

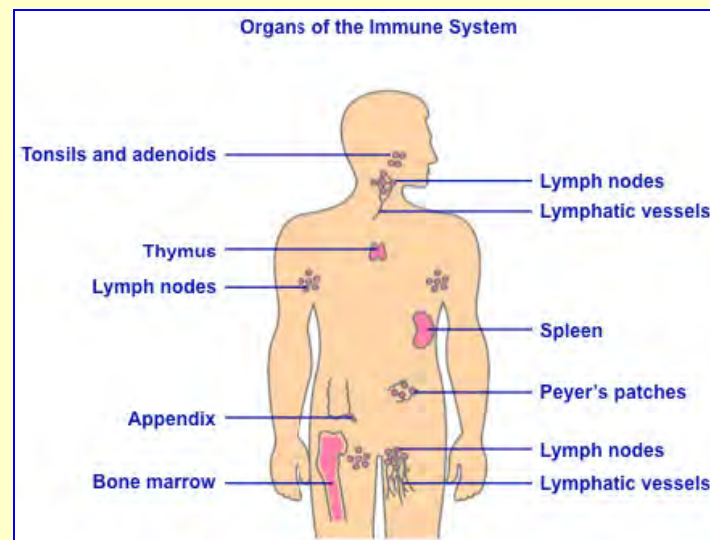


Результаты проекта DiNEH:

Иммунная система и ауто-иммунитет

- Иммунная система — защитная систем человека
- Процесс, который обеспечивает выживание человека и поддерживает гомеостатическое состояние после инфекции
- Ранние маркеры, выработанные имунными клетками, показывают изменения в их распределении и активности
- Аутоиммунные забаливания — состояния, в результате расстройства здоровой имунной системы, которое сопровождается повышенной активностью и повышенной выработкой антител против собственных органов и тканей.
- Исследования Ферналд(Огайо) – обнаружили взаимосвязь между воздействием урана и заболеванием системной красной волчанкой-- хроническое воспалительное заболевание

http://www.rheumatology.org/About/Newsroom/PressReleases/Uranium_Exposure_Linked_to_High_Lupus_Rates_in_Community_Living_Near_a_Former_Refinery/



Examples of autoimmune diseases include rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel diseases, systemic lupus erythematosus, psoriasis, scleroderma, and autoimmune thyroid diseases.

See,
<http://thyroid.about.com/od/thyroidbasics/thyroid101/l/blexamplesa.htm>

Исследования ответа иммунной системы человека среди участников DiNEH: методы



Dr. Erdei supervises processing of blood samples.

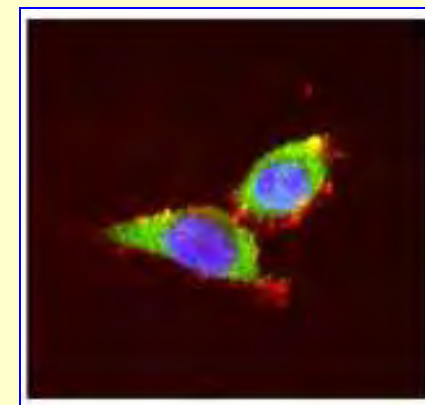
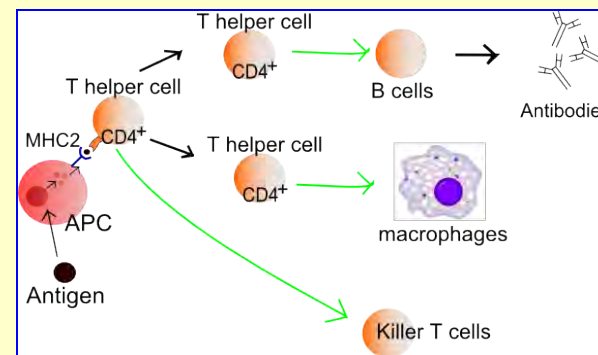
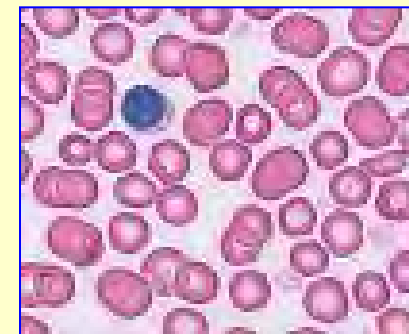
- Охарактеризовали иммунные клетки и популяции лимфоцитов
- Клеточные изменения проанализированны у 69 участников проекта DiNEH (из 268 человек, у которых брали биологические пробы)
- Оценивали продукцию определённых белков, так называемых цитокинов
 - у всех 268 участников были проанализированы 13 важных цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α , INF- γ , GM-CSF
- Описали и установили распространённость выработки аутоантител к обычным клеточным антигенам (положительные АНА + СКВ и особые аутоантитела в соединительно-тканые специфические аутоантитела)



Результаты проекта DiNEH :

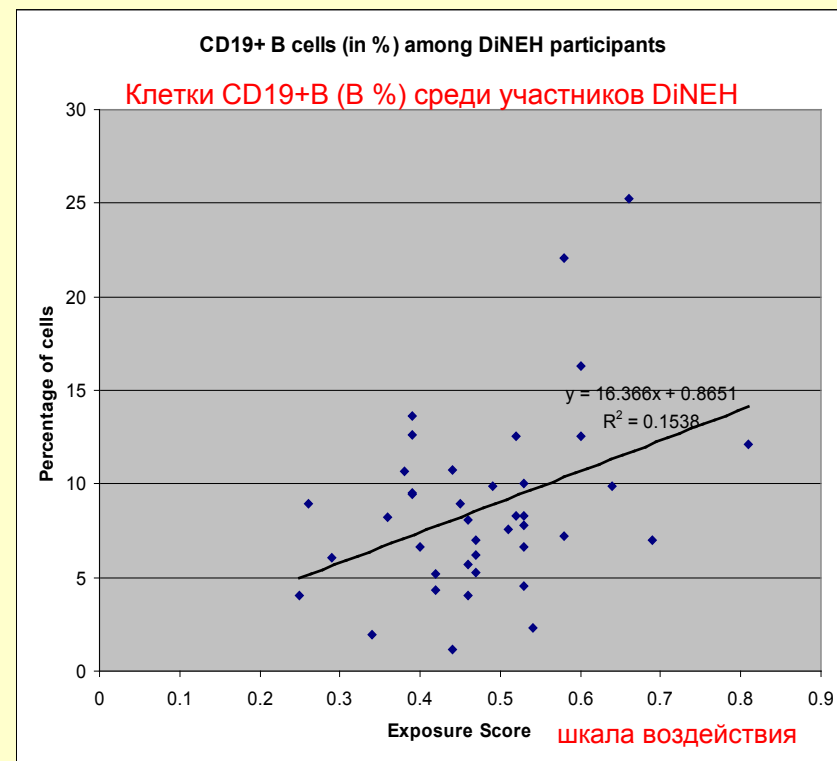
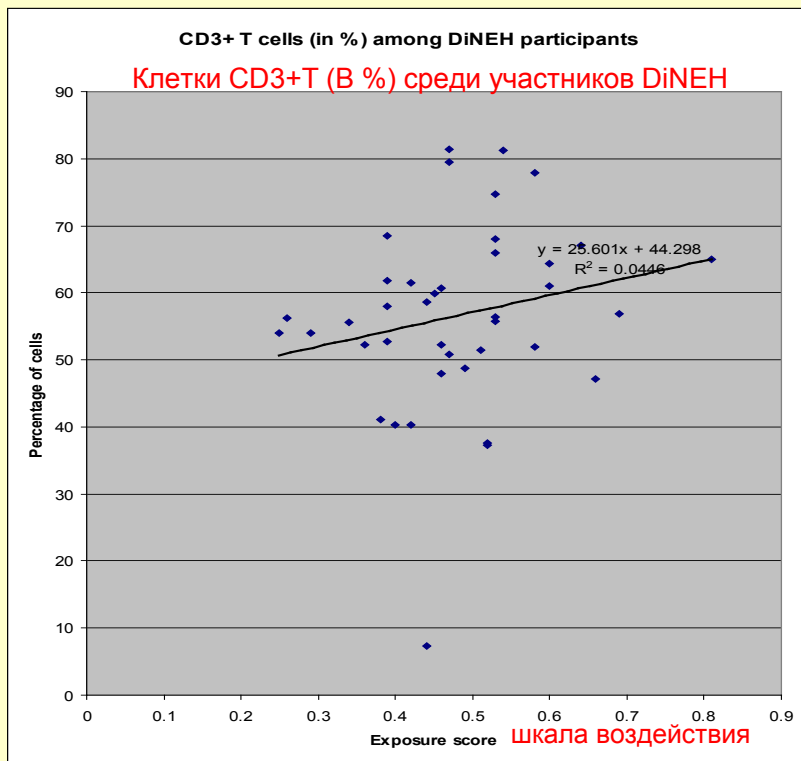
Показатели Проточной Цитометрии*

- Популяция лимфоцитов из проб крови могут быть проанализированы одновременно; разделение клетки и лизис не требуются
- Использовали Becton Dickinson Simultest IMK Plus лимфоцитный комплект
- Измеряли 6 клеточных популяций:
 - Т-клетки (CD3+), Т-хелперы (CD4+), Т-супрессоры (CD8+);
 - В-клетки (CD19+)
 - Ген гистосовместимости HLA-DR+ активация клеток на Т-клетках
 - В-клетки и другие типы клеток HLA-DR+ выражения
 - NK-клетки («натуральные киллеры») (CD3-/CD16+/CD56+)



***Проточная Цитометрия** Это лазерные, биофизические технологии, которые используются в счёте клеток, хранении клеток, выявлении биомаркеров и страительство белков, путём приоставления клеток в потоке жидкости и пропусканием их через электронный аппарат для обнаружения

Иммунные нарушения ассоциированные с воздействием урана



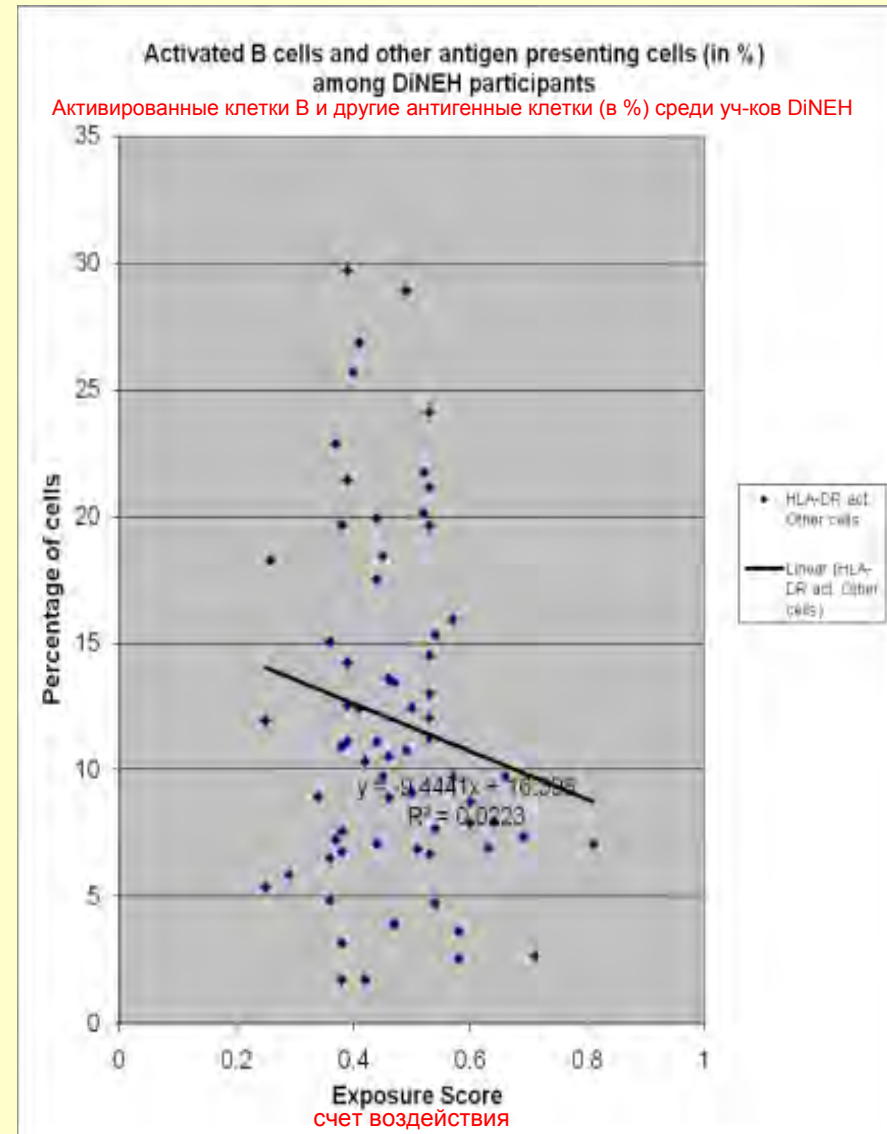
- Среди Навахо обнаружен более низкий уровень Т-клеток по сравнению с белой расой
- Обнаружен повышенный процент активированных Т-клеток ассоциируемый с близостью проживания и контактом с урановыми отходами

- Среди Навахо обнаружен более низкий уровень В-клеток по сравнению с белой расой
- В-Клетки показали аналогичную реакцию на влияние урана подобно Т-клеткам (слева)
- ОДНАКО→

Проект DiNEH -- Результаты Проточной Цитометрии II

Нарушение иммунного ответа, связанное с воздействием Урана

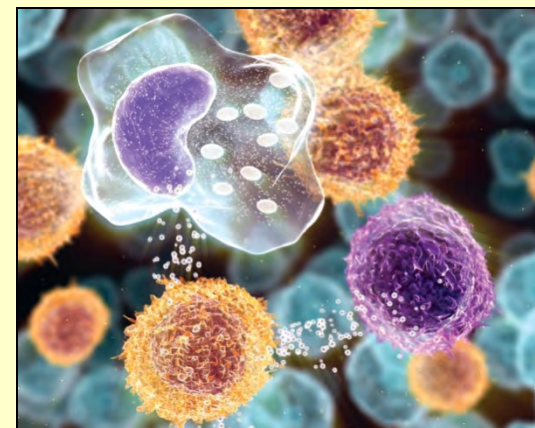
- Пониженный процент активированных В-клеток, связанный с близостью проживания к отходам урановых шахт (справа)
- **В здоровой иммунной системе, Т-клетки и В-клетки работают совместно— предпологаемые изменения должны наблюдаться в одном и том же направлении**
- Это разъединение Т-клеток и В-клеток показывает измененную иммунную реакцию в этой группе участников *подверженной урановому воздействию*
- Это приводит к пониженному уровню выработки защитных антител и нарушению иммунного ответа.



Serum cytokine measurements



- **Cytokines** defined: Diverse group of non-antibody proteins that act as mediators between cells and regulators of immune processes
<http://pathmicro.med.sc.edu/mobile/m.immuno-13.htm>
- Applied xMAP multiplexing technology (50 different proteins can be measured all at once), magnetic bead-based detection, high sensitivity assay, detects proteins circulated at very low concentration (pg/ml) in the blood stream
- Detection of 13 human serum cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF)
- Uses only 25 μ l of serum sample/participant, not too much to collect, community-based research!
- Complex task: *cytokine production indicative of the active T cell populations, Th1 and Th2 balance, presence of an inflammatory response, that can be associated with exposures to various metals and metal mixtures*



Source: <http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2013/01/research-cytokines-and-progression.html>

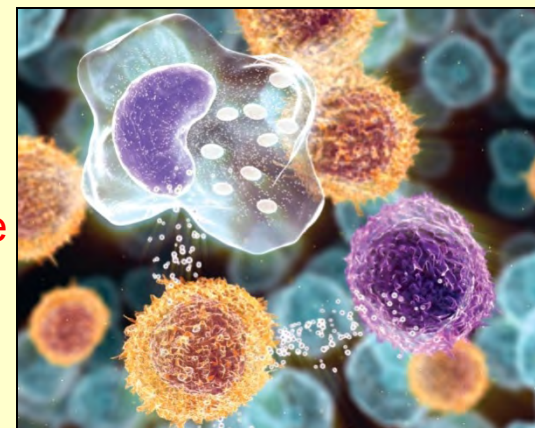


Результаты Проекта DiNEH



Показатели сывороточных цитокинов

- **Цитокины** (определение): Разнообразная группа (не-антительных) белков, которые являются проводниками между клетками и регуляторами иммунных процессов
 - <http://pathmicro.med.sc.edu/mobile/m.immuno-13.htm>
- **Использование комплексной технологии xMAP, (magnetic bead-based detection) выявления на очень низком уровне концентрации (pg/ml) высоко-чувствительный анализ**
- **Выявление 13 цитокинов человека (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, INF- γ , TNF- α , и GM-CSF)**
- **Используется только 25 μ l сыворотки на пробу / участника**
- **Комплексный анализ: продукция цитокинов показывает активацию T-клеток, Th1 и Th2 баланс, присутствие воспалительной реакции, которое возможно ассоциируется с влиянием различных металлов и смесей металлов**



Source: <http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2013/01/research-cytokines-and-progression.html>



Воздействие природного урана и выработка цитокинов

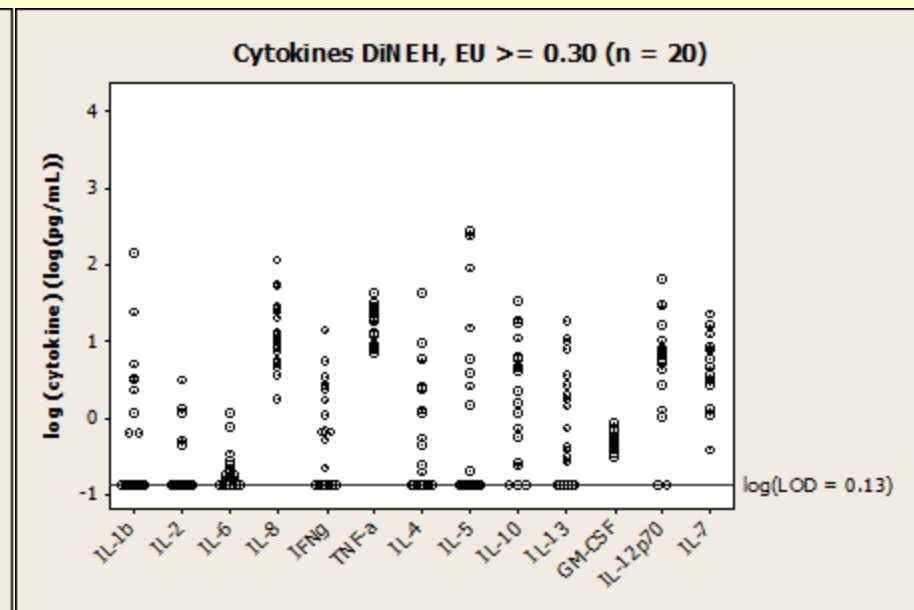
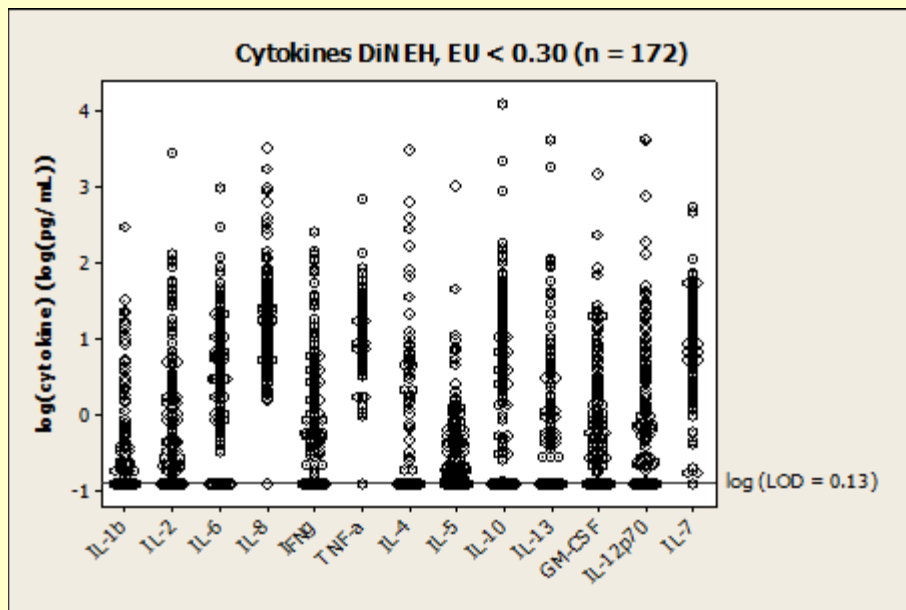


График (а) показывает уровень цитокинов у участников (логарифмическая шкала) с низким показателем EU (Природного Урана), меньше контакта и действий ассоциирующихся с шахтными отходами

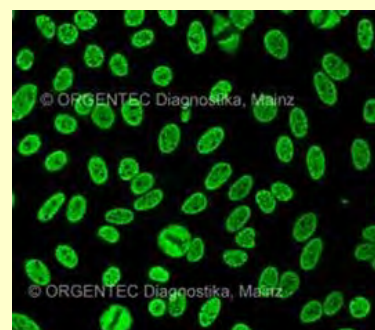
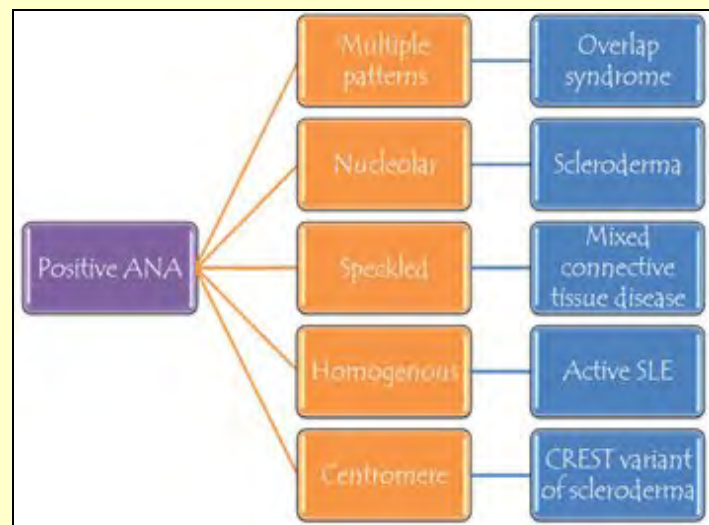
График (б) Была обнаружена пониженная концентрация цитокинов среди людей проживающих вблизи с заброшенными урановыми шахтами или их отходам и было больше сообщений о деятельности, приводящей в контакт с отходами, с присутствием смеси многих металлов.



Выработка Антител и их выявление

243 пробы проанализировано в IHS LabCorp in Phoenix, AZ (лаборатории по клинической диагностике):

- Анализы крови собраны в сотрудничестве с NAIHS/CUE-JTH* программой медицинского мониторинга
- Тестирование Антиядерных Антител (ANA)
 - Флуоресцентное окрашивание и микроскопия (традиционный метод) или новые, более быстрые технологии
- После получения позитивных результатов, была протестирована специальная панель аутоантител у 119 человек с использованием проточной цитометрии-основанной на **microbead** анализе микрочастиц.
 - Положительный результат специфических антител может указывать на присутствие заболеваний соединительной ткани, и Шэгрена синдрома (Sjögren's syndrom)



**NAIHS/CUE-JTH = Navajo Area Indian Health Service, Community Uranium Exposure-Journey To Healing program, initiative to provide medical monitoring to U-exposed Navajos with medical needs.*

Выработка Антител и их Выявление: результаты лаборатории LabCorp



- Положительные Антиядерные Антитела (ANA) были у 48% участников Dine, что в 3.5 *раза больше, чем* в общей популяции (13.8%,)
 - * ANA используются в диагностике некоторых аутоиммунных заболеваний
 - * Положительные ANA показывают изменения нормального иммунного ответа
- Технологии используемые для выявления **ANA** широко отличаются среди разных лабораторий
- Известно, что положительные **ANA** увеличиваются с возрастом
- **Высокий титр** указывает на возможность диффузного заблывания **соединительной ткани** если присутствуют их клинические симптомы
- Ложно-положительные результаты встречаются у здоровых доноров крови и у пациентов с хронической заболеваемостью печени, **с опухалями**, или с активацией хронической инфекции

Результаты специальной панели антител

- Положительные ANA, считались если, по крайней мере был хотя бы один положительный результат специфических Ab(антител) (a/t), , положительные SS-A, SS-B встречались наиболее часто.

Выработка Антител и их Выявление в лаборатории UNM



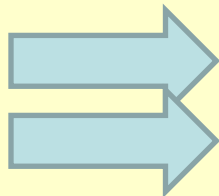
- В лаборатории UNM (в сотрудничестве с Проф. Бобом Рубиным)
- Эти специфические антитела были выработаны Др. Рубиным для того, чтобы различить выработку антител, связанную с воздействием окружающей среды или же генетически обусловленную
- **Иммуно-ферментный анализ выполнялся для выявления:**
 - Анти-ДНК (одно-спиральная ДНК) (Ab (a/t) выработанные к собственному генетическому материалу, одно-спиральная, не связана с болезнью), (свидетельствующая об апоптозе клеток)
 - Анти- ДНК (двухспиральная ДНК)(Ab против полного генетического материала), связана с системной красной волчанкой (СКВ)
 - Антитела к Гистону (Ab к белку строящему генетический материал)
 - Анти-хроматин (Ab (a/t) ко всему белку и к структуре ДНК, и к ядру)



Причины:

влияние металла → увеличение реакции окисления, (apoptosis) апоптозу клетки

Усиление апоптоза ведёт к увеличению количества антигенов → увеличение продукции антител



Выработка Антител и их выявления : результаты лаборатории UNM



- Процент участников с аутоантителами превышающий ± 2 SD(2 стандартных отклонения) для теста ELISA
 - денатурированная ДНК: 16.1 %
 - нативное ДНК: 4.5%
 - Специфический гистон: 1.9%
 - Антигены Хроматина: 3.7%

- Клиническая Значимость:
 - (двухспиральное) анти-нативное ДНК должны быть 0
 - Люди с позитивным ДНК будут проверены, используя медицинские заключения

- Специфические антитела к хроматину Ab сильно чувствительны к СКВ (системная красная волчанка)

Обсуждение Результатов и Выводы



- У участников проекта Динэ наблюдается в 3.5 раза повышенный уровень АНА (antinuclear antibodies), по сравнению с популяцией США. Это показывает, что большая часть населения Навахо имеет нарушенный иммунный ответ.
- Новые эксперименты с пробой сыворотки в Исследовании Рождаемости в Навахо показывает, что молодые члены общества Навахо (средний возраст 26 лет)—подобно более пожилым членам Навахо в проекте DiNEH—производят АНА аутоантитела в более высокой степени по сравнению со средним общенациональным уровнем США (20% против 13.8%).
- Восполительные процессы присутствуют среди людей с низкой вычислительной шкалой, но сильное подавление цикатинов было определено среди группы участников проекта DiNEH, наиболее подверженной влиянию

Планы на будущее



- Чтобы подтвердить результат, необходимо провести подобный анализ (*in vitro*) и провести исследования на животных
- Детальное анализирование клеточной активности/подавления в разных популяциях лимфоцитов
- Необходимо проанализировать популяции Th17 и Treg и их взнос в аутоиммунные реакции в последующих исследованиях
- Установить биомаркеры переносов урана для того, чтобы понять фактическую нагрузку на организм от урана и других металлов