

ISSN 1028-7221

Том 9 (18), Номер 2 (2)

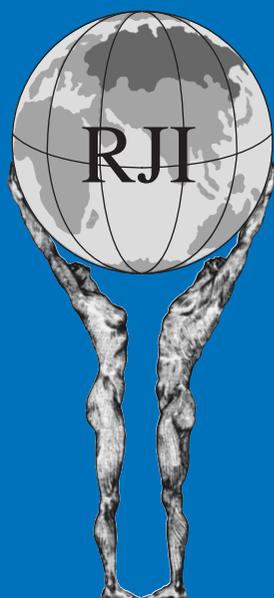
Август 2015

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES



<http://www.naukaran.ru>



НАУКА

ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА МЕТОДОМ ТАРГЕНТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ЖИДКОСТНЫХ БИОЧИПАХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

Долгих О. В.^{1,2,3}, Зайцева Н. В.^{1,2,3}, Кривцов А. В.¹,
Бубнова О. А.^{1,2}

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; ²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; ³ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Методом таргентного секвенирования проведено исследование и расшифрована структура 27 генов человека. Был разработан специальный жидкостный биочип, позволяющий унифицировать исследования и сравнивать полученные данные с референсной последовательностью и данные индивидуумов между собой. Различия в полиморфизмах выявлены по более чем двумстам точкам у каждого отдельного индивидуума. Оценка вариабельности генов с использованием результатов сиквенса и ПЦР позволила выявить преимущественную полиморфность следующих генов: CYP1A2, TLR4, FAS, FOXP3, TP53, HLA DRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, отвечающих за особенности иммунорегуляции и детоксикации.

Ключевые слова: гены иммунорегуляции, секвенирование, стронций

Введение. Иммунная система является ключевым компонентом обеспечения адаптивности организма в измененных условиях среды обитания, при этом генетические особенности приоритетных иммунорегуляторных белков, могут служить важным показателем идентификации и прогнозирования состояния иммунной реактивности. Использование инновационных подходов в генотипировании, таких как секвенирование, обеспечивает высокий методический уровень и корректность полученных результатов [1-5].

Цель работы – дать оценку особенностям генетического полиморфизма методом таргентного секвенирования на жидкостных биочипах в условиях экспозиции стронцием.

Материалы и методы. Обследовано детское население (50 детей в возрасте от 3 до 11 лет) и взрослое население (36 человек), средний возраст $35,9 \pm 6,6$, постоянно потребляющие питьевую воду несоответствующего качества по содержанию стронция. Группу сравнения составили 53 ребенка и 38 человек взрослого населения из «условно чистого» района. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, соматической заболеваемости и этносу.

ДНК человека выделяли из крови с помощью сорбентной технологии. Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику секвенирования (секвенатор Roche (454) Genome Sequencer, Швейцария) и ПЦР (термоциклер CFX96 «Биорад», США), в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени с помощью флуоресцентных меток. Секвенирование проводилось методом таргентного ресеквенирования на жидкостных биочипах с отбором генов на этапе ЛМ-ПЦР, когда в исходной библиотеке амплифицируются определенные последовательности. Библиотека зондов была подготовлена заранее по 27 интересующим нас генам и включала в себе около 2 млн. олигонуклеотидных зондов, комплементарных интересующим нас областям. Проведено изучение полиморфизма генов CYP1A2, IL17F, IL17D, IL17C, IL17B, TLR4, TERT, FAS, FOXP3, TP53, HLA DRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, NR3C1, VEGF, ZMPSTE, ESR1, ANKK1. Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт». Данная программа служит для расчета статистических

параметров исследований “случай-контроль”, использующих SNP (однонуклеотидные полиморфизмы). Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Зависимости между признаками оценивали методом корреляционно-регрессионного анализа. Достоверными считались различия между группами при $p < 0,05$. Определение металлов в биосредах детей исследовали методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Результаты исследования. При исследовании качества воды хозяйственно-питьевого водоснабжения на обследуемой территории показано превышение установленных нормативов по стронцию на уровне 1,3 ПДК, а относительно показателей территории сравнения в 6 раз. В крови взрослых и детей обнаружено превышение концентрации стронция в 3,5-4,0 раза соответственно относительно группы сравнения.

Оценка вариабельности генов с использованием результатов сиквенса выявила различия в полиморфизмах по более чем двумстам точкам у каждого отдельного индивидуума. Оказалось, что значительный уровень полиморфизма выявлен в системе генов детоксикации и иммунорегуляции, причем наибольший полиморфизм свойственен генам сульфотрансферазе 1A1 (SULT1A1), HLADRB1, FAS, FOXP3. При этом выявлена достоверная зависимость количества мутаций от концентрации стронция в крови ($R^2=0,59$; $p=0,00016$), которое возрастало в среднем с 210 нуклеотидных замен в группе сравнения до 226 в группе наблюдения. По результатам секвенирования

проведенного на ограниченном контингенте (10 человек) выполнен анализ на полиморфность кандидатных генов методом ПЦР для всей выборки (таблица).

Результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили следующие нарушения: у детей-дошкольников по критерию распространенности минорного аллеля генов сульфотрансаминазы SULT1A1 и метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR, васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), гена дофаминавого рецептора ANKK1, супероксиддисмутазы SOD2, ген фактора некроза опухоли (TNF); у школьников критерию распространенности минорного аллеля генов глюкокортикоидного рецептора NR3C1, рецептора FOXP3, отвечающего за адекватность иммунных реакций, васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF); у взрослых по критерию распространенности минорного аллеля генов эстрогенового рецептора ESR1 и цинкметаллопептидазы ZMPSTE, васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), гена дофаминавого рецептора ANKK1, гена толл-подобного рецептора (TLR4) и гена транскрипционного фактора FOXP3.

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать использовать особенности методологии генотипирования нуклеотидных замен, заключающиеся в алгоритмической последовательности проведения сиквенса и ПЦР-типирования кандидатных генов. Результаты анализа полиморфизма генов в условиях повышенной экспозиции стронцием указывают на избыточную вариабельность генов CYP1A2, TLR4, FAS, FOXP3, TP53, HLADRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, от-

Таблица. Изменение распространенности вариантных аллелей генов у населения в условиях воздействия стронция (%)

Ген (ОНП)	Генотип/аллель	Группа наблюдения	Группа сравнения
FAS	CC	53	58
	TC	40	42
	TT	7*	0
	C	73	79
	T	27	21
FoxP3	TT	74	80
	TC	11	20
	CC	15*	0
	T	79	90
	C	21*	10

Примечание: * – разница достоверна относительно группы сравнения ($p < 0,05$)

вечающих за особенности иммунорегуляции и детоксикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцева Н. В., Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Вайсман Я. И. SNP-особенности у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции Вестник Башкирского университета. 2014, 19, 4, 1185-1188.
2. Noonan J. P., Coop G., Kudaravalli S., Smith D., Krause J., Alessi J., Chen F., Platt D., Pääbo S., Pritchard J. K., Rubin E. M. (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. Science 314, 1113-1118.
3. Goldberg S. M., Johnson J., Busam D., Feldblyum T., Ferreira S., Friedman R., Halpern A., Khouri H., Kravitz S. A., Lauro F. M., Li K., Rogers Y. H., Strausberg R., Sutton G., Tallon L., Thomas T., Venter E., Frazier M., Venter J. C. (2006). A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 11240-11245
4. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Лужецкий К. П., Андреева Е. Е. Особенности иммунной и генетической дезадаптации у детей в условиях избыточной гаптенной нагрузки // Российский иммунологический журнал. 2014, 8 (17), 3, 299-302
5. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Старкова К. Г., Лучникова В. А., Пирогова Е. А. Характеристика генотипов детей и взрослых, проживающих в условиях воздействия химических факторов риска. Анализ риска здоровью. 2015, 1, 55-59

PECULIARITIES OF THE DETECTION OF GENETIC POLYMORPHISM BY MEANS OF TARGET SEQUENCING ON LIQUID BIOCHIPS UNDER CONDITIONS OF STRONTIUM EXPOSURE

Dolgikh O. V., Zaitseva N. V., Krivtsov A. V., Bubnova O. A.

27 human genes were studied and their structure was decoded by means of target sequencing method. The special liquid biochip was developed which allows to unify the studies and to compare the received data to the reference sequence and individuals' data to each other. Differences in polymorphisms were found in over two hundred points in every single individual. The assessment of genes' variability using the sequence results and PCR allowed detecting the predominant polymorphism of the following genes: CYP1A2, TLR4, FAS, FOXP3, TP53, HLADRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1 which are responsible for the peculiarities of immunoregulation and detoxication.

Key words: immunoregulation genes, sequencing, strontium

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ИММУННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ ХЛОРОФОРМОМ

Долгих О. В.^{1,2,3}, Старкова К. Г.¹, Дианова Д. Г.¹,
Вдовина Н. А.¹, Лучникова В. А.¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; ²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; ³ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Особенности изменения иммунных показателей и регуляции апоптоза у детей в условиях повышенной концентрации в питьевой воде хлороформа определяются увеличением содержания IgE общего и специфического IgG к хлороформу, угнетением экспрессии CD25 и CD95 T-клеточных рецепторов, снижением интенсивности процесса апоптоза, ассоциированного с нарушением процессов его запуска через TNFR1 и Fas-рецептор, а также контролирующей функции белка p53.

Ключевые слова: CD-маркеры, апоптоз, хлороформ

 Авторский указатель

А		Зурочка А. В.	30
Абрамовских О. С.	22	Зурочка В. А.	30
Аклеев А. А.	3, 6	И	
Анисимов А. П.	120	Иванов С. А.	120
Б		К	
Базилян Э. А.	48	Калмантаева О. В.	120
Барышева О. Ю.	126	Кишкин А. М.	71
Безрученко Н. В.	110	Климов В. В.	35
Бейкин Я. Б.	53, 57	Козлов И. Г.	48
Блинова Е. А.	8	Колупаева И. Л.	37
Борисов А. Г.	42, 99	Колупаев В. А.	37
Бубнова О. А.	17	Копылов П. Х.	120
В		Костенко Е. И.,	40
Вдовина Н. А.	19, 110	Кошовкина Т. В.	35
Везикова Н. Н.	126	Кравченко П. Н.	126
Волошина М. А.	35	Кривцов А. В.	17, 110
Г		Кробинец И. И.	42, 99
Гапонов А. М.	11	Кудрявцев И. В.	42, 99
Гапонов М. А.	11	Кшнясев И. А.	80
Горбатов А. А.	120	Л	
Гребенчиков О. А.	11	Лабис В. В.	48
Гриценко В. А.	30	Лагерева Ю. Г.	53, 57
Д		Лучникова В. А.	19
Давыдова А. Я.	42	Ляпунов В. А.	60
Давыдова Е. В.	14	М	
Дентовская С. В.	120	Макарова Н. А.	62
Дианова Д. Г.	19	Марусенко И. М.	126
Добрынина М. А.	30	Медведев Б. И.	115
Долгих О. В.	17, 19	Мезенцева Е. А.	105
Долгушин И. И.	6, 22	Михайлова И. В.	65
Дровосекова И. В.	97	Морозова О. С.	68
Е		Мякишева Э. Н.	94
Ерыгина Е. Н.	24, 92	Н	
Ж		Никушкина К. В.	105
Железнова А. Д.	122	О	
Жулай Г. А.	126	Олейник В. М.	126
З		Олейник Е. К.	126
Забозлаева И. В.	26	Осиков М. В.	71, 74
Зайцева Н. В.	17	П	
Захаров Ю. М.	62	Павлов В. М.	120
Зуева Е. Б.	30	Панфилова Т. В.	122
		Пашнина И. А.	77, 80