

ЭКОЛОГИЯ

УДК 613.954:502.3+616.097

**О. В. Долгих^{a,b}, А. В. Кривцов^a, К. Г. Старкова^a, О. А. Бубнова^a, Е. А. Отавина^a,
И. Н. Аликина^{a,b}, Н. В. Безрученко^{a,b}, М. А. Гусельников^b**

^a ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

**ТЕХНОЛОГИИ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕСРЕДОВЫХ
ФАКТОРОВ НА ЗДОРОВЬЕ НАСЕЛЕНИЯ**

Проведена разработка технологий, принципов и методических подходов идентификации генетических маркеров ранних нарушений иммунного статуса населения в условиях хронической экспозиции техногенными факторами. Выполнена ДНК-детекция методами ПЦР и секвенирования полиморфных вариантов регуляторных и экзонных областей 37 генов. Предложены подходы к проведению генетического тестирования вероятности развития иммунных нарушений, заключающихся в идентификации следующих групп полиморфизмов: вариантных генов ферментов 1 и 2 фазы детоксикации; генов белков, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях и в обменных процессах; генотипирование предрасположенности к онкопролиферативным состояниям; определение иммуногенетических маркеров. Выявлены SNP (single nucleotide polymorphism) -особенности у детей в условиях экспозиции стронцием и нитратами, которые характеризовались избыточной распространенностью вариантных аллелей генов цитохрома р450, эндотелиального фактора роста (VEGF) и копропорфириногенаксидазы (CPOX). Использование современных биомедицинских технологий для типирования вариантных генов позволяет установить кандидатные полиморфизмы, реализующиеся в конкретных экологических условиях.

Ключевые слова: секвенирование; полиморфизм генов; стронций.

**O. V. Dolgikh^{a,b}, A. V. Krivtsov^a, K. G. Starkova^a, O. A. Bubnova^a, E. A. Otavina^a,
I. N. Alikina^{a,b}, N. V. Bezruchenko^{a,b}, M. A. Guselnikov^b**

^a FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

**TECHNOLOGIES OF IMMUNOGENETIC STUDIES FOR
EVALUATION OF THE ENVIRONMENTAL FACTORS
INFLUENCING THE PUBLIC HEALTH**

The aim of this study is to develop the technologies, principles and methodological approaches for identification of the genetic markers of early disturbances in immune status of the population in conditions of chronic exposure to man-made factors. The DNA detection by PCR assay and sequencing of the polymorphic variants of the regulatory and exon regions of 37 genes, including, CYP 1A1, MTHFR, APO-E, CPOX, VEGF, NO-synthase, MMP, FAS, FOXp3, TNFalfa, HLA DR, p53, BRCA1, etc. were executed. The offered methodical approaches include the identification of the following groups of polymorphism: enzymes of variant genes of the 1st and 2nd detoxification phase; genes of proteins involved both in metabolic processes and in pathogenesis of the target organs' diseases (matrix metal loproteinase gene, endothelial growth factor gene) induced by technogenic factors; genotyping of the predisposition to cancer proliferative status; detection of the immunogenetic markers. The SNP-peculiarities in children living in the conditions of exposure to strontium and nitrates have been identified. They were characterized by the excessive incidence of the variant alleles of cytochrome p450 genes, endothelial growth factor (VEGF) and coproporphyrinogen oxidase (CPOX). The modern biomedical technologies for the typing of the variant gene allow identifying the candidate polymorphisms capable to occur in specific environmental conditions.

Key words: sequencing; gene polymorphism; strontium.

В условиях антропогенно измененной экологической ситуации и хронического воздействия техногенных факторов на человека возникают адаптационные

нарушения, ассоциированные прежде всего с иммунной системой, которые при соответствующей генетической детерминации уже в детском возрасте реали-

зуются в ранние донозологические нарушения состояния здоровья [Krzyzysniak et al., 1995; Fromigue, Hay, Barbara, 2009; Hurtel-Lemaire et al., 2009; Los et al., 2009; Caverzasio, Thouverey, 2011; Yang et al., 2011; Yurchenko, Shlapatska, Sidorenko, 2012; Венгеровский, Хлусов, Нечаев, 2014].

Для решения задач ранней диагностики и повышения эффективности профилактики развития процессов дезадаптации в условиях техногенной экспозиции актуальным является использование наукоемких современных биомедицинских технологий для идентификации генетических и иммунологических нарушений здоровья населения [Dolgikh et al., 2011; Зайцева, Устинова, Аминова, 2011; Долгих, Кривцов, Харахорина, 2012; Долгих и др., 2014; Зайцева и др., 2014].

Целью настоящих исследований являлась разработка технологий, принципов и методических подходов идентификации генетических маркеров ранних нарушений иммунного статуса населения в условиях хронической экспозиции техногенными факторами.

Материалы и методы исследования

ДНК-детекция включала исследования полиморфных вариантов изучаемых генов с использованием методики ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию и детекцию осуществляли с помощью термоциклера CFX96, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе. Обработку полученных результатов проводили с помощью аллельной дискриминации. Данная методология позволяет различать гомозиготную замену от гетерозиготы и нормальной гомозиготы.

Проведена диагностика SNP на уровне ДНК регуляторных и экзонных областей 37 генов, в том числе, ген цитохрома P450 (CYP1A1), ген метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), ген аполипопротеина E (APOE), ген копропорфириноген оксидазы (CPOX), ген васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF), ген эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), ген матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9), цитокиновый рецептор, запускающий апоптоз (FAS), транскрипционный фактор P3 (FOXP3), ген фактора некроза опухоли альфа (TNF α), главный комплекс гистосовместимости (HLA-DRA), ген супрессор опухолевого роста P53 (TP53), гены рака груди 1 и 2 (BRCA1, BRCA2) и др.

При выполнении генетического диагностического обследования проведено секвенирование ДНК 6 детей в возрасте от 7 до 9 лет, постоянно проживающих в эндемичной зоне, характеризующейся повышенным содержанием стронция и нитратов в питьевой воде. Метод секвенирования позволил одновременно генотипировать ДНК по

всем изучаемым генам. Библиотека зондов была подготовлена заранее по 27 интересующим нас генам и включала в себе около 2 млн олигонуклеотидных зондов, комплементарных интересующим нас областям. Исследование включало расшифровку значимых полиморфизмов экзонов и регуляторных областей.

Проведено изучение полиморфизма гена цитохрома P450 (CYP1A2), генов интерлейкина (IL17F, IL17D, IL17C, IL17B), толл-подобного гомологичного гена (TLR4), обратной транскриптазы теломеразы (TERT), FAS, FOXP3, TP53, главного комплекса гистосовместимости (HLA-DRB1), MTHFR, глутатиона s-трансферазы альфа (GSTA), гена сульфотрансферазы (SULT1A1), глюкокортикоидного рецептора (NR3C1), VEGF, цинк – металлопептидазы (ZMPSTE), гена рецептора эстрогенов (ESR1), гена рецептора дофамина (ANKK1).

Технология выполнения секвенирования включала в себя несколько этапов: выделение ДНК человека из биологического материала (кровь), создание библиотеки ДНК; этапы амплификации библиотеки ДНК и гибридованной ДНК; проведение эмульсионной ПЦР; постановка секвенирования на приборе GS Junior (Швейцария).

Дизайн исследований включал в себя анализ следующих сочетаний предметов и объектов воздействия техногенных факторов: а) контингент риска, характеризующийся наличием экспозиции стронцием и нитратами, сопоставляемый с контингентом сравнения, проживающим в условиях минимальной экологической нагрузки; б) различные стратификационные уровни выборки – индивидуальный, популяционный, система «родители-дети»; в) биологические уровни анализа – клеточный уровень, молекулярный уровень.

Результаты и их обсуждение

Предложены методические подходы к проведению генетического тестирования вероятности развития иммунопатологии, заключающиеся в идентификации следующих групп полиморфизмов: вариантных генов ферментов 1- и 2-й фазы детоксикации (CYP1A1, GSTA); генов белков, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях (MMP9, VEGF) и обменных процессах; генотипирование предрасположенности к онкопролиферативным состояниям; определение иммуногенетических маркеров. Максимальное число полиморфно измененных участков генов выявлено в группе генов детоксикации, причем наибольший полиморфизм свойственен SULT1A1 и MTHFR, а наиболее консервативными из этой функциональной системы оказались SOD и CPOX. Менее полиморфно изменены гены систем иммунной и нервной регуляции. При этом наибольшему полиморфизму из этой системы подтвержден HLA-DRB1,

что объяснимо с позиций регуляции иммунного ответа, многие же гены иммунного ответа и онкогенеза достаточно консервативны (табл. 1).

В структуре мутаций максимальной полиморфностью обладали гены детоксикации – 37.5% из всей выборки генов, второй ранг занимали гены

обмена 27.5%, замены в генах иммунорегуляции и соматических генах выражены в меньшей степени. Анализ общего количества точечных замен позволил определить среднее количество мутаций на одного человека по 25 кандидатным генам, которое составило 210 замен.

Таблица 1

Пример оформления таблицы и заголовка к ней для того же объекта K_2SO_4

Ген	Количество полиморфизмов в сравнении с референсной последовательностью					
	1 п	2 п	3 п	4 п	5 п	6 п
MTHFR	13	13	13	14	23	23
CLCN6	0	1	0	0	1	1
ZMPSTE24	4	3	3	4	1	4
CPOX	1	8	7	8	8	10
TERT	9	5	14	3	6	5
IL17B	0	2	0	2	1	1
PPARD	4	6	4	5	5	1
VEGFa	2	4	3	2	8	5
IL17F	0	0	0	0	0	1
GSTA4	11	12	9	15	11	15
SOD	4	0	6	2	0	6
HLA-DRB1	45	19	6	0	15	10
NOS3	19	14	12	14	12	14
TLR4	0	1	1	1	2	2
ACTA2	1	1	1	2	0	0
FAS	0	4	8	5	7	9
SIRT3	9	12	8	12	8	1
SULT1A1	41	33	37	10	39	37

Примечание. CLCN6 – ген хлоридный канал 6, ACTA2 – ген актинин альфа2.

Методология секвенирования позволила количественно оценить генетическое закрепление точечных замен в системе «мать-ребенок». В случае постоянной экспозиции мутагеном не наблюдалась элиминация однонуклеотидных замен у потомства, либо выявлялось увеличение количества вариантных участков следующих генов: ген транскрипционного фактора P3, ген супрессор опухолевого роста, ген белка главного комплекса гистосовместимости, ген эндотелиального фактора роста, ген интерлейкина 17C (IL17C), ген сульфотрансферазы, ген теломеразы, ген белка сиртуина (SIRT), ген пролифератора пероксисом (PPARD), ген метилентетрагидрофолатредуктазы.

Тогда как условия, соотносимые с референтным уровнем мутагена в среде, характеризовались фиксацией у потомства материнских генетических вариаций только по генам IL17C, белка сиртуина и метилентетрагидрофолатредуктазы, а также цитокинового рецептора, запускающего апоптоз – FAS. Причем общее число нуклеотидных замен по анализируемым генам у неэкспонированного ребенка было в 2 раза ниже экспонированного мутагеном.

Установлены негативные ассоциации полиморфизма генов детоксикации (CYP1A1, CPOX) характеризующиеся повышенной в 2 раза над

группой контроля распространенностью гетерозиготного варианта гена CYP1A1, а также минорного гомозиготного варианта гена CPOX, при отсутствии патологического аллельного варианта CC в группе контроля (табл. 2).

Таблица 2

Особенности генетического полиморфизма у детей, экспонированных стронцием и нитратами (встречаемость генотипов,%)

Ген	Генотип	Группа наблюдения	Группа сравнения
VEGF	GG	49	62
	GC	42	32
	GG	9	6
CYP1A1	GG	87	94
	GA	13	6
	AA	0	0
CPOX	AA	74	69
	CA	23	31
	CC	3	0

Для полиморфизма генов пролиферации эндотелия характерно преобладание как минорной гомозиготы (в 1.5 раза), так и гетерозиготного генотипа (в 1.3 раза) по сравнению с теми же показателями в группе контроля. Выявленные изменения

иммунных показателей у обследованных детей развиваются на фоне негативной генетической вариативности, связанной с приоритетными генами иммунной регуляции и детоксикации.

Заключение

Использование современных биомедицинских технологий для типирования вариантных генов позволяет установить кандидатные полиморфизмы, реализующиеся в конкретных экологических условиях.

Библиографический список

- Венгеровский А.И., Хлусов И.А., Нечаев К.А. Молекулярные механизмы действия бисфосфонатов и стронция рanelата // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77 (9). С. 43–46.
- Долгих О.В. и др. Иммунная система и ее генетические ассоциации у детей при комбинированном внешнесредовом воздействии // Вестник КазНМУ. 2014. № 3(1). С. 60–63.
- Долгих О.В. и др. Особенности иммунной и генетической дезадаптации у детей в условиях избыточной гаптенной нагрузки // Российский иммунологический журнал. 2014. № 8(17). С. 299–302.
- Долгих О.В., Кривцов А.В., Харахорина Р.А. Иммунные и ДНК-маркеры воздействия техногенной нагрузки // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. № 4. С. 240–241.
- Зайцева Н.В. и др. Особенности иммунной регуляции у детей в условиях комбинированного внешнесредового воздействия металлов и органических соединений // Академический журнал Западной Сибири. 2014. Т. 10, № 2. С. 107–108.
- Зайцева Н.В., Устинова О.Ю., Аминова А.И. Гигиенические аспекты нарушения здоровья детей при воздействии химических факторов среды обитания. Пермь: Кн. формат, 2011. 489 с.
- Caverzasio J., Thouverey C. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth // Cell. Physiol. Biochem. 2011. Vol. 27, № 3–4. P. 243–250.
- Dolgikh O. et al. Molecular markers of apoptosis in industrial workers // In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. 2011. Vol. 25, № 3. P. 523–524
- Fromigue O., Hay E., Barbara A. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate // JCM. 2009. Vol. 13 (8B). P. 2189–2199.
- Hurtel-Lemaire A.S. et al. The calcium-sensing recep-

tor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways // JBC. 2009. Vol. 284. P. 575–584.

- Krzystyniak K et. al. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity // Environ Health Perspect. 1995. Vol. 103, suppl 9. P. 17.
- Los M. et al. Switching Akt: From survival signaling to deadly response // BioEssays. 2009. Vol. 31 (5). P. 492–495.
- Yang F. et al. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling // Stem cells. 2011. doi: 10.1002/stem.646.
- Yurchenko M., Shlapatska L.M., Sidorenko S.P. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome // Exp. oncol. 2012. Vol. 34 (3). P. 200–2011.

References

- Vengerovskiy A.I., Khlusov I.A., Nechaev K.A. [Molecular action mechanisms of bisphosphonates and strontium ranelate]. *Ekspierimentalnaja i kliničeskaja farmakologija*. No. 77 (9) (2014): pp. 43-46. (In Russ.).
- Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Krivtsov A.V., Gorshkova K.G., Lanin D.V., Bubnova O.A. [The immune system and its genetic associations in children under combined environmental influence]. *Vestnik KazNMU*. No. 3(1) (2014): pp. 60-63. (In Russ.).
- Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Luzhetskiy K.P., Andreeva E.E. [Peculiarities of immune and genetic disadaptation in children under excess haptenic load]. *Rossiyskiy immunologičeskij žurnal*. No. 8(17) (2014): pp. 299-302. (In Russ.).
- Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Kharakhorina R.A. [Immune and DNA-markers of the influence of man-caused load]. *Vestnik Ura'lskoj medicinskoj akademičeskoj nauki*. No. 4 (2012): pp. 240-241. (In Russ.).
- Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Gorshkova K.G., Predeina R.A., Lanin D.V. [Peculiarities of the immune regulation in children under combined environmental influence of metals and organic compounds]. *Akademičeskij žurnal Zapadnoj Sibiri*. V. 10 No. 2 (2014): pp. 107-108. (In Russ.).
- Zaitseva N.V., Ustinova O.Yu., Aminova A.I. *Gigieničeskie aspekty narušenija zdorovija detej pri vozdeistvii chimičeskich faktorov sredy obitaniya* [Hygienic aspects of children's health disorders under the influence of environmental chemical factors]. Perm, Knižnyj format Publ., 2011. 489 p. (In Russ.).
- Caverzasio J., Thouverey C. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth. *Cellular Physiology and Biochemistry*. No. 27 (3-4) (2011): pp. 243-250.
- Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. Molecular markers of apoptosis in industrial workers. *In*

- vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research*. V. 25 No. 3 (2011): pp. 523-524.
- Fromigie O., Hay E., Barbara A. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. No. 13 (8B) (2009): pp. 2189-2199.
- Hurtel-Lemaire A.S., Mentaverri R., Caudrillier A., Cournaire F., Wattel A., Kamel S., Terwilliger E.F., Brown E.M., Brazier M. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. No. 284 (2009): pp. 575-584.
- Krzystyniak K. et. al. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environ Health Perspect*. No. 103, suppl. 9 (1995): p. 17.
- Los M., Maddika S., Erb B., SchulzeOsthoff K. Switching Akt: From survival signaling to deadly response. *BioEssays*. No. 31 (5) (2009): pp. 492-495.
- Yang F., Yang D., Tu J., Zheng Q., Cai L., Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem cells*. (2011): doi: 10.1002/stem.646.
- Yurchenko M., Shlapatska L.M., Sidorenko S.P. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome. *Experimental oncology*. No. 34 (3) (2012): pp. 200-2011.

Поступила в редакцию 10.10.2016

Об авторах

Долгих Олег Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» 614045, Пермь, ул. Монастырская, 82; oleg@fcrisk.ru; (342)2363930 профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Кривцов Александр Владимирович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82; krivtsov@fcrisk.ru; (342)2363930

Старкова Ксения Геннадьевна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунологии и аллергологии ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82; skg@fcrisk.ru; (342)2363930

Бубнова Ольга Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, аспирант ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

Отавина Елена Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии, аспирант ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

About the authors

Dolgikh Oleg Vladimirovich, Doctor of Medicine, head of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies". 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045; oleg@fcrisk.ru; (342)2363930 Professor of the department of Human Ecology and Life Safety Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Krivtsov Aleksandr Vladimirovich, Candidate of Medicine, Head of the department of immunogenetics FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies". 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045; krivtsov@fcrisk.ru; (342)2363930

Starkova Kseniya Genadievna, Candidate of Biology, Head of the department of immunology and allergology FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies". 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045; skg@fcrisk.ru; (342)2363930

Bubnova Olga Alekseevna, junior researcher laboratory of immunogenetics, postgraduate FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies". 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045

Otavina Elena Alekseevna, junior researcher laboratory of immunology and allergology, postgraduate FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies". 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045

Аликина Инга Николаевна, лаборант-исследователь лаборатории иммуногенетики
ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН»
614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82
магистрант биологического факультета
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Безрученко Надежда Владимировна, лаборант-исследователь лаборатории иммунологии и аллергологии
ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН»
614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82
магистрант биологического факультета
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Гусельников Максим Анатольевич, магистрант биологического факультета
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Alikina Inga Nikolaevna, laboratory researcher of the department of immunogenetics
FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies".
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045
graduated student of biological faculty
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Bezruchenko Nadejda Vladimirovna, laboratory researcher of the department of immunology and allergology
FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive health Risk Management Technologies".
82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045
graduated student of biological faculty
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Guselnikov Maksim Anatolievich, graduated student of biological faculty
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990