XV Российский Национальный Конгресс с международным участием
«ПРОФЕССИЯ и ЗДОРОВЬЕ»
г. Самара
24-27 сентября 2019 года

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРУДА ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.Ф. ИЗМЕРОВА»

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ВОЗДЕЙСТВИЮ СВИНЦА

Хотулева А.Г., Кузьмина Л.П., Коляскина М.М.

Лаборатория медико-биологических исследований

Актуальность

- Проблема неблагоприятного влияния свинца на здоровье человека имеет многолетнюю историю изучения. Актуальность проблемы сохраняется в настоящее время, т.к. свинец относится к наиболее распространенным экотоксикантам в биосфере.
- ВОЗ назвала свинец одним из 10 химических веществ, вызывающих основную обеспокоенность в области общественного здравоохранения.
- По своему токсическому действию свинец и его соединения относятся к **политропным ядам**, поражают *систему крови, нервную систему, сердечно-сосудистую систему, внутренние органы (желудочно-кишечный тракт, печень, почки), репродуктивную, эндокринную, иммунную системы; по данным МАИР неорганические соединения свинца отнесены к потенциальным канцерогенам для человека (группа 2А).*
- Особую роль проблема воздействия свинца на организм приобретает в медицине труда, т.к. при отсутствии первичных источников получения свинца в России распространены предприятия по вторичной переплавке свинецсодержащих изделий (прежде всего «свинцовых аккумуляторов»).

Информативность различных лабораторных показателей при оценке воздействия свинца

Показатель	Пригодность для использования при биологическом мониторинге
Свинец в крови	Лучший показатель концентрации свинца в мягких тканях и недавнего воздействия («метаболически активная фракция»).
Свинец в моче	Отражает текущее количество абсорбированного свинца. Определяется функциональной способностью почек.
Свинец в кале	Показатель потребленного свинца с пищей, практически не применяется при мониторинге.
Свинец в волосах	Сложности в отборе, приготовлении образцов, интерпретации. Имеет резко ограниченный интерес при оценке профессиональных воздействий.
Копропорфирин в моче	Неспецифический показатель, не рекомендуется при мониторинге.
Аминолевулиновая кислота (δ-АЛК) в моче	Биологический тест, используемый для мониторинга лиц, подвергающихся воздействию свинца в условиях производства.
Дегидратаза δ-АЛК в эритроцитах	Высокочувствительный показатель, но из-за нестабильных пределов бесполезен при мониторинге.
Свободный протопорфирин и цинк протопорфирин в клетках красной крови	Полезный тест при оценке биологических эффектов, связанных с воздействием свинца. Рекомендуется для скрининговых исследований в профессиональной медицине и при оценке воздействий, связанных с окружающей средой. Представляет интерес как при индивидуальном, так и при коллективном мониторинге.
Пиримидин-5'нуклеотидаза в клетках красной крови	Практически не применяется в медицине труда.
Свинец в костях	Признак, не пригодный для мониторинга текущих воздействий, но может быть очень полезным в качестве составляющей при клинической оценке длительных экспозиций.

(Павловская Н.А. и соавт., 2002)

Медико-биологический мониторинг воздействия свинца на организм работающих

Лабораторные исследования при проведении медицинских осмотров работающих в контакте со свинцом и его неорганическими соединениями в рамках Приказа №302н

- Клинический анализ крови
- Ретикулоциты
- Базофильная зернистость эритроцитов
- АЛК или копропорфирин в моче
- * Свинец в крови

- Биологический мониторинг воздействия свинца на организм должен включать не только определение свинца в биологических средах (биомаркер экспозиции), но и мониторинг биологического эффекта.
- Изолированная оценка содержания свинца в крови не позволяет судить о биологическом эффекте свинца на организм, учитывая индивидуальный биохимический профиль каждого человека. Даже при уровне свинца в крови в пределах референтных значений могут наблюдаться лабораторные признаки нарушения порфиринового обмена.
- Индивидуальная чувствительность к воздействию свинца может быть связана с генетически детерминированными особенностями метаболизма.

Ретикулоцитарные показатели

Современные гематологические анализаторы позволяют определять как абсолютное и относительное **количество ретикулоцитов**, так и их **степень дифференцировки**, основанную на степени зрелости и, соответственно, содержании нуклеиновых кислот, что является **отражением гемопоэтической активности костного мозга.**

LFR% (low fluorescence reticulocyte fractions) – ретикулоциты с низким содержанием нуклеиновых кислот, **наиболее зрелые**

MFR% (medium fluorescence reticulocyte fractions) – ретикулоциты со средним содержанием нуклеиновых кислот

HFR% (high fluorescence reticulocyte fractions) – ретикулоциты с высоким содержанием нуклеиновых кислот, **наиболее незрелые**

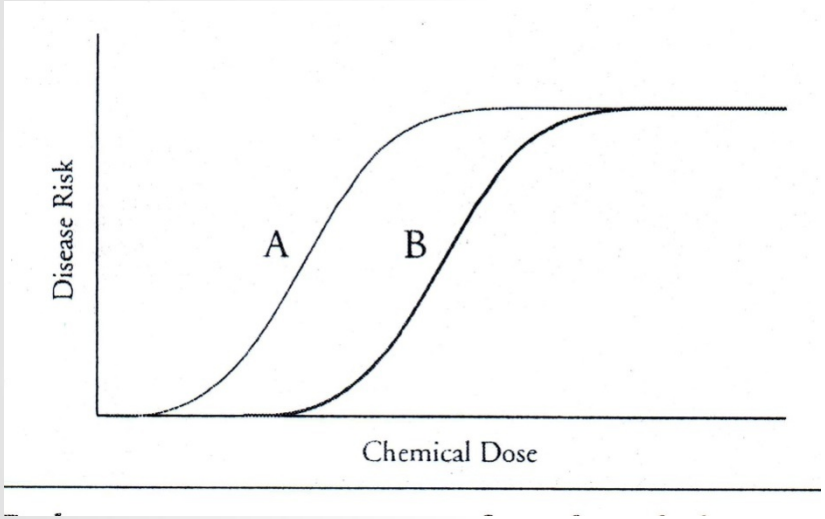
IRF% (immature reticulocyte fraction, незрелая фракция ретикулоцитов) – является суммой фракций MFR% и HRF%

Процент незрелых ретикулоцитов (HFR) коррелирует с уровнем свинца крови ($r=0,265$, $p<0,05$)

- Показатель фракции незрелых ретикулоцитов свидетельствует об ускоренном выбросе незрелых клеток из костного мозга.
- При хроническом воздействии свинца ↑ **процент незрелых ретикулоцитов** и ↓ **процент зрелых ретикулоцитов**, что происходит раньше, чем изменение количества ретикулоцитов.
- Показатель, отражающий содержание фракции незрелых ретикулоцитов, может служить ранним признаком токсического воздействия свинца на эритропоэз.

Генетический полиморфизм, ассоциированный с дифференциальной восприимчивостью к воздействию химических факторов

Риск патологии с учетом генетической предрасположенности



При средних концентрациях воздействующего вещества риск патологии выше у лиц с генотипом А по сравнению с лицами с генотипом В. (Goodman J.E., 2009)

Возможности применения генетических исследований

- Оценка риска развития профессиональной и производственно обусловленной патологии с учетом индивидуальных особенностей метаболических процессов
- Оптимизация профилактических и диагностических мероприятий в группах высокого риска развития патологии

Для оценки индивидуальной чувствительности к воздействию свинца необходимо учитывать генетическую полиморфность белков, участвующих в процессах абсорбции свинца и способных потенцировать токсическое действие металла.

Ген дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты (ALAD)

- **Фенотипы ALAD 2-2 и ALAD 1-2 гена дегидратазы δ-АЛК характеризуются:**
- достоверно более высокой концентрацией свинца в крови по сравнению с формой ALAD 1-1;
- достоверно более высокой концентрацией свинца в надкостнице и в трабекулах костей;
- субъединица ALAD 2 связывает свинец более эффективно в связи с высокой кинетической активностью.

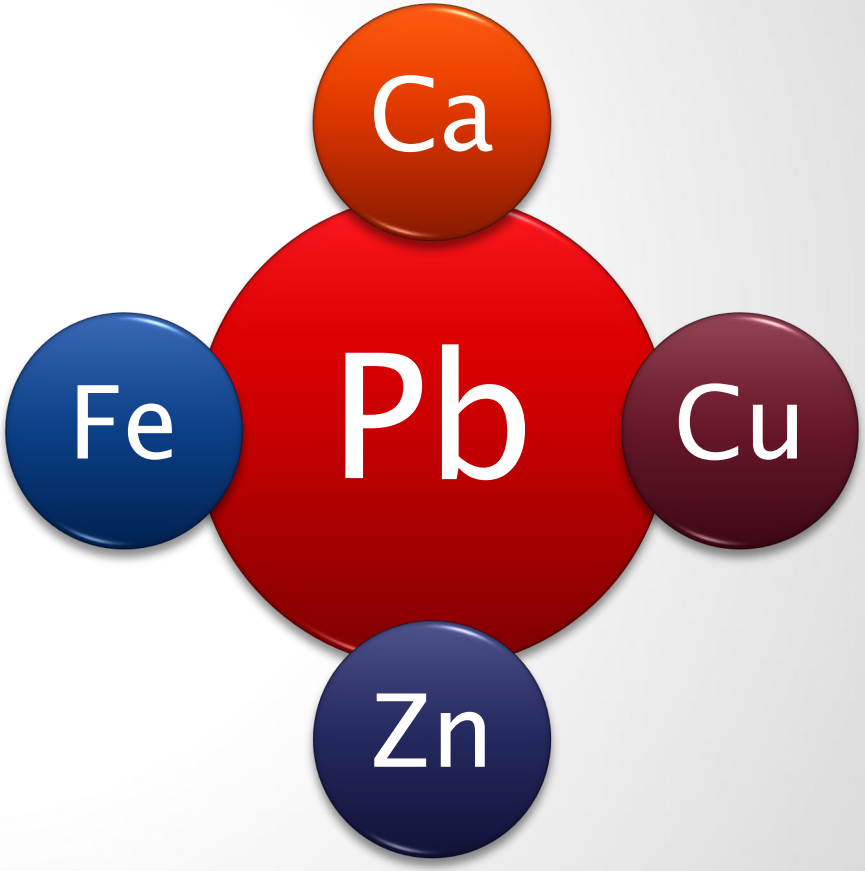
Таким образом, лица с ALAD 2 являются более чувствительными к воздействию свинца.

(По данным Astrin K.H., Bellinger D., 1987г., Ziemsen B., 1986г.)

Механизм нарушений синтеза гема при воздействии свинца

Свинец и микроэлементный гомеостаз

- При комбинированном действии свинца с другими металлами необходимо учитывать сложные взаимосвязи микроэлементов в организме. В первую очередь это касается сопряженных пар: Pb – Fe; Pb – Ca; Pb – Cu; Pb – Zn и других.
- Учитывая взаимосвязи между транспортом свинца и другими металлами, нарушения микроэлементного баланса и генетически детерминированные особенности белков-транспортеров могут способствовать накоплению свинца в организме.



Исследования по изучению ассоциаций генетических полиморфизмов со степенью воздействия свинца на организм

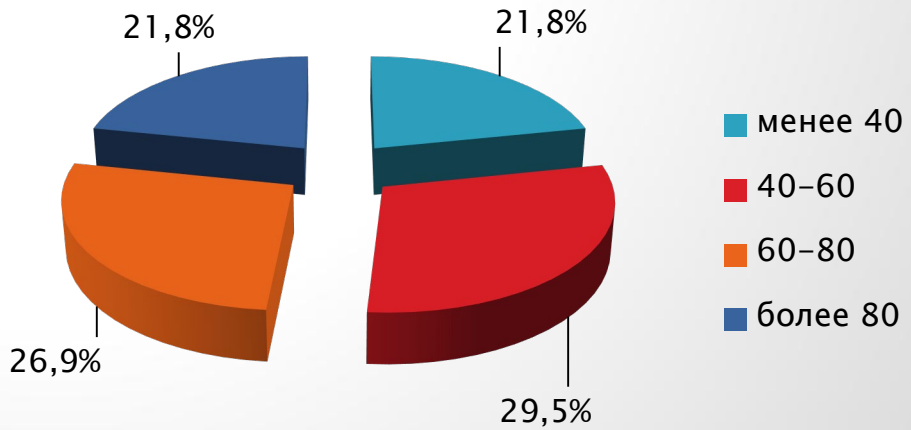
Полиморфизм гена		Результаты
ALAD rs1800435 (биосинтез гема)		Ассоциация с риском развития артериальной гипертензии (Scinicariello F. et al, 2010)
GSTT1	антиокси-дантная защита	Ассоциация с риском свинец-ассоциированной гипертензии (OR=1,593; 95%CI-1,157-2,194) (Lee B.K. et al, 2012)
GSTM1		Ассоциация с чувствительностью к воздействию свинца с повышением С-реактивного белка (Sirivarasai J. et al, 2013)
MT2A rs28366003	металлотионеины – белки, связывающие тяжелые металлы	Ассоциация с уровнем свинца в крови (Kayaalti Z. et al, 2011)
MT4 rs396230		Ассоциация с уровнем систолического АД и показателями функции почек (Chen H.I. et al, 2010)
TFC2 rs861539 (транспортер иона железа)		Ассоциация с более значимым снижением IQ в зависимости от уровня свинца в крови (Park S.K. et al, 2009)

Материал исследования

- 102 мужчины в возрасте 41,1±9,5 лет, работающие на предприятии по переплавке свинцовых отходов (70% – свинцовые аккумуляторы), со стажем работы от 2 до 6 лет.
- Основные профессиональные группы: плавильщики, сварщики, шихтовщики, дробильщики, мастера цехов и др.

➢ По результатам оценки воздушной среды основных цехов содержание свинца в воздухе рабочей зоны превышало ПДК от 4 до 6 раз (0,2–0,3 мг/м^3).

Распределение обследованных лиц, работающих в контакте со свинцом, по уровню свинца в крови (мкг/дл)



Исследованные однонуклеотидные полиморфизмы

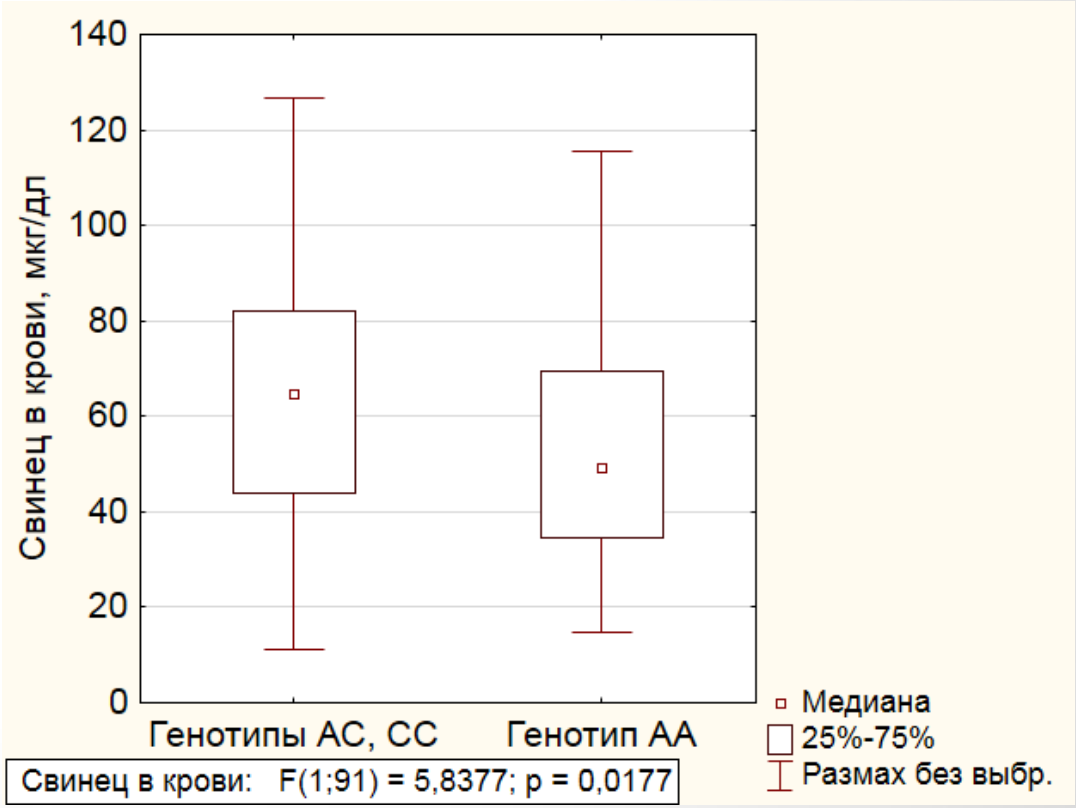
Ген	Полиморфизм	Функции
Ферменты, участвующие в синтезе гема		
CPOX (копропорфириноген оксидаза)	A/C rs1131857	Фермент синтеза гема, осуществляет образование протопорфириногена из копропорфириногена
Белки-регуляторы обмена железа		
HFE (белок, ассоциированный с развитием гемохроматоза)	H63A rs1799945	Регулятор абсорбции железа, влияет на синтез белка гепсидина – главного регулятора обмена железа
	C282Y rs1800562	
Белки-регуляторы обмена кальция		
VDR (рецептор витамина D)	A/G rs10735810	Посредник в передаче биологического действия кальцитриола — активной формы витамина D, которой принадлежит ключевая роль в метаболизме костной ткани
CALCR (рецептор кальцитонина)	Pro447Leu rs1801197	Посредник в передаче биологического действия гормона щитовидной железы, регулирующего обмен кальция
Система антиоксидантной защиты		
SOD2 (митохондриальная супероксиддисмутаза)	C47T rs4880	Защита тканей от оксидативного стресса, катализирует превращение супероксидного радикала в пероксид водорода
GSTP1 (глутатион-S-трансфераза P)	Ile105Val rs1695	Детоксикация, катализирует реакцию глутатиона с различными радикалами экзогенных повреждающих веществ

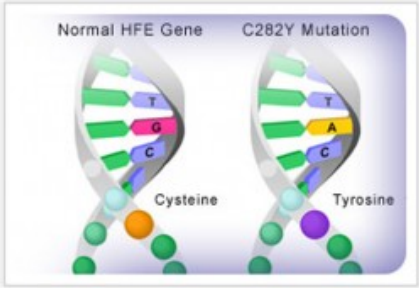
Ген копропорфириноген оксидазы (CPOX)

- **Копропорфириноген оксидаза** – шестой фермент в цепи синтеза гема, ингибируется свинцом.

- Наличие неблагоприятной С аллели гена CPOX ассоциировано с повышением уровня железа в сыворотке крови γ=0,269, p=0,009, что может свидетельствовать о накоплении железа в связи с блокированием синтеза гема.

Уровни свинца в крови обследованных рабочих в зависимости от генотипа CPOX

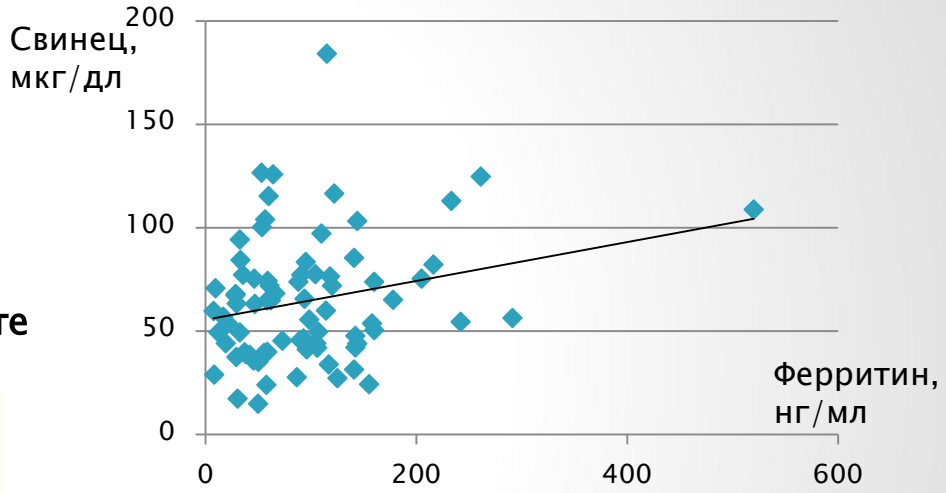




Ген гемохроматоза (HFE)

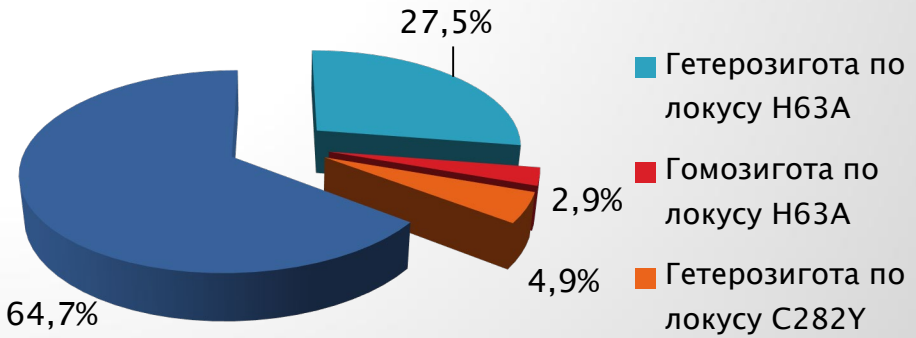
- Одним из регуляторов абсорбции железа является HFE-белок, при полиморфизме гена которого, ассоциированного с гемохроматозом, функция белка нарушается и происходит избыточная абсорбция железа.
- Наличие данного полиморфизма может модифицировать абсорбцию и других металлов, в том числе и свинца.

Корреляция уровней свинца в крови и ферритина (r=0,246, p<0,05)



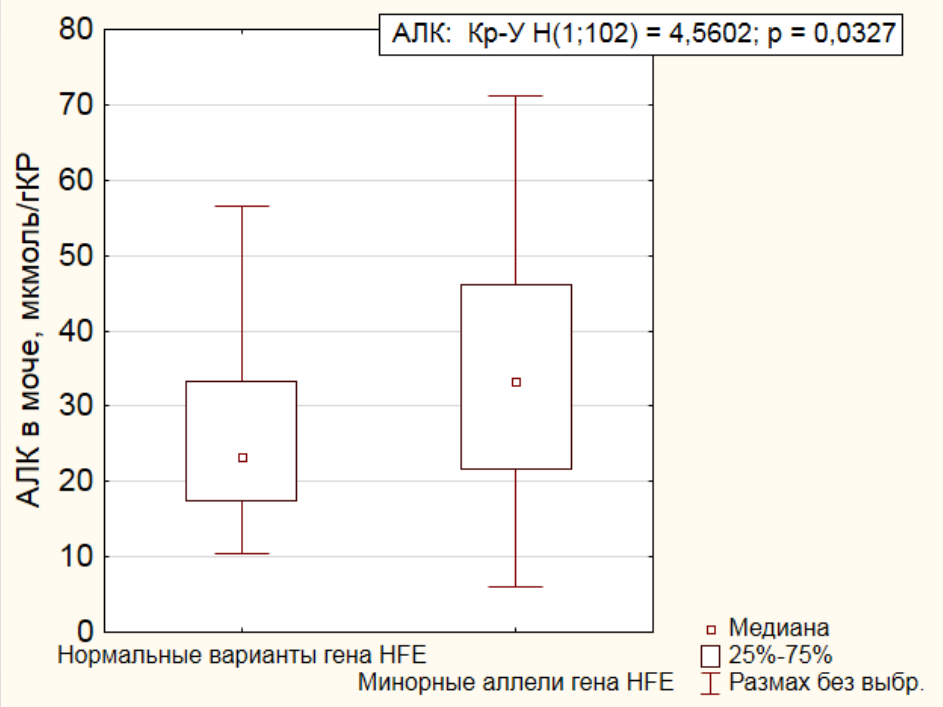
Уровни железа в крови у работающих в контакте со свинцом в зависимости от генотипа HFE

Распределение работающих в контакте со свинцом по генотипам HFE

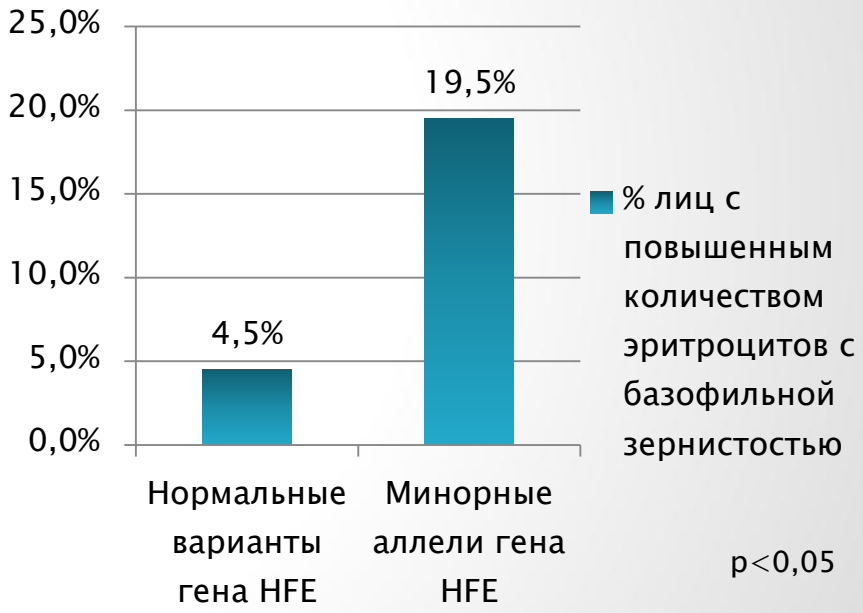


Ген HFE-белка и биомаркеры эффекта при воздействии свинца

Уровни АЛК в моче у работающих в контакте со свинцом в зависимости от генотипа HFE

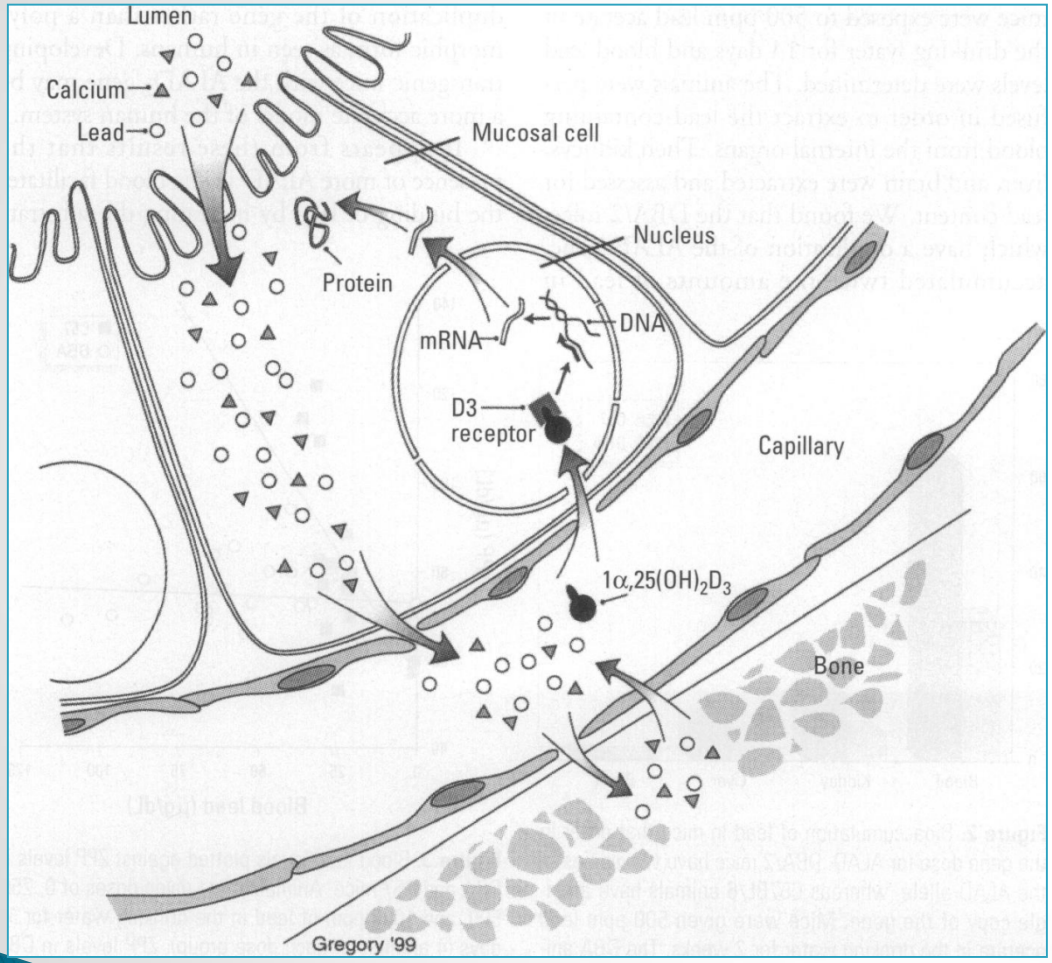


Эритроциты с базофильной зернистостью у работающих в контакте со свинцом в зависимости от генотипа HFE



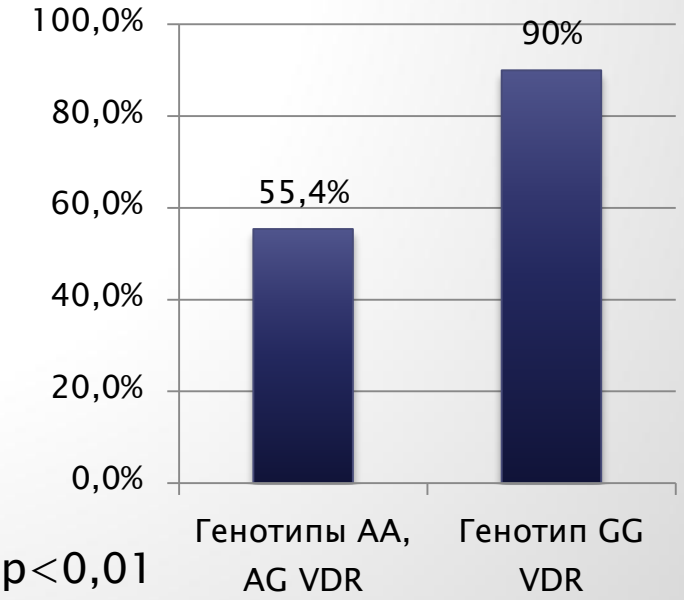
p<0,05

Ген рецептора витамина D (VDR)



- Рецептор витамина D (VDR) принимает участие в процессах абсорбции и аккумуляции кальция, и может способствовать накоплению свинца, учитывая его способность заменять кальций.

Ассоциация уровней свинца в крови с генотипом VDR (% лиц с содержанием свинца выше 40 мкг/дл)



p<0,01

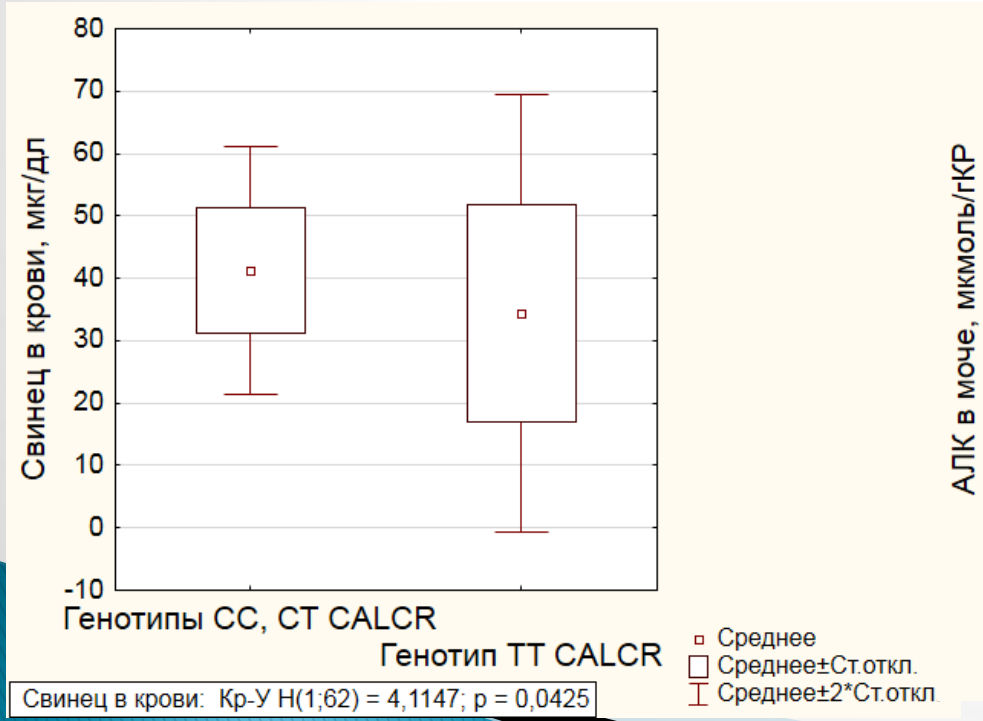
Ген рецептора витамина D (VDR)

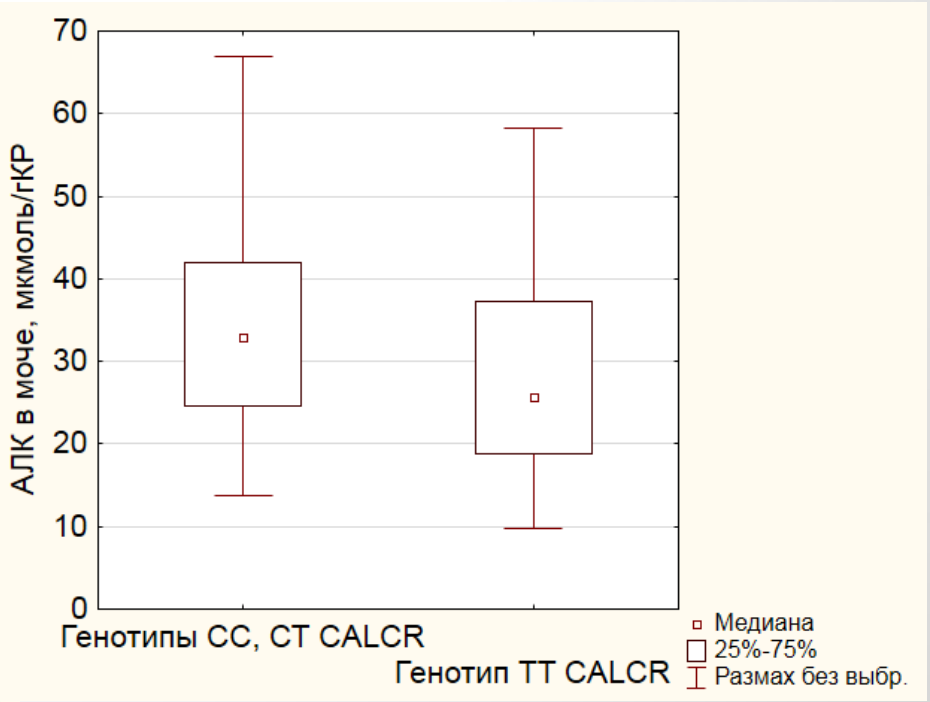
- В группе работающих с **уровнем АЛК в моче** выше 30 мкмоль/гКР частота встречаемости генотипа GG гена VDR выше, чем в европейской популяции (OR=2,203, 95% CI=1,241–3,910), что свидетельствует о повышенной чувствительности к воздействию свинца лиц с данным генотипом.
- Выявлена ассоциация наличия аллели G гена VDR с изменениями **гематологических показателей**:
- корреляции с HGB (γ=–0,217, p=0,041), MCV (γ=–0,252, p=0,016), MCH (γ=–0,384, p<0,001), RDW (γ=0,369, p<0,001), что свидетельствует о более высоком риске развития анемии у данных лиц.

Ген рецептора кальцитонина (CALCR)

- При генетическом полиморфизме рецептора кальцитонина (CALCR) могут нарушаться процессы поступления кальция в костную ткань, что может способствовать развитию процессов декальцинации костей с параллельным повышением уровней свинца в крови.

Уровни свинца в крови и АЛК в моче у работающих в контакте со свинцом в зависимости от генотипа CALCR





Гены ферментов антиоксидантной защиты

- Свинец оказывает заметное влияние на процессы окислительного метаболизма, в связи с чем для оценки чувствительности к неблагоприятному воздействию свинца на организм информативными являются полиморфизмы генов ферментов антиоксидантной системы.
- Показана ассоциация наличия полиморфизмов генов ферментов антиоксидантной защиты с формированием базофильной зернистости эритроцитов, являющейся маркером токсического воздействия свинца:
- Генотип GG гена GSTP1 (глутатин-S-трансфераза π) – OR=12,750 (95% CI=2,156-75,405)
- Генотип TT гена SOD2 (супероксидидсмутаза) – OR=8,472 (95% CI=2,507-28,631)

Заключение

- Индивидуальная чувствительность к воздействию свинца связана с **генетически детерминированными особенностями метаболических процессов**:
  - лиганды (ALAD, COPX),
  - накопление свинца (HFE, VDR, CALCR),
  - окислительный стресс (GSTP1, SOD).
- Исследование однонуклеотидных полиморфизмов у работающих в контакте со свинцом может быть использовано при разработке **персонифицированного плана профилактических мероприятий** (частота осмотров специалистами, скрининговых тестов и процедур и т.д.) с проведением углубленного обследования лиц из группы высокого риска с целью раннего выявления патологии.


СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!