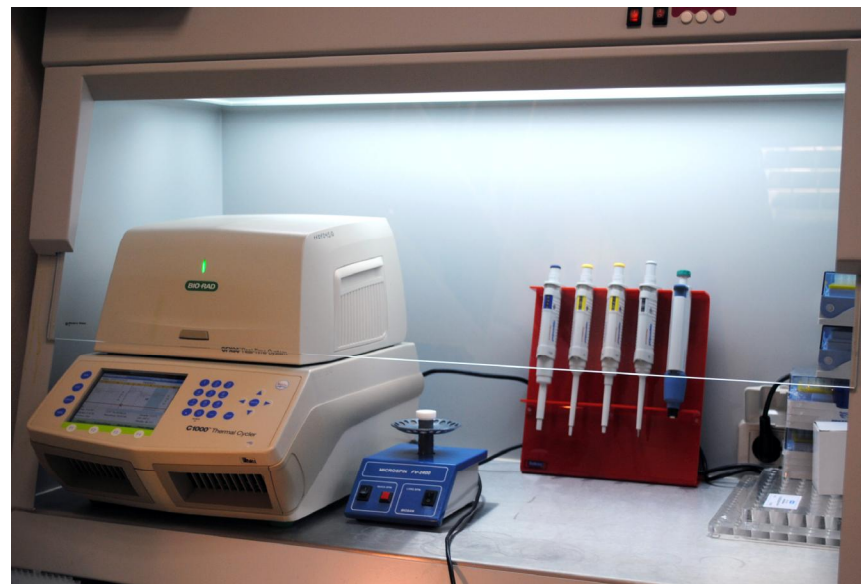
Показатель	Контроль (y.e)	Основная группа (y.e.)	Обследуемые с повышенным уровнем IgGспец
IgG _{спец.} К бенз(а)пирену	0,078(±0,007)	0,541 (±0,019)	54,0%

Примеры достоверных зависимостей активационных маркеров от уровня техногенной контаминации у детей ($p < 0,05$)



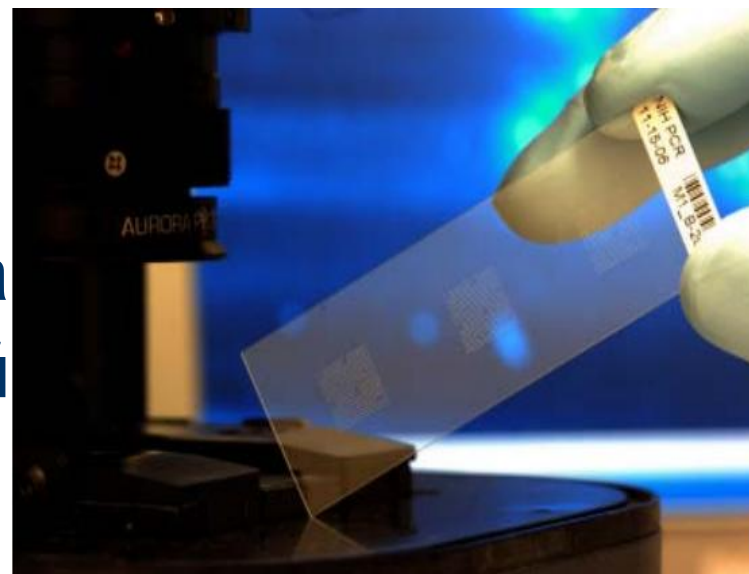
Обсуждение результатов

- Анализ результатов изучения полиморфизма генов выявил его патологическое разнообразие в отношении генов детоксикации CYP 1A1 и CYP2D6 и гена ФНО, а также его ассоциацию с иммунологическими нарушениями и контаминацией биосред гаптенами



Обсуждение результатов

- I Замедление аннексин- и TNF-индуцированного апоптоза, дефицит содержания транскрипционного фактора p53 в условиях повышенной контаминантной нагрузки изменяет ритмичность клеточного цикла, что ведет к старению клетки и ее малигнизации



Резюме

- Молекулярно-генетическая и клеточная диагностика позволит заглянуть в индивидуальную программу жизни человека, наметить его профессиональный маршрут, увидеть предрасположенность к одним заболеваниям и устойчивость к другим, будет надежным инструментом социально-гигиенического мониторинга и оценки риска

Ближайшие перспективы развития направлений

- Разработка элементов генетической паспортизации на основе изучения генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях воздействия конкретных химических факторов
- Идентификация специфических антител к расширенному перечню токсикантов-аллергенов
- Сортировка, культивирование и использование стволовых клеток для идентификации эффектов низкомолекулярных гаптенaв in vitro

Благодарю за внимание

