

**(4В) Химико-аналитические и
биомедицинские исследования для
формирования доказательной базы вреда
здоровью**

Устинова Ольга Юрьевна

**ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления
рисками здоровью населения»**

Цель сообщения:

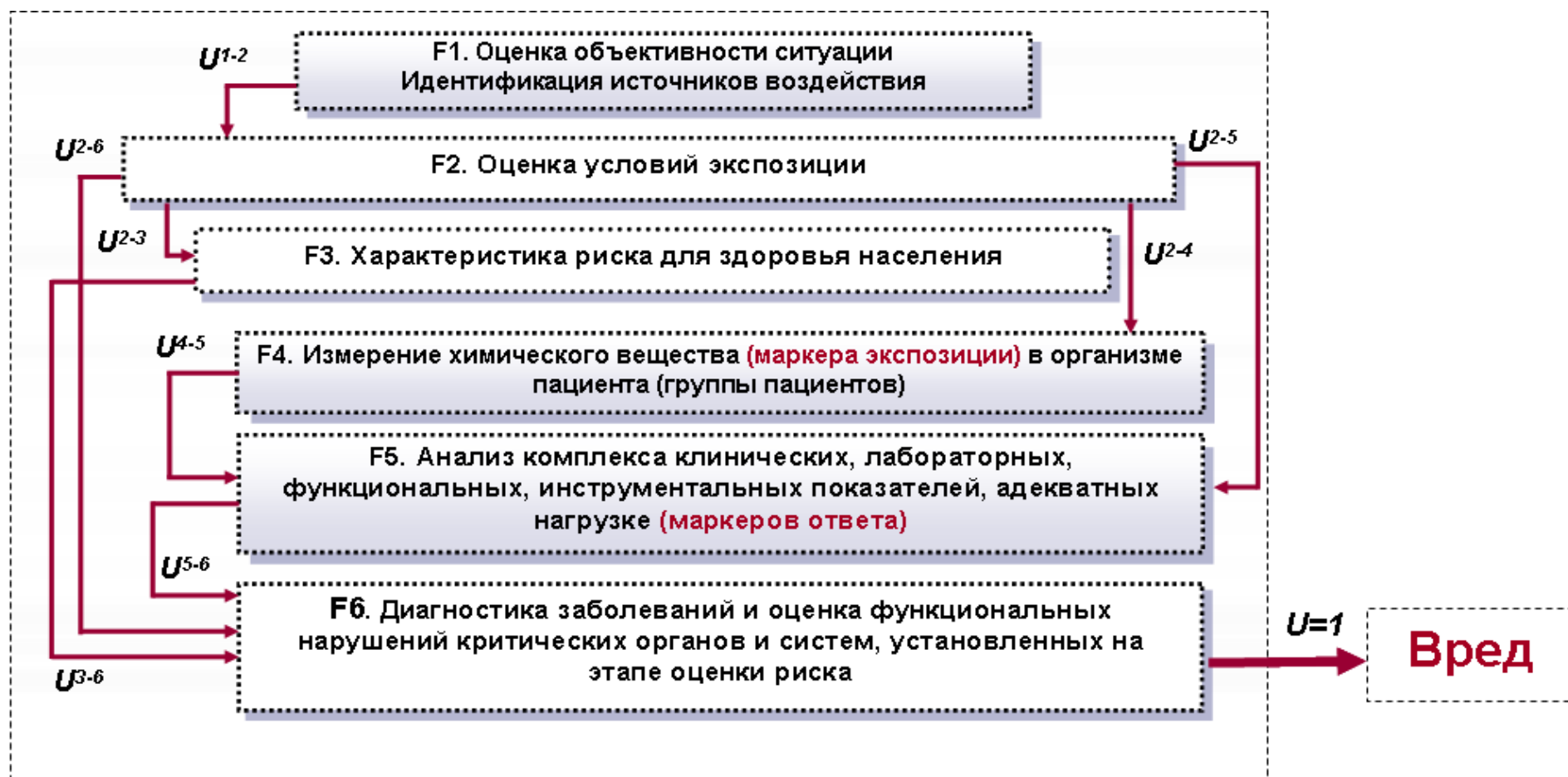
- **Предложить для совместного обсуждения программу биомедицинских исследований для доказательства причиненного вреда здоровью населения г.Закаменска**

Теоретические предпосылки предлагаемой программы

Согласно методологии установления вреда здоровью обязательным этапом формирования доказательной базы является:

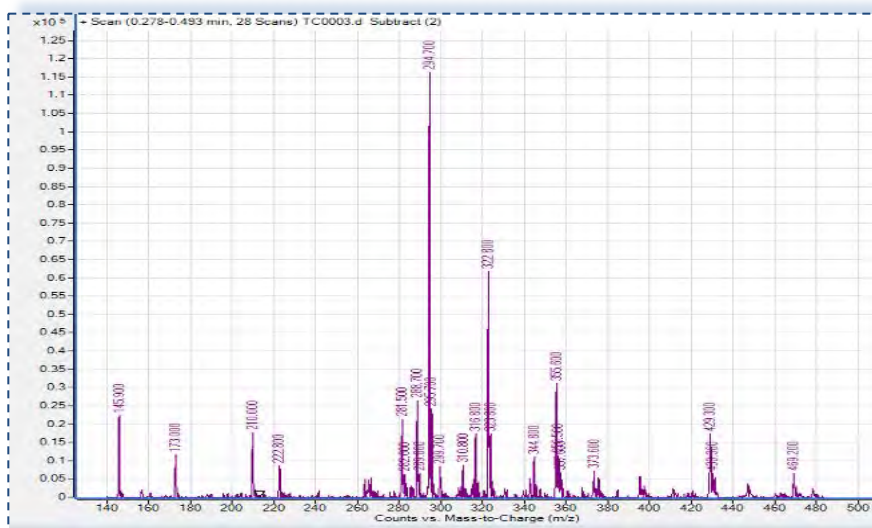
- Идентификация биомаркеров экспозиции**
- Идентификация биомаркеров эффекта**

F4. Измерение химического вещества (маркера экспозиции) в организме пациента (группы пациентов)

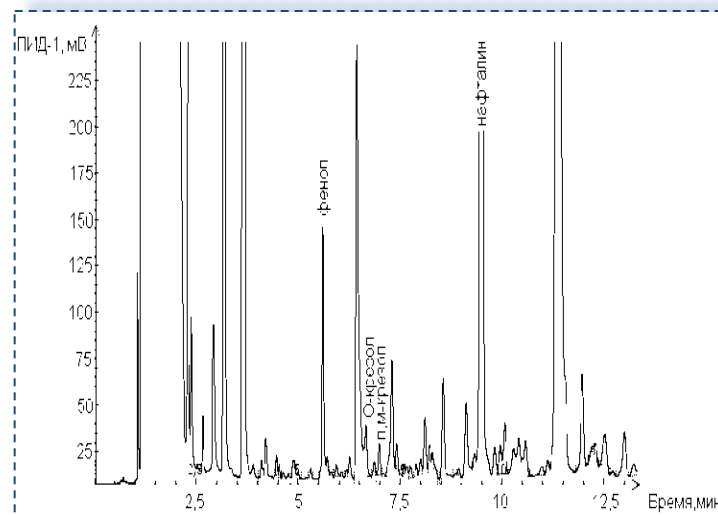


Система биологического мониторинга позволяет доказывать факт контакта опасного вещества с организмом

Современные методы газовой и жидкостной хроматографии, атомно-абсорбционной спектрофотометрии, хромато-масс спектрометрии позволяют идентифицировать и количественно определять в крови, моче, грудном молоке, волосах, желчи и пр. **более 150 химических веществ** и их метаболитов (**тяжелые металлы, алифатические и ароматические углеводороды, спирты, альдегиды кетоны, пестициды, диоксины и пр.**)



Масс-спектр группы алифатических углеводородов и их производных в крови



Хроматограмма образца крови, содержащей фенол, о-крезол, п,м-крезол с внутренним стандартом нафталина

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

Химико-аналитическое исследование качественного и количественного содержания в биосубстратах химических веществ должны быть адекватны установленным факторам риска

Целевые группы обследуемых

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

Методы химико-аналитического контроля (порядка 35 методов)

Биологические среды

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

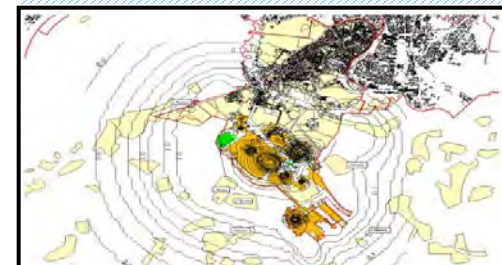
Химические факторы риска (более 50 веществ)

Химические вещества

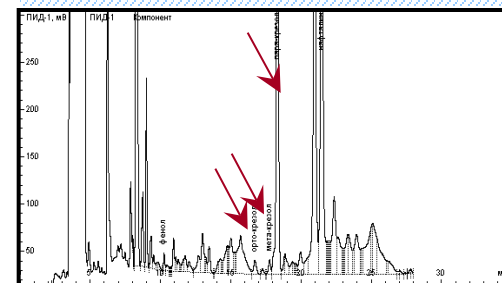
- металлы
- альдегиды
- ароматические углеводороды
- алифатические спирты
- ароматические амины
- предельные углеводороды

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

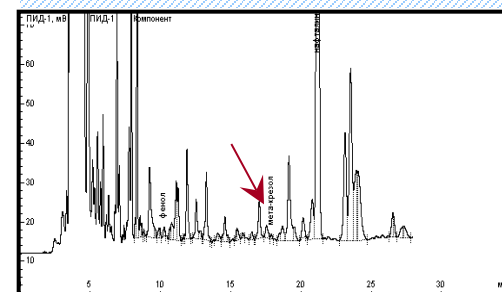
Население в зоне экспозиции крезолом



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

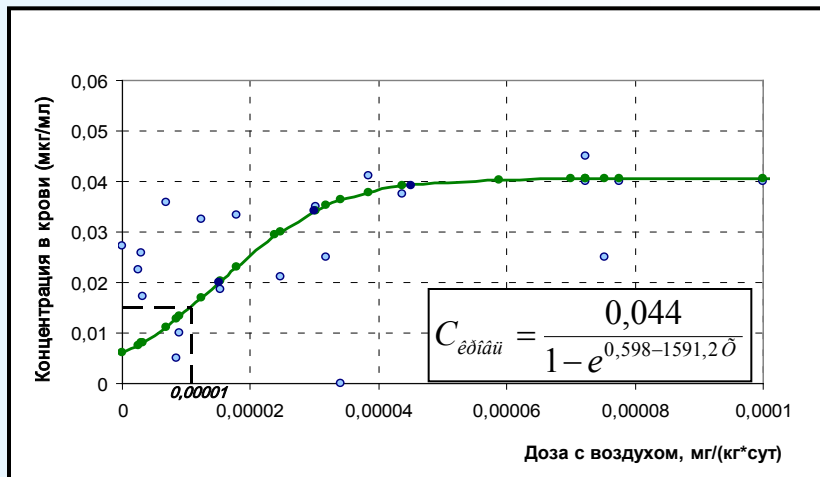


Хроматограмма крови ребенка вне экспозиции (содержит м-крезол на уровне фона)

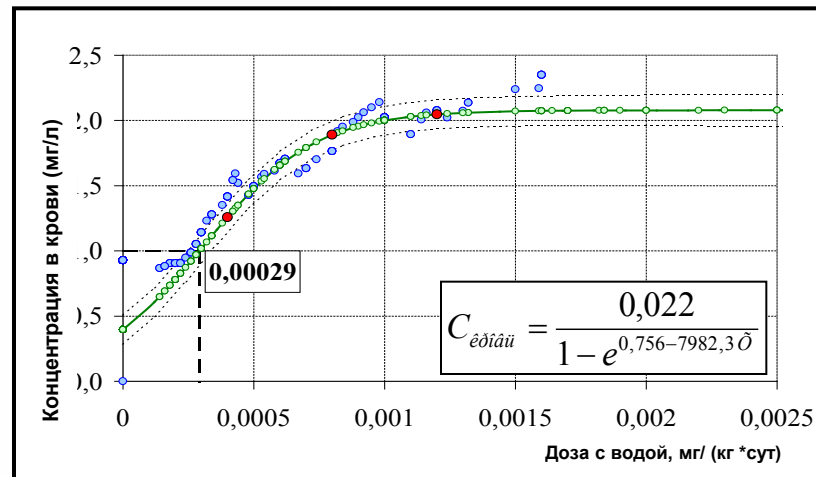


Обоснование маркеров экспозиции

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

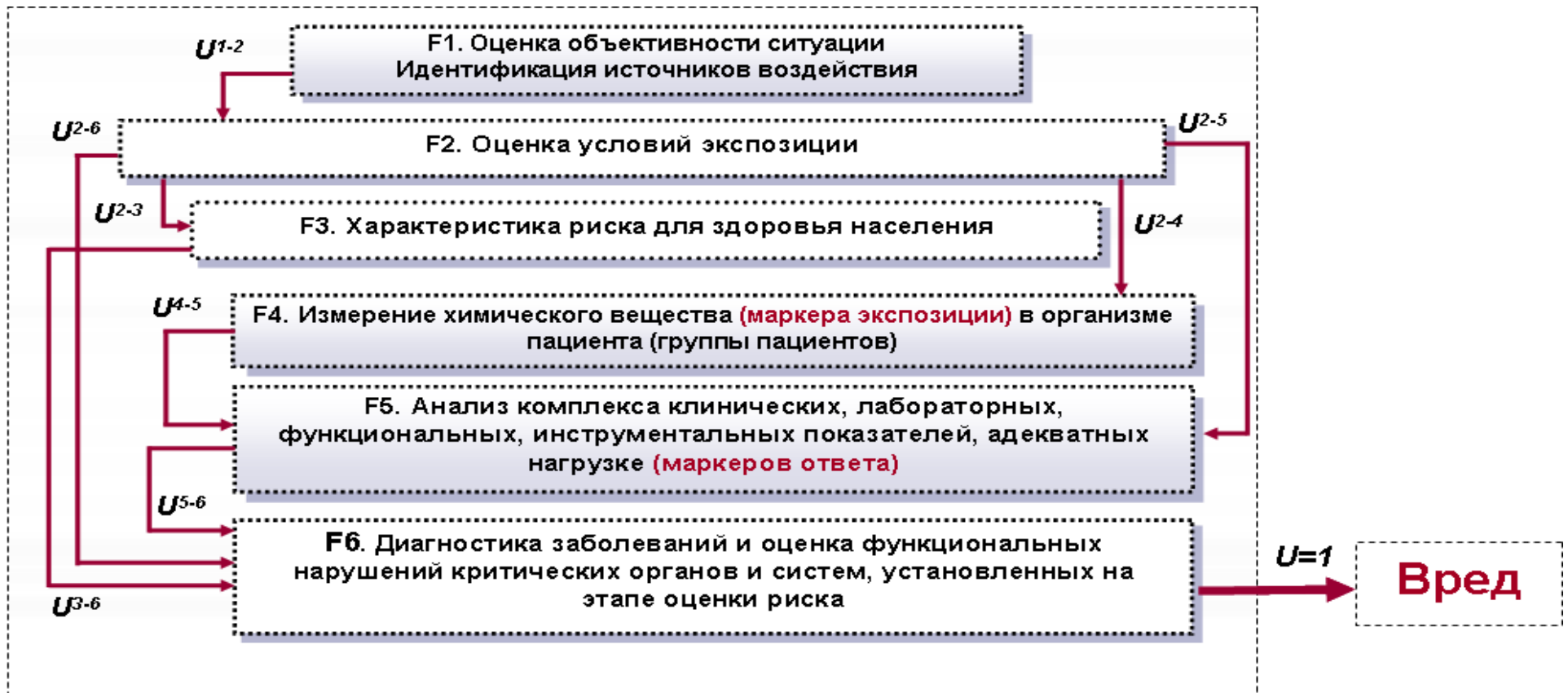
- марганец
- хром
- бензол
- формальдегид
- метанол

- 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

Обязательным этапом биомониторинга является установление достоверной связи между уровнем содержания химических веществ в биосредах с уровнем экспозиции ($p \leq 0,05$)

F5. Анализ комплекса клинических, лабораторных, функциональных, инструментальных показателей, адекватных нагрузке (маркеров ответа)





Химические факторы риска и заболеваемость населения

Экологические факторы риска

Триггеры (ускоряющие факторы)

Адаптация

Уровень дополнительной заболеваемости в том числе экодетерминированной (ранняя манифестация, быстрое прогрессирование, ранняя инвалидизация) **12-20%**

Деадаптация, гиперчувствительность к химическим токсикантам

Праймеры (патоморфоз)

Инвалидизация

Рост отдельных видов экодетерминированной патологии (модифицированные БА, зобассоциированные заболевания, болезни верхних дыхательных путей, гастродуоденальной зоны) на **30-35%** выше, чем на чистых территориях

Развитие хронических патологических процессов

Предикторы (прямое специфическое воздействие)

Острые и хронические специфические заболевания

Специфические заболевания (минимата и др.) **0,3-0,5%**

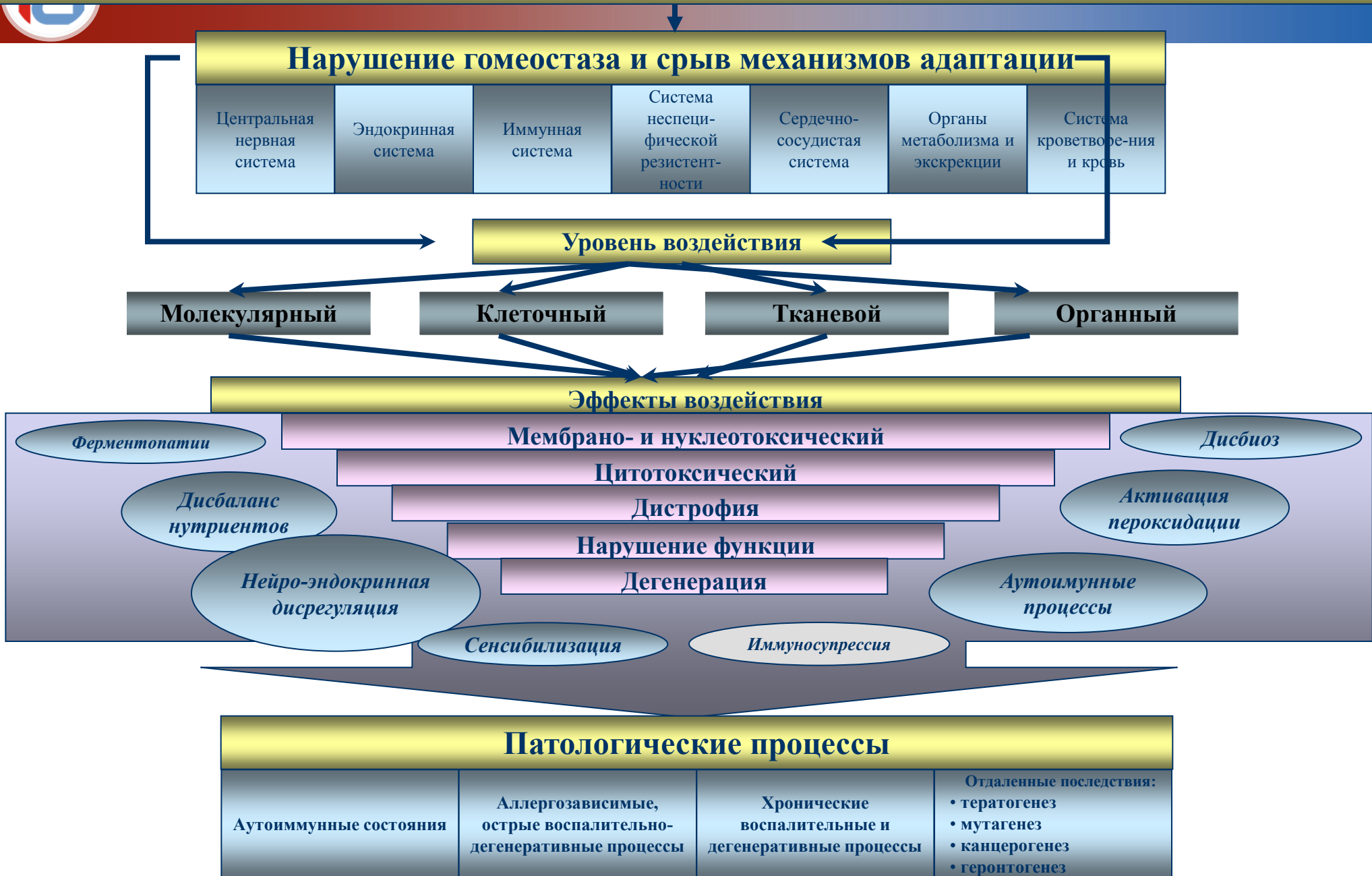
Общесоматические причинные факторы (наследственные, аутоимунные и др.)

Этиологические факторы

Общесоматическая заболеваемость

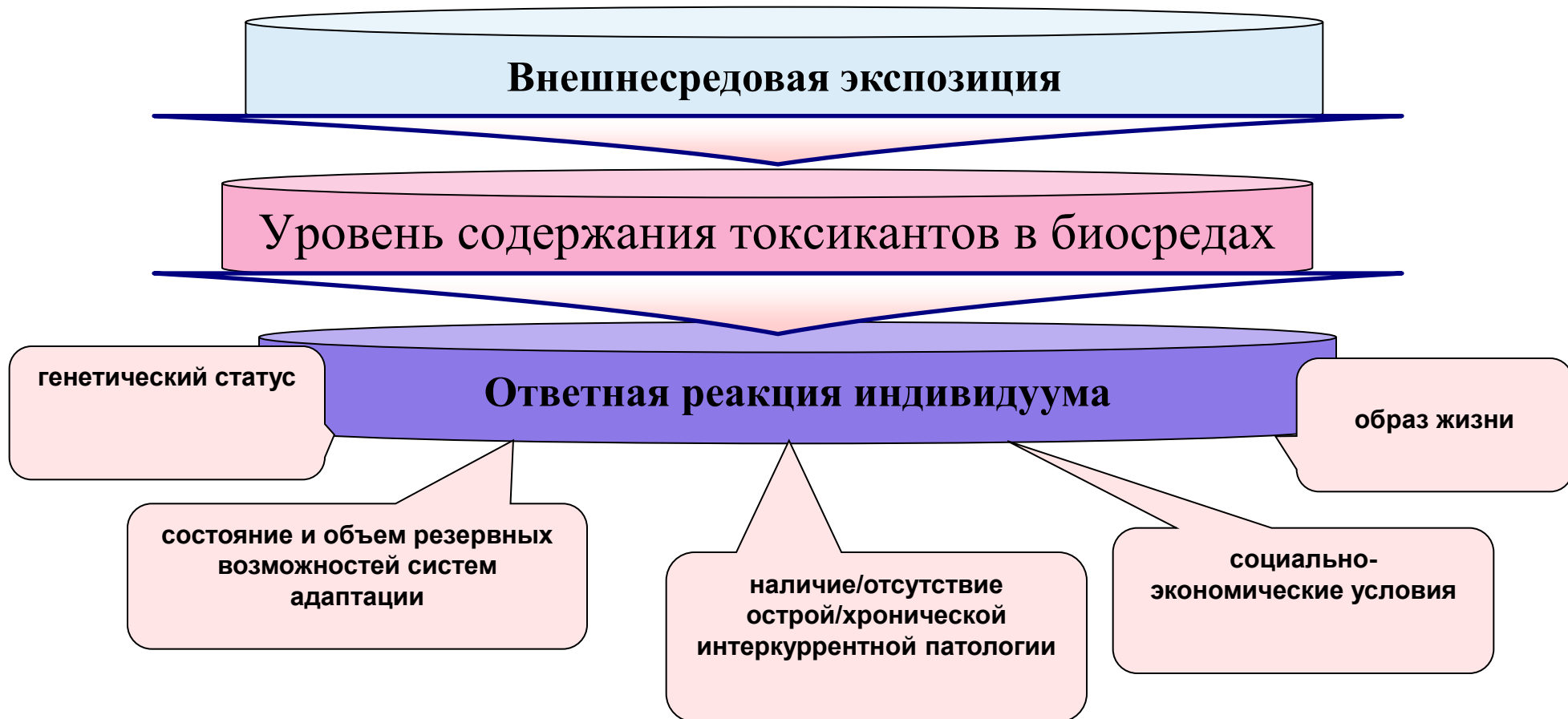
Фоновая заболеваемость (независимый уровень) **65-80%**

Действие химических факторов окружающей и производственной среды





В равных внешнесредовых условиях экспозиции и даже близком уровне содержания химических токсикантов в биосредах, ответная реакция индивидуума определяется совокупностью целого ряда факторов:



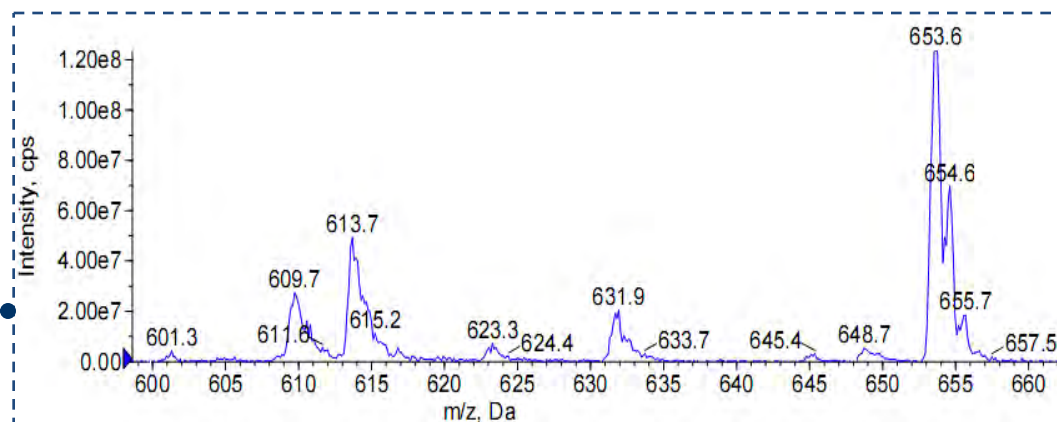
*Байдина А.С., Маклакова О.А., Лужецкий К.П., Румянцева А.Н. Fundamental Research. – 2013. - № 11. – С. 74-78
Маклакова О.А., Устинова О.Ю., Лужецкий К.П., Байдина А.С. Известия Самарского научного центра российской академии наук. – 2013. – Том 15 №3(6). - С. 1845-1849
Зайцева Н.В. Экодетерминированные гастродуодениты у детей. Пермь. – изд-во «Книжный формат». - 2009. – 320 с.*

Биомаркеры эффекта

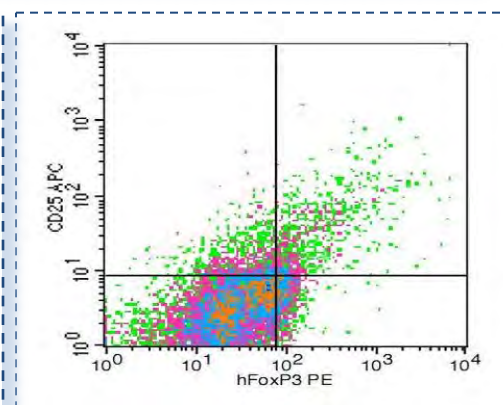
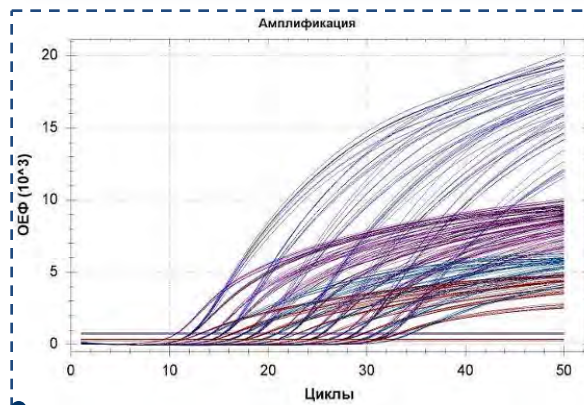
- **Эпидемиологические показатели**
- **Клинические данные**
- **Результаты исследования функционального состояния органов и систем**
- **Лабораторные показатели**

Выявление маркеров ответа, доказанно связанных с маркерами экспозиции, позволяет говорить о наличии влияния фактора (в том числе на уровне протеома, клеточного апоптоза, процессов метаболизма и иных нарушений – предикторов соматической и репродуктивной патологии

Расширенный масс-спектр пептидов образца плазмы крови ребенка в области 58,1-58,7 мин



Фено- и генотипирование проточной цитометрией и ПЦР в режиме реального времени



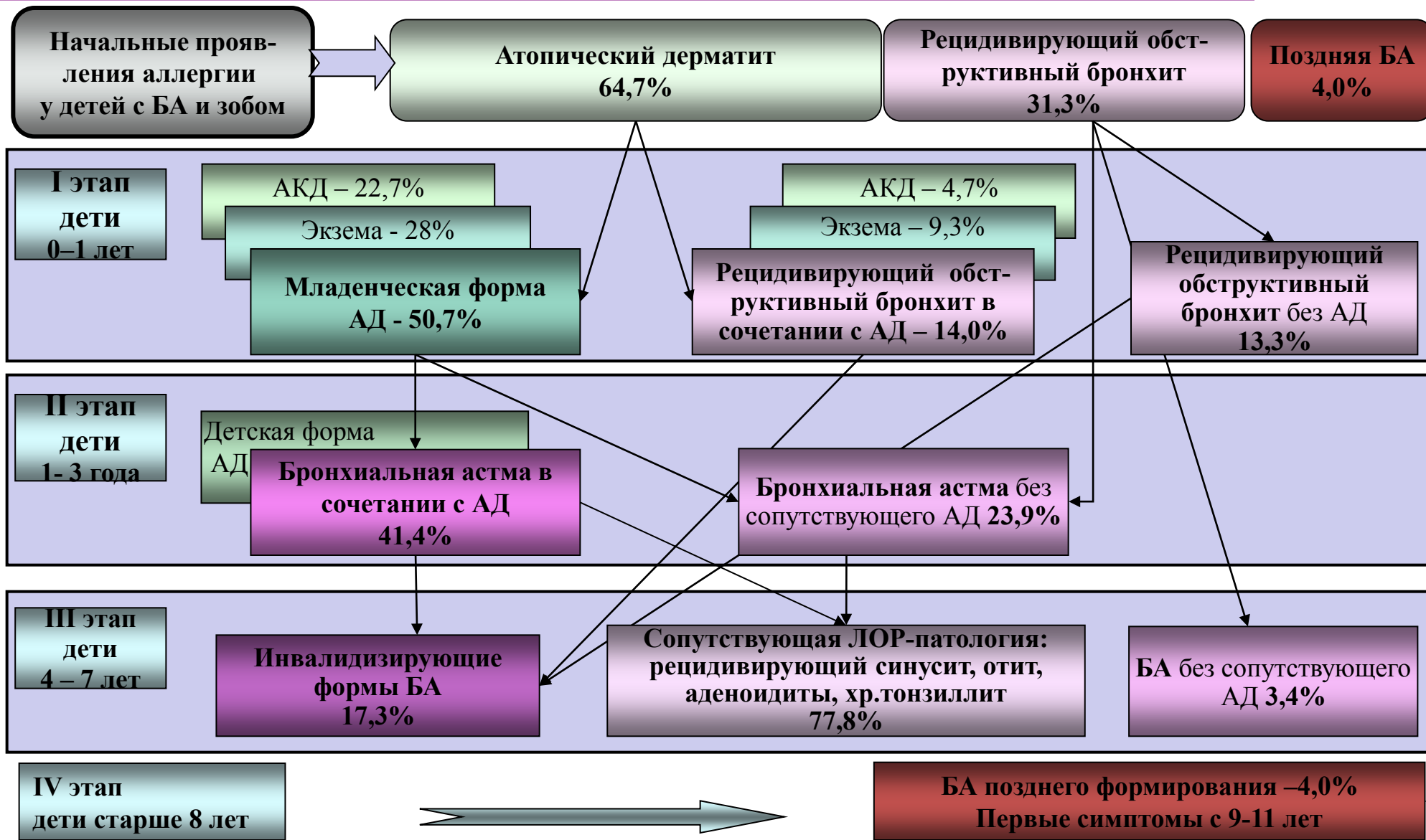
Химические элементы, критические органы и системы, референтные уровни

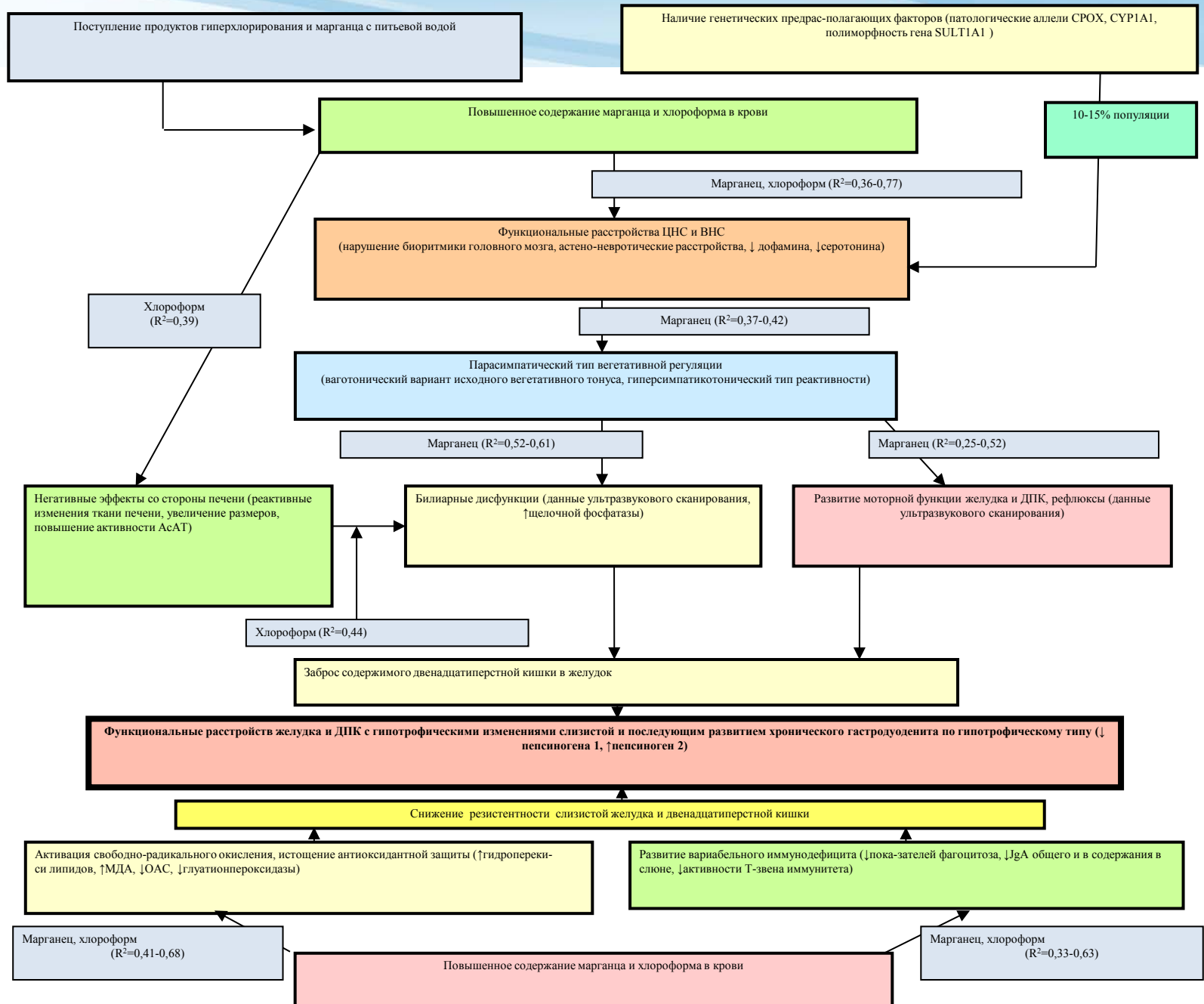
Вещество	CAS	RfC, мг/м ³	Критические органы и системы	RFD, мг/кг	Критические органы и системы	Sfi
<i>Элементы, по содержанию которых установлены зоны экологического бедствия</i>						
Медь (Cu)	7440-50-8	2,00E-05	органы дыхания, системн.	0,019	жел.-киш. тракт, печень	–
Цинк (Zn)	7440-66-6	0,0009	органы дыхания, иммун. (сенс.), кровь	0,3	кровь, биохим. (супероксид-дисмутаза)	–
Мышьяк (As)	7440-38-2	3,00E-05	развитие (тератоген.), нервная сист., серд.-сос. сист., органы дыхания, рак	0,0003	кожа, ЦНС, нервная сист., серд.-сос. сист., иммун., гормон. (диабет), жел.-киш. тракт	15
Свинец (Pb)	7439-92-1	0,0005	ЦНС, кровь, развитие, репрод. сист., гормон., почки	0,0035	ЦНС, нервная сист., кровь, биохим., развитие, репрод. сист., гормон.	0,042
Молибден (Mo)	7439-98-7	0,012	–	0,005	почки	–
Вольфрам (W)	7440-33-7	0,1	органы дыхания	0,0025	–	–
Кадмий (Cd)	7440-43-9	2,00E-05	почки, органы дыхания, гормон., рак	0,0005	почки, гормон.	6,3
Сурьма (Sb)	7440-36-0	0,0004	органы дыхания	0,0004	биохим. (глюкоза в крови, холестерин), смертность	
<i>Прочие элементы, которые возможно включить в исследование</i>						
Кобальт (Co)	7440-48-4	2,00E-05	органы дыхания	0,02	кровь	9,8
Марганец (Mn)	7439-96-5	5,00E-05	ЦНС, нервная система, органы дыхания	0,14	ЦНС, кровь	–
Ртуть (Hg)	7439-97-6	0,0003	ЦНС, гормон., почки	0,0003	иммун., почки, ЦНС, репрод., гормон.	–
Хром (Cr)	7440-47-3	0,0001	органы дыхания, печень, почки, иммун., жел.-киш. тракт	0,005	печень, почки, жел.-киш. тракт, слизистые	42
Никель (Ni)	7440-02-0	5,00E-05	органы дыхания, кровь, иммун., рак, ЦНС	0,02	печень, серд.-сос. сист., жел.-киш. тракт, кровь, масса тела	0,84

Эпидемиологические исследования

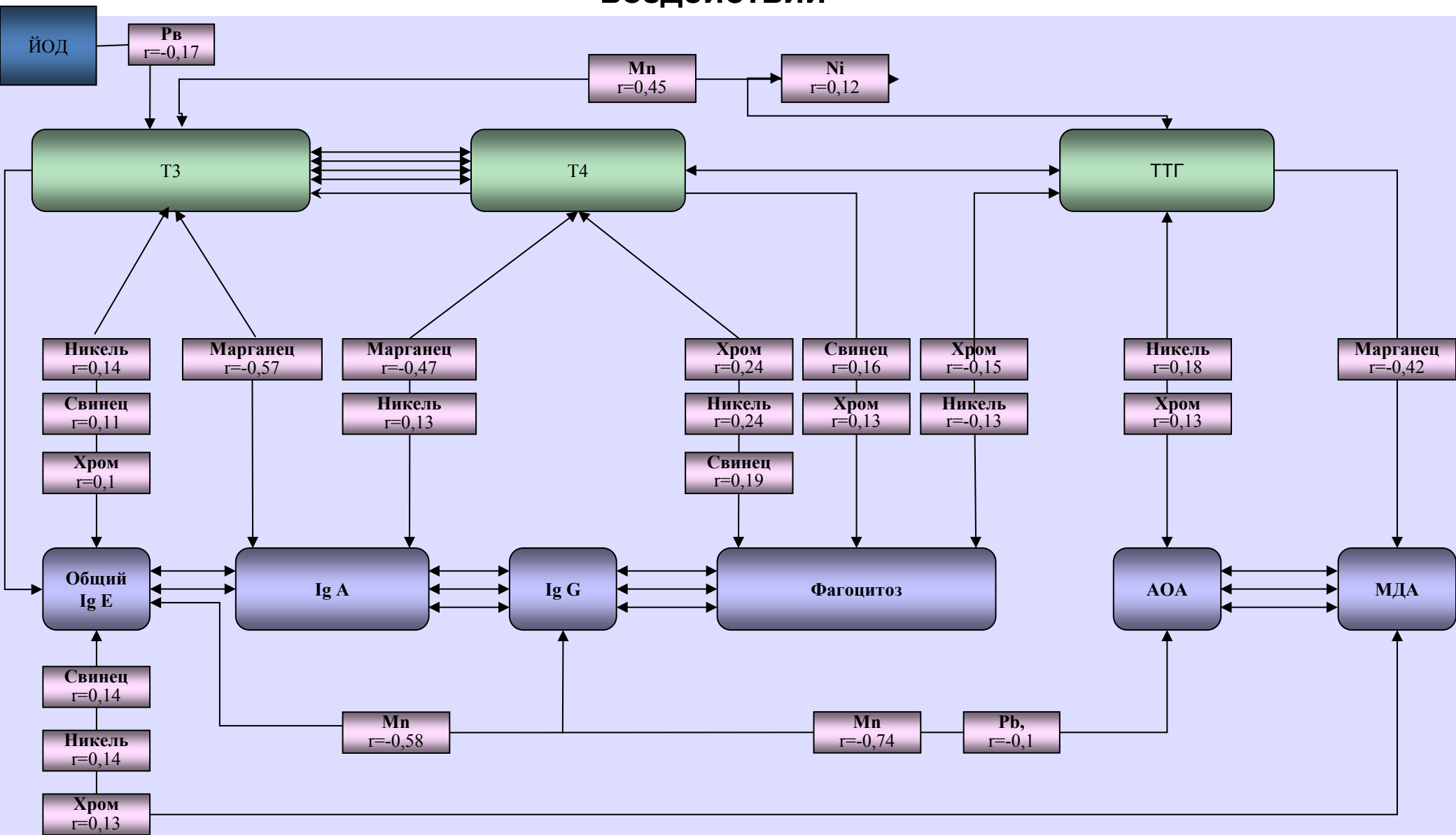
- **Анализ динамики, структуры, темпов роста заболеваемости населения на исследуемой территории**
- **Сравнение показателей динамики и структуры заболеваемости на исследуемой территории с аналогичными на «относительно чистых» территориях или с данными по Российской Федерации**
- **Выделение приоритетных классов болезней**
- **Эпидемиологический анализ целевых групп**
- **Соотнесение установленных приоритетов с факторами риска**

Клинические особенности формирования и течения бронхиальной астмы у детей с зобом в условиях геотехногенного воздействия

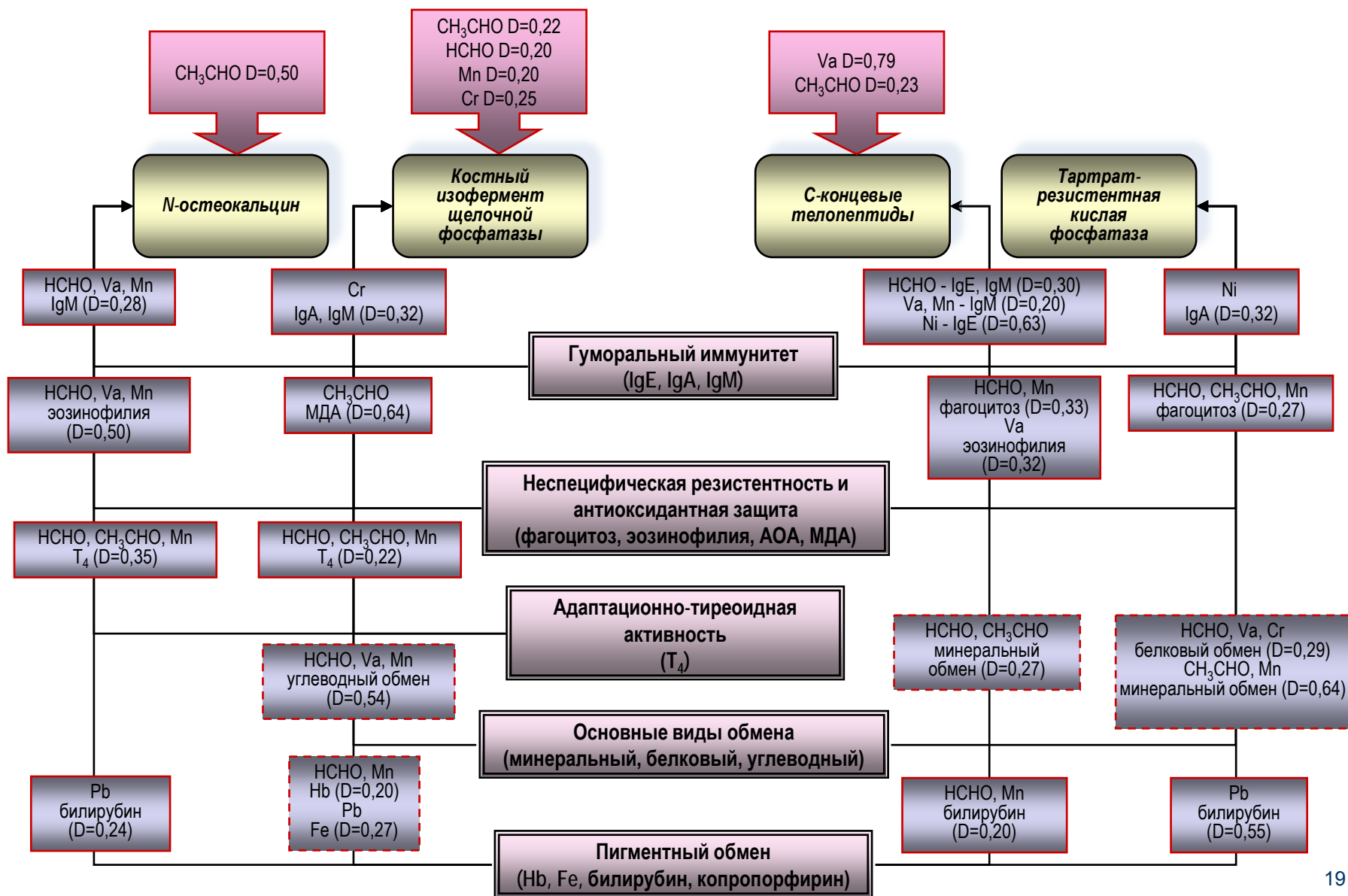




Аналитическая оценка участия токсичных металлов в формировании патогенетических иммуно-аллерго-тиреоидных взаимосвязей у детей с бронхиальной астмой и зобом при сочетанном геотехногенном воздействии



Межсистемные связи маркеров костного метаболизма и других клинико-лабораторных показателей у детей с биомаркерами техногенной нагрузки



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, органном, 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



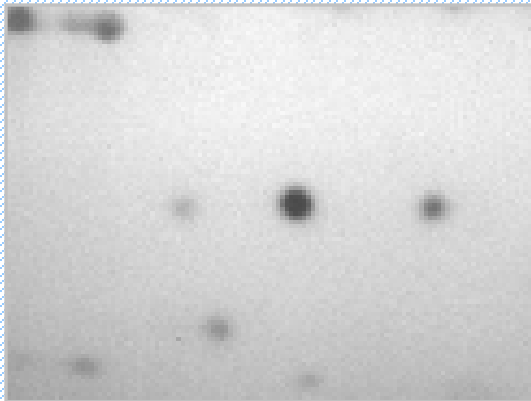
Технологии протеомного анализа – для задач обоснования принципиально новых маркеров эффекта

Факторы экспозиции – металлы (Ni)

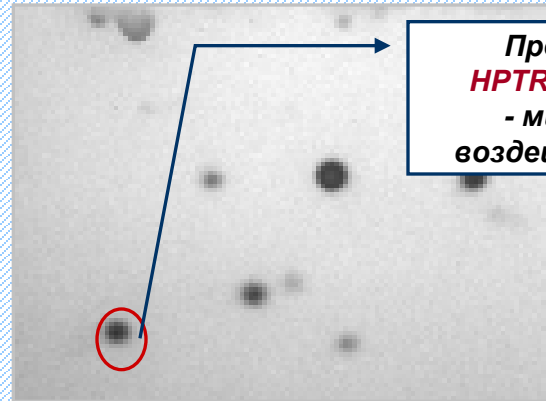
Молекулярный уровень

1. 2D электрофореграмма плазмы крови ребенка

2. Идентификация по масс-спектру

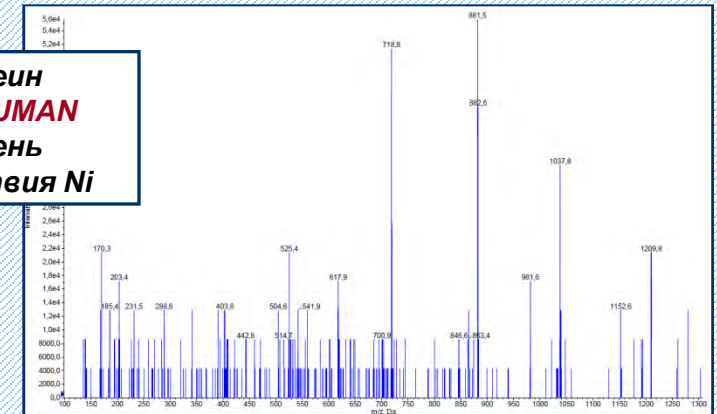


Вне зоны экспозиции: Ni в крови на уровне 1 RL



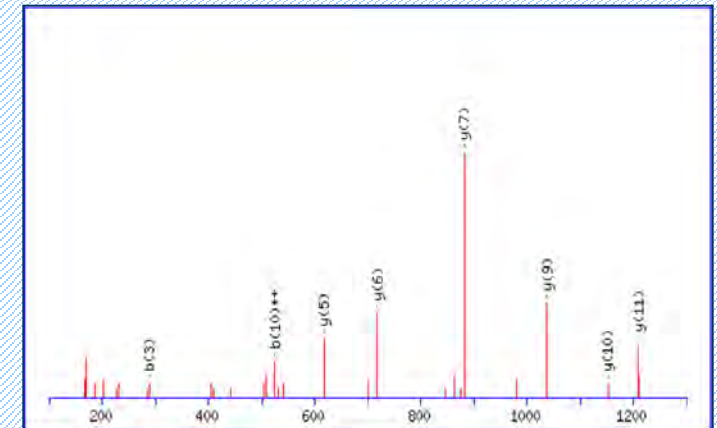
В зоне экспозиции: Ni в крови на уровне 2 RL

Протеин
HPTP_HUMAN
- мишень
воздействия Ni



HPTP_HUMAN (гаптоглобин связанный протеин) обеспечивает нормальный метаболизм гемоглобина

Нарушение структуры и функции гемоглобина



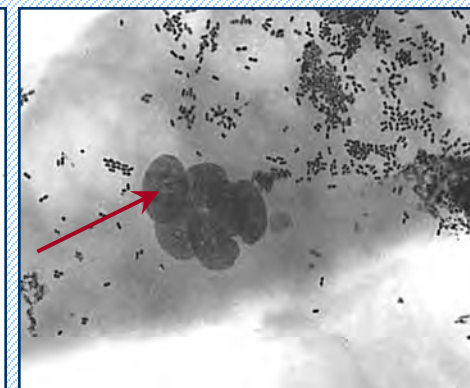
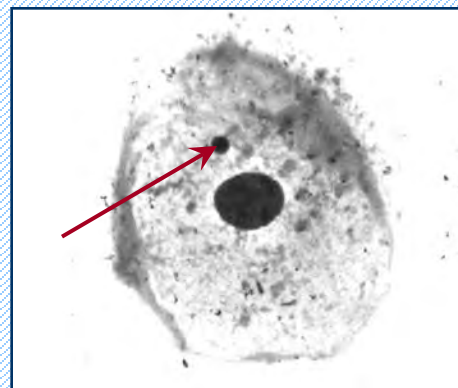
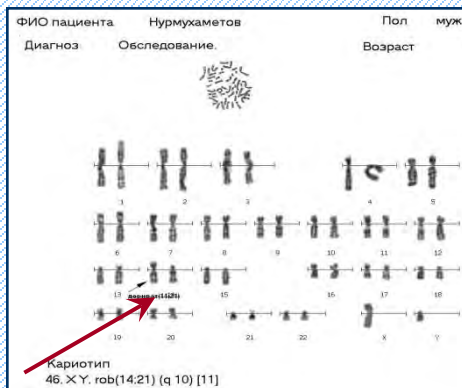
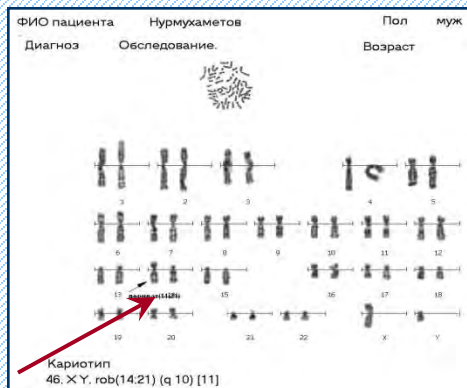
Технологии цитогенетического анализа – для задач обоснования маркеров эффекта в условиях воздействия химических мутагенов и репротоксикантов внешней и производственной среды

Факторы экспозиции - мутагены, репротоксиканты

Клеточно-молекулярный уровень

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

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



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

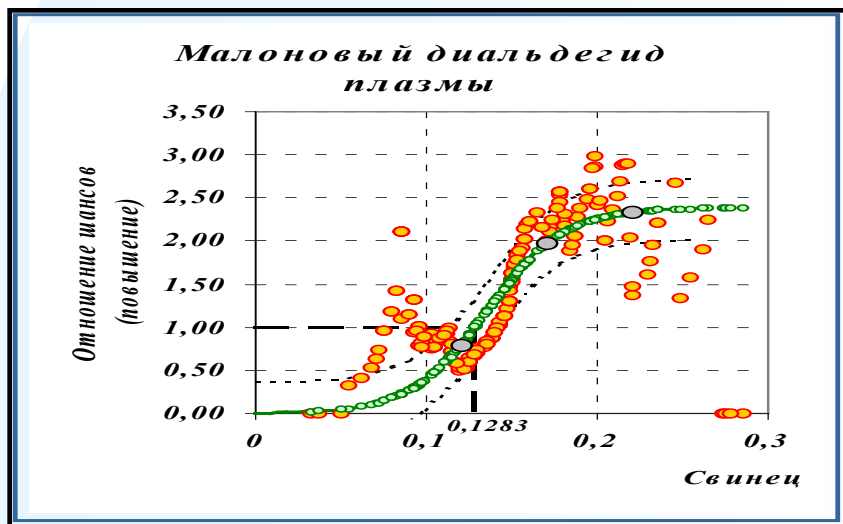
Плод – хромосомная патология (синдром Дауна).
Формальдегид в крови – 5RL

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

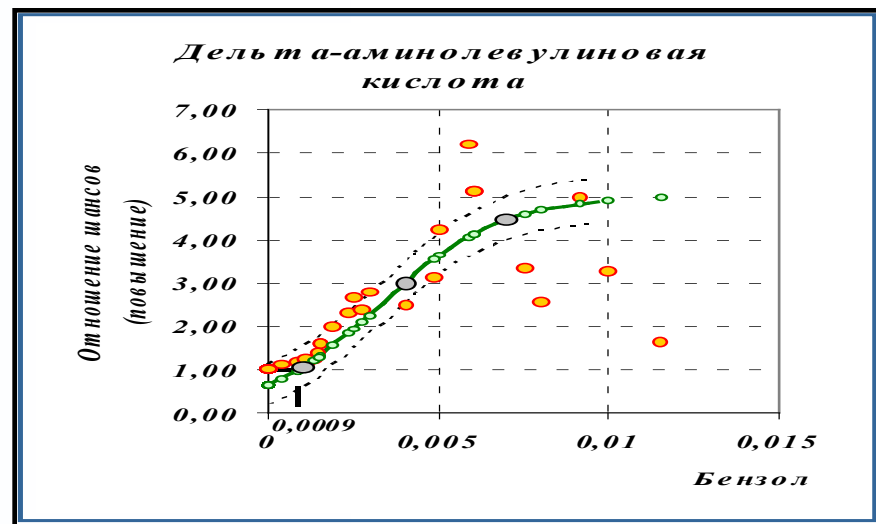
Новорожденный – многоядерность клеток.
Бензол в крови – 0,02 мг/дм³

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

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



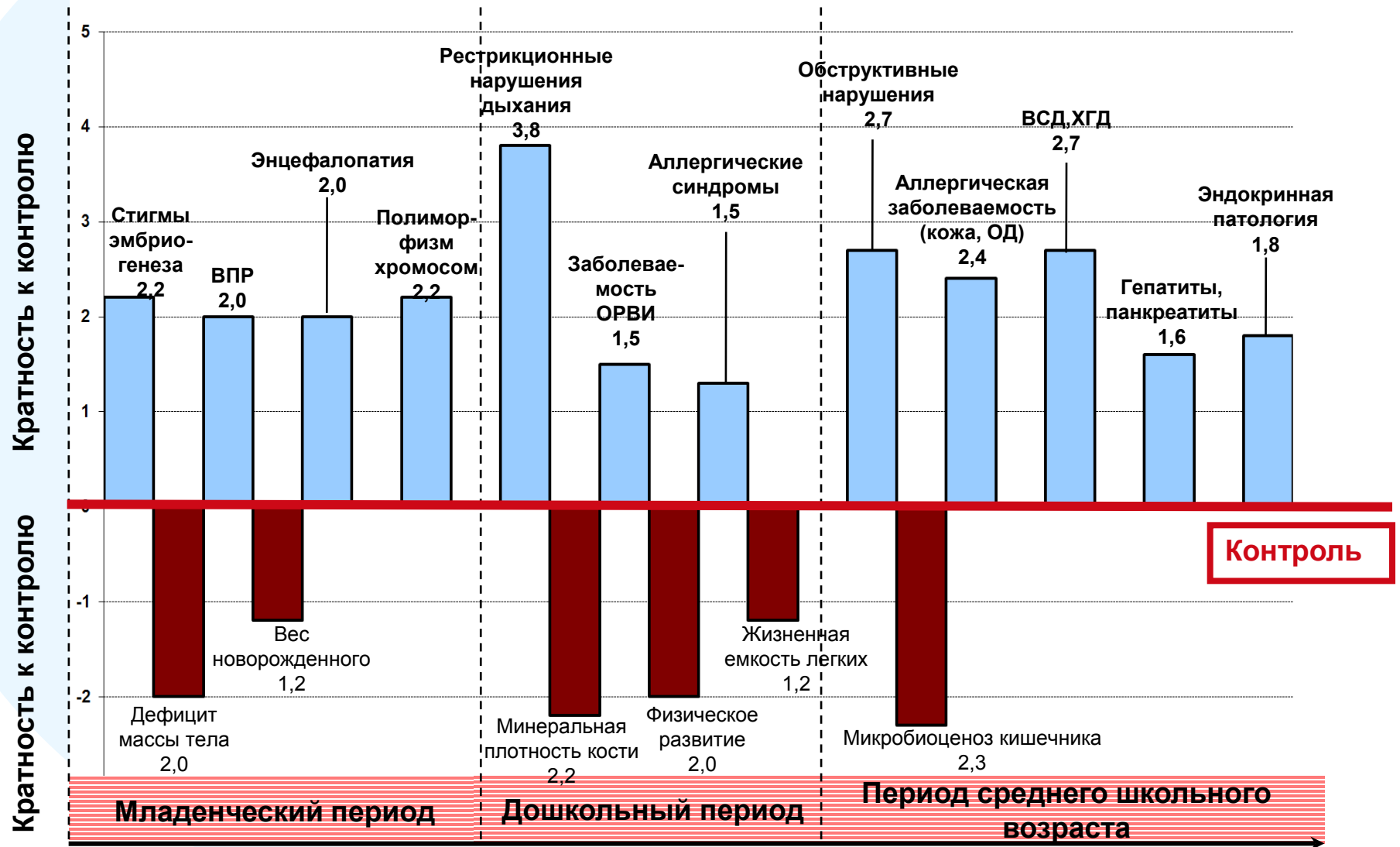
Зависимость «концентрация бензола в крови – уровень дельта-АЛК в моче» при аэрогенной экспозиции



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
	Са ↓	-7,66 ± 0,01	99,12 ± 0,05	0,48	178,4	0,001

Комплекс маркеров ответа в сочетании с результатами клинических исследований позволяет подтвердить состоявшийся факт заболевания и его связь с экспозицией



Медико-биологические критерии выделения контингента детей для профилактических мероприятий, направленных на снижение уровня заболеваемости хроническими гломерулярными и тубулоинтерстициальными заболеваниями почек, ассоциированными с ингаляционным воздействием кадмия и фенола

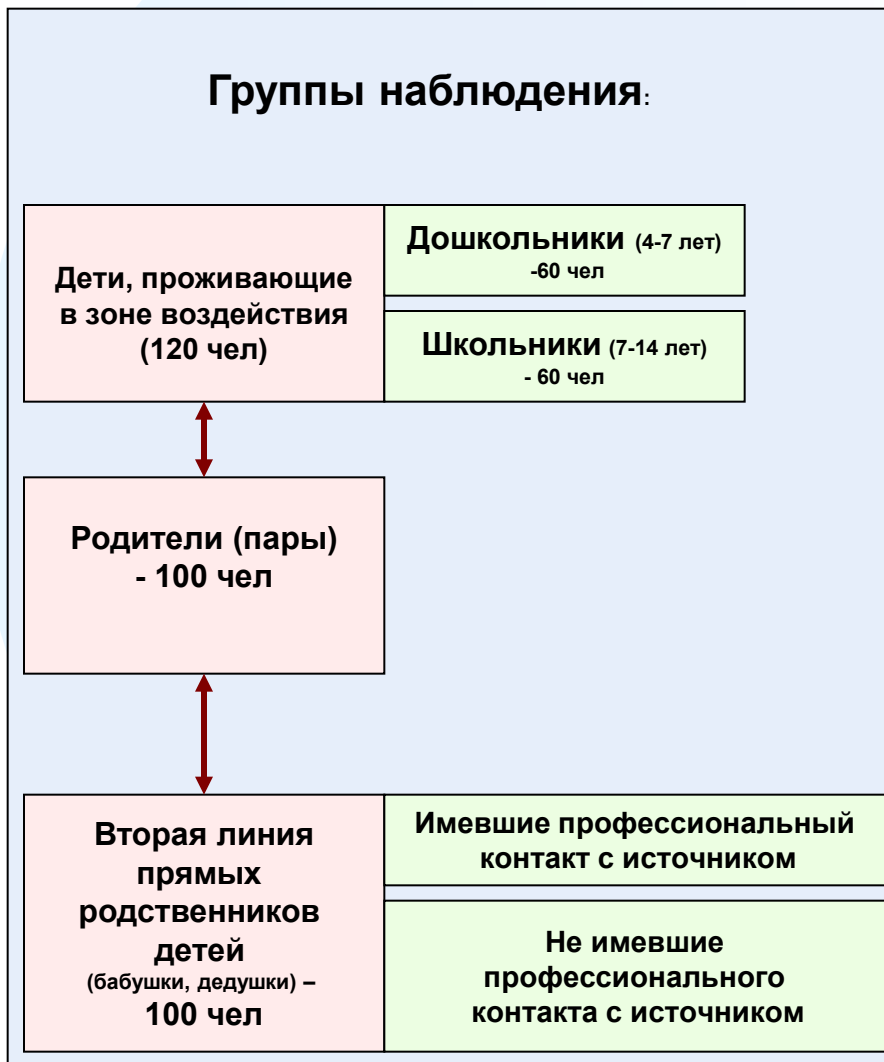
№/№	Критерии	Минимальный мочевои синдром» (МКБ 10: R80-R82)	Гломерулярные и тубулоинтерстициальные болезни почек (МКБ-10: N14.3, N15.8)	
1	Данные анамнеза	возраст	4-7 лет	старше 7 лет
2		генетический фактор	полиморфизм по гомозиготному и гетерозиготному варианту генов: CYP0X, RCT 450, SULTA1	полиморфизм по гомозиготному и гетерозиготному варианту генов: CYP0X, RCT 450, SULTA1
3		наследственный фактор	отягощенность по нефропатологии	отягощенность по нефропатологии
4		наличие перинатальных факторов риска	+/-	+
5		аномалии развития мочевои системы	+/-	+
6		частота рецидивов	2-3 раза в год	3 и более раза в год
7		длительность рецидивов заболевания	до 1 месяца	до 1,5-2,0 месяцев
8	Клинические проявления	дизурические явления	нарушение циркадного ритма выделения мочи (ночной диурез/дневной диурез - 1:2,5)	нарушение циркадного ритма выделения мочи (ночной диурез/дневной диурез - 1:2,0-2,5)
		полиурия	отсутствует	в период обострения
		тяжесть в пояснице	отсутствует	в период обострения
		температурная реакция	отсутствует	отсутствует
		симптомы интоксикации	отсутствует	в период обострения
		артериальная гипертензия	отсутствует	редко

№/№	Критерии		Минимальный мочевой синдром» (МКБ 10: R80-R82)	Гломерулярные и тубулоинтерстициальные болезни почек (МКБ-10: N14.3, N15.8)	
9	Характеристика функционального состояния почек	реабсорбционная функция почек	снижение амплитуды изменения удельного веса мочи в течение суток	до 0,006 у.е.	ниже 0,006 у.е.
			снижение показателя канальцевой реабсорбции	до 90-95%	ниже 90%
			β2-микроглобулин в моче	отсутствует	есть
		фильтрационная функция почек	микрогематурия	есть	есть
			протеинурия	0,033‰	0,033-0,066‰
			абактериальная лейкоцитурия	отсутствует	есть
			глюкозурия	отсутствует	+/-
			гиперурикурия	отсутствует	+/-
			оксалатурия	есть	есть
			фосфатурия	есть	есть
			кальциевая кристаллурия	отсутствует	+/-
10	Данные инструментального обследования	Ультразвуковое исследование почек	обеднение кровотока в режиме цветового доплеровского картирования в подкапсульной зоне почек	обеднение кровотока в режиме цветового доплеровского картирования в подкапсульной зоне почек; отклонение от нормативных значений показателей спектрограммы в режиме импульсноволнового доплера (скорость кровотока, индекс резистентности - ниже 0,6 у.е., пульсационный индекс - ниже 1,1 у.е., систоло-диастолический индекс, увеличение диапазона значений индекса резистентности от ствола к периферическим артериям более 0,04-0,05 у.е.); повышение эхогенности паренхимы почек	

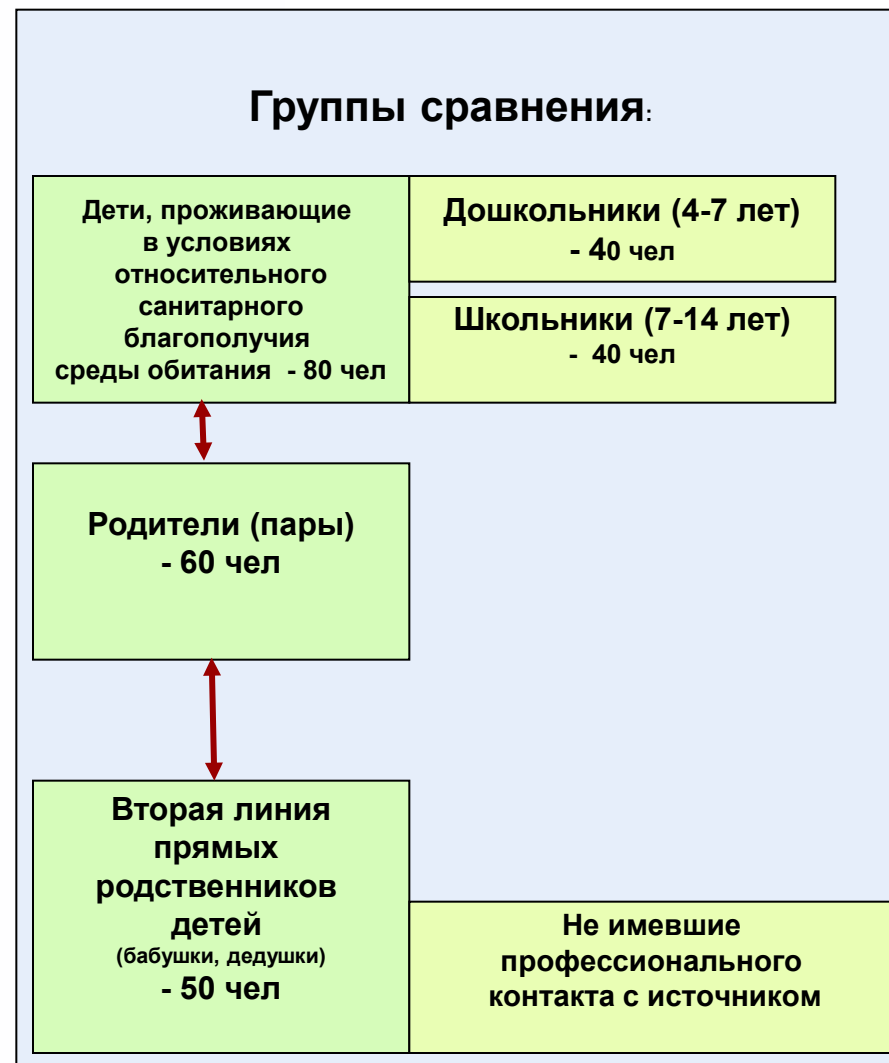
№/ №	Критерии	Минимальный мочевой синдром» (МКБ 10: R80-R82)	Гломерулярные и тубулоинтерстициальные болезни почек (МКБ-10: N14.3, N15.8)	
11	Лабораторные данные	состояние окислительно-антиоксидантных процессов	повышение общей антиоксидантной активности крови, содержания супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и гидроперекисей липидов	повышение/снижение общей антиоксидантной активности крови, содержания супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, повышение содержания каталазы, гидроперекисей липидов и малонового диальдегида
12		состояние факторов неспецифической резистентности	повышение показателей фагоцитарной активности крови	Снижение показателей фагоцитарной активности крови
13		состояние специфической сенсibilизации (специфический JgE к хрому, JgG к кадмию, свинцу, фенолу)	отсутствуют	есть
14		состояние минерального обмена	не изменен	снижение содержания натрия, калия, хлоридов
15	Химико-аналитические исследования	содержание химических веществ в крови	содержание кадмия превышает референтный уровень в 1,4-2,0 раза; содержание свинца в 1,2-1,5 раза выше референтного; содержание хрома в 1,2-1,7 раза выше референтного; содержание фенола в 1,3-4,0 раза выше референтного.	содержание кадмия более чем в 2,0 раза выше референтного; содержание свинца более чем в 1,5 раза выше референтного; содержание хрома более чем в 1,7 раза выше референтного; содержание фенола более чем в 4,0 раза выше референтного.

Дизайн исследования (метод триад)

Группы наблюдения:

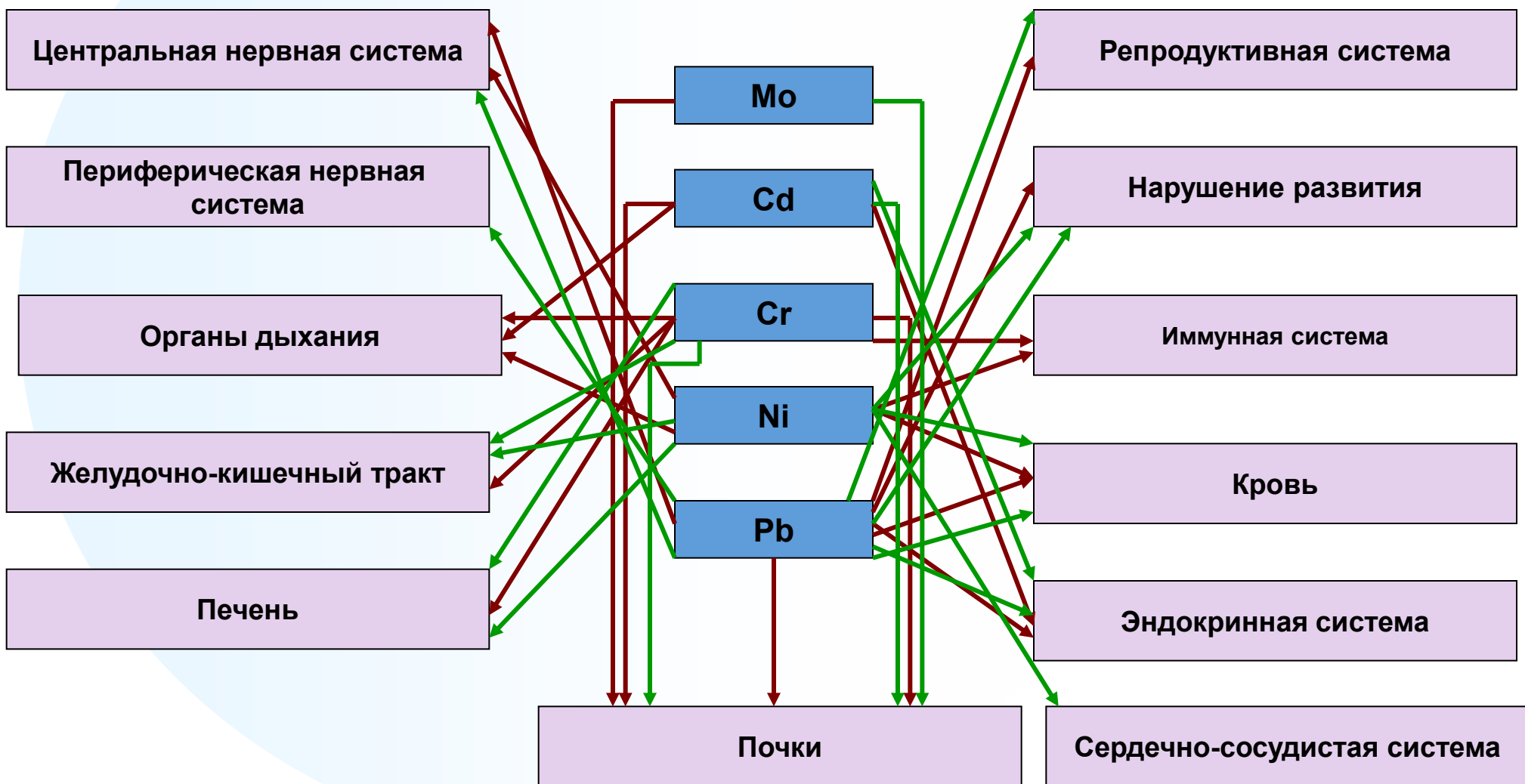


Группы сравнения:



Органы/системы-мишени

(согласно перечня приоритетных загрязнителей)



Основные механизмы воздействия



Программа клинико-лабораторного обследования детского населения

- ❖ **Эпидемиологические исследования на сравниваемых территориях** (заболеваемость, смертность, рождаемость, частота и динамика ВПР; 25-35 предшествующих лет; анализ отчетной формы 12, данных ФОМС)
- ❖ **Медико-социальное анкетирование** по специализированной анкете
- ❖ **Эпидемиологические исследования целевых групп** (распространность хронической соматической патологии, острой инфекционной заболеваемости с учетом выполнения графика вакцинации)
- ❖ **Соматометрические исследования** (оценка показателей физического развития детей, биологической зрелости)
- ❖ **Клиническое обследование** (педиатр, ЛОР-врач, невролог, гастроэнтеролог, эндокринолог) с оценкой:
 - состояния опорно-двигательного аппарата
 - функционального состояния сердечно-сосудистой системы
 - функционального состояния системы дыхания
 - функционального состояния вегетативной нервной системы
 - зрелости когнитивных функций

Программа клинико-лабораторного обследования детского населения

❖ **Функциональные исследования:**

- ЭКГ
- спирография
- риноманометрия
- кардиоинтервалография
- ультразвуковое исследование печени, билиарного тракта, поджелудочной железы
- ультразвуковое исследование щитовидной железы
- ультразвуковое исследование почек с определением состояния кровотока

❖ **Лабораторное обследование:**

- химико-аналитическое исследование крови
- скопия назального мазка
- общий анализ мочи, анализ мочи по Нечипоренко
- показатели эритроцитарного (развернутый), тромбоцитарного, лейкоцитарного звена
- биохимические показатели крови – АОА, МДА, СОД, ГлПО, глюкоза, общий белок, холестерин, ЛПВП, ЛПНП, триглицериды, щелочная фосфатаза, мочевины, креатинин, ионизированный кальций, АлАТ, АсАТ, гамма-ГТ
- гормональный профиль – АКТГ, ТТГ, Т4 свобод., дофамин, серотонин, кортизол, адреналин, норадреналин
- β 2- микроглобулин
- энергетический обмен – цАМФ, цГМФ
- генетические исследования
- иммунологические исследования

Программа клинико-лабораторного обследования взрослого населения

- ❖ **Медико-социальное анкетирование** по специализированной анкете
- ❖ **Эпидемиологические исследования целевых групп**
(распространенность хронической соматической патологии)
- ❖ **Клиническое обследование** (терапевт, кардиолог, ЛОР-врач, невролог, гастроэнтеролог, эндокринолог) с оценкой состояния :
 - сердечно-сосудистой системы
 - системы дыхания
 - центральной и вегетативной нервной системы
 - почек
 - желудочно-кишечного тракта
 - эндокринной системы

Программа клинико-лабораторного обследования взрослого населения

❖ **Функциональные исследования:**

- ЭКГ
- спирография
- ультразвуковое исследование печени, билиарного тракта, поджелудочной железы
- ультразвуковое исследование щитовидной железы
- ультразвуковое исследование почек с определением состояния кровотока

❖ **Лабораторное обследование:**

- химико-аналитическое исследование крови
- общий анализ мочи, анализ мочи по Нечипоренко
- показатели эритроцитарного (развернутый), тромбоцитарного, лейкоцитарного звена
- биохимические показатели крови – АОА, МДА, глюкоза, общий белок, холестерин, ЛПВП, ЛПНП, триглицериды, щелочная фосфатаза, мочевины, креатинин, АлАТ, АсАТ, гамма-ГТ
- гормональный профиль – АКТГ, ТТГ, Т4 свобод., дофамин, серотонин, кортизол, адреналин, норадреналин
- β 2- микроглобулин
- генетические исследования
- иммунологические исследования

Программа клинико-лабораторного обследования родственников 2 линии

- ❖ **Эпидемиологические исследования в сравниваемых группах (заболеваемость)**
- ❖ **Медико-социальное анкетирование**
- **Генетические исследования**

Благодарю за внимание !