

УДК 613.64: 616.717 – 057

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ИДЕНТИФИКАЦИИ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ СРЕДОВЫХ ФАКТОРОВ НА ПРИМЕРЕ СТРОНЦИЯ

О.В. Долгих^{1,2,3}, Н.В. Зайцева^{1,2,3}, А.В. Кривцов¹, К.Г. Старкова¹, Д.Г. Дианова¹, О.А. Бубнова^{1,3}, Е.А. Отавина¹, Н.В. Безрученко^{1,3}

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

²ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Россия, 614990, г. Пермь, Комсомольский просп., 29

³ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Россия, 614990, Пермь, Букирева, 15

Разработаны методические подходы к оценке особенностей генетического полиморфизма, ассоциированного с воздействием факторов химической этиологии, для идентификации генетических маркеров чувствительности. Предложены технологии, методические аспекты использования полимеразной цепной реакции, секвенирования фрагментов ДНК, исследований спонтанной и индуцированной стронцием экспрессии кандидатных генов, позволяющие выявить изменения генома и транскриптома в целях идентификации ранних нарушений адаптационных процессов в условиях хронической средовой нагрузки для доказательства вреда здоровью и оценки индивидуального риска экспозиции химических факторов.

Ключевые слова: маркеры чувствительности, генетический полиморфизм, экспрессия генов, секвенирование, стронций.

Актуальной проблемой является разработка методических подходов к выявлению адаптивности отдельного человека и популяции к действию химических мутагенов, связанной с полиморфизмом генов. Восприимчивость организма к воздействию техногенных химических факторов в значительной мере зависит от особенностей генетических ассоциаций, опре-

деляющих: активность ферментов системы детоксикации ксенобиотиков; факторов, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях; состояние белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям и факторов иммунного ответа. При этом особый интерес вызывают вопросы функциональной организации генома и особенностей

© Долгих О.В., Зайцева Н.В., Кривцов А.В., Старкова К.Г., Дианова Д.Г., Бубнова О.А., Отавина Е.А., Безрученко Н.В., 2015

Долгих Олег Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН, профессор кафедры окружающей среды, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Зайцева Нина Владимировна – доктор медицинских наук, академик РАН, профессор, директор (e-mail: root@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-25-34).

Кривцов Александр Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики (e-mail: krivtsov@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Старкова Ксения Геннадьевна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией иммунологии и алергологии (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Бубнова Ольга Алексеевна – младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Дианова Дина Гумеровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики (e-mail: dianovadina@rambler.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Отавина Елена Алексеевна – младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Вдовина Надежда Алексеевна – младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

Безрученко Надежда Владимировна – иммунолог отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН, студентка магистратуры биологического факультета (e-mail: oleg@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30).

генетического полиморфизма. Генетический полиморфизм – долговременное существование в популяции двух генотипов и более, частоты которых достоверно превышают вероятность возникновения соответствующих повторных мутаций. По данным научной литературы распространенность минорного аллеля в популяции занимает в среднем 10 % по большинству значимых полиморфизмов. Идентификация однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), то есть замены одного нуклеотида другим, решает вопрос оценки качественного полиморфизма. Выявление структуры и особенностей экспрессии генов, кодирующих все белковые молекулы человека, а также внедрение в рутинную лабораторную практику новых диагностических технологий тестирования различных генных полиморфизмов (варианты одного и того же гена в популяции) позволяет предсказывать риски развития определенных заболеваний у конкретного индивидуума. В частности, генетическое тестирование позволяет выяснить, есть ли наследственная предрасположенность к нарушениям детоксикации лекарственных и других ксеногенных соединений, появлению рака, различным сердечно-сосудистым заболеваниям, развитию многочисленных осложнений течения беременности. Для решения задач ранней диагностики и повышения эффективности профилактики развития процессов дезадаптации у детей в условия техногенной экспозиции актуальным является установление особенностей идентификации нарушений генетических показателей [1–23].

Развитие исследований и методической базы в этом направлении необходимо для профилактического обеспечения путей защиты и стабилизации генома человека в условиях воздействия негативных факторов среды обитания.

Целью настоящих исследований являлась разработка методических подходов к идентификации особенностей генетического полиморфизма как маркера ранних нарушений адаптационных процессов (иммунных, обменных, соматических, пролиферативных) у детей в условиях хронической экспозиции химических средовых факторов на примере стронция.

Материалы и методы. Дизайн оценки особенностей генетического полиморфизма в условиях воздействия химических факторов включал в себя сравнительный анализ контингента риска (экспонированное население) и контингента контроля (неэкспонированное население); индивидуальный и популяционный анализ, проводимые на различных стратификационных биологических уровнях (клеточном, молекулярном).

Для решения задач идентификации риска и нанесенного вреда здоровью использовались методические подходы, обеспеченные адресной приборной базой по генотипированию (секвенатор, амплификаторы Real-time) и изучению клеточной и генной экспрессии (точные цитофлюориметры, клеточный сортер) на примере детского населения, экспонированного стронцием.

Методический алгоритм идентификации SNP базировался на основных положениях Методических рекомендаций «Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов» МР 4.2.0075-13 от 20.08.2013 г.

Проводилось персонифицированное генотипирование, в основе которого лежал индивидуальный подбор панели генов, отражающих профессиональные, внешнесредовые, социальные (вредные привычки) условия и наличие хронической патологии.

Верификация генетического полиморфизма (маркеры чувствительности) включала в себя оценку групп генов, отражающих особенности обменных, топических (органных), иммунных и детоксикационных процессов:

- ◆ идентификация мутаций генов ферментов 1-й и 2-й фазы детоксикации;
- ◆ полиморфизм генов белков, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях (ген эластазы, ген эндотелиального фактора роста) и обменных процессах;
- ◆ генотипирование предрасположенности к онкопролиферативным состояниям;
- ◆ определение иммуногенетических маркеров.

Для диагностики генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки на основании изучения специализированной литературы нами подобраны *гены и их участки в качестве маркеров чувствительности вероятных рисков возникновения индуцированных средой нарушений здоровья*: цитохрома P-450 *CYP1A1* (rs4646421 и rs1048943), копропорфириногенаксидазы *CPOX* (rs1131857), метилентетрагидрофолатредуктазы (rs1801133) *MTHFR*, эндотелиальной NO-синтазы *eNOS* (rs1799983), белка аполипопротеина E *ApoE* (rs429358), матриксных протеиназ *MMP9* и *MMP12* (rs17576 и rs652438), сульфотрансферазы *SULT1A1* (rs9282861), онкогенов *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53* (rs3950989, 1801439, 1042522), гена рецептора эстрогена *ESR1* (rs2228480) и промоторной об-

ласти гена *TNFA* (rs1800629) фактора некроза опухолей, *GSTA4* (глутатион-трансфераза), *SOD2*, *ZMPSTE24* (цинк-металлопептидаза), *TERT*, *DRD2*, *SIRT1*, *TLR4* (толл-рецептор 4), *PPAR*, *FAS*, *FOXP3*, *VEGF*, *APO-E*, *NO*-синтаза, *ACE*.

Для определения генотипа человека использовали метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров.

Алгоритм ДНК-детекции: забор образцов ДНК со слизистой оболочки щеки; выделение геномной ДНК с помощью фенол-хлороформной экстракции; исследование полиморфных вариантов изучаемых генов методикой ПЦР в режиме реального времени; амплификация и детекция вариантных аллелей на базе термоциклера *CFX96* с использованием структуры праймеров и параметров температурных циклов, описанных в литературе; обработка полученных результатов методом аллельной дискриминации с идентификацией различий гомозиготной замены от гетерозиготы и нормальной гомозиготы.

Технология и алгоритм идентификации индуцированной мутагенами генетической экспрессии включали в себя оценку состояния транскриптома клеток-мишеней изучаемого фактора у экспонированного населения по критерию уровня спонтанной и индуцированной экспрессии тестируемого гена. В качестве материала сравнения служат контрольные биопробы с допустимым уровнем контаминации мутагеном.

Алгоритм оценки индуцированной экспрессии генов:

1. Взятие материала и его транспортировка в лабораторию.
2. Определение содержания мутагена в крови.
3. Сепарация клеток крови и их идентификация.
4. Подготовка образцов и выделение общей РНК.
5. Обратная транскрипция мРНК в кДНК.
6. Амплификация кДНК с подготовленными праймерами и зондами.
7. Расчет относительной экспрессии маркерного гена.
8. Статистический анализ.

Результаты конкретного анализа экспрессии генов позволили нам за счет выделения специфических клеточных фенотипов $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, экспрессирующих ген дефензина альфа, обеспечить прогнозирование иммунных нарушений, ассоциированных с воздействием стронция.

Протокол исследования экспрессии кандидатного гена, приведенной внутренним контролем (ген *GAPDH*), включал в себя:

1. Относительное количество белка (РНК) дефензина альфа (спонтанный уровень экспрессии $CD8^+$).

2. Индуцированный стронцием уровень экспрессии белка (РНК) дефензина альфа (индуцированный уровень экспрессии $CD8^+$).

Анализ результатов производится по соотношению индуцированного стронцием и спонтанного уровней экспрессии дефензина альфа.

Состояние специфической индуцибельности нами оценивалось по величине и направлению изменчивости экспрессии, вызванной экспозицией стронцием *ex vivo* по сравнению со спонтанной экспрессией с учетом базовой экспозиции (содержание стронция в крови).

Статистическая обработка данных генетического обследования осуществлялась по накопленным массивам данных отдельно по каждому гену для двух групп – опытной и контрольной. Использовались статистические методы для описания равновесия частот генотипов и аллелей генов по равновесию Харди-Вайнберга. Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) для различных моделей наследования: аддитивной, общей, мультипликативной, доминантной и рецессивной и считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 приведены результаты оценки числа полиморфных вариантов кандидатных генов различных функциональных систем у экспонированных стронцием пациентов.

В структуре мутаций максимальной полиморфностью обладают гены детоксикации – 37,5 % из всей выборки генов, второй ранг занимают гены обмена (27,5 %) и гены иммунорегуляции, замены в соматических генах выражены в меньшей степени. Это связано с высокой лабильностью полиморфности функциональных белков и медиаторов обмена веществ, обеспечивающих адаптивность к изменяющимся характеристикам среды и высокой чувствительностью транскриптомно-геномных взаимосвязей для иммунорегуляторных генов.

Состояние специфической индуцибельности нами оценивалось по величине и направлению изменчивости экспрессии, вызванной экспозицией стронцием *ex vivo* по сравнению со спонтанной экспрессией с учетом базовой экспозиции (содержание стронция в крови).

Данные, полученные в ходе испытаний, приведены в табл. 2.

Таблица 1

Результаты секвенирования кандидатных генов

Хромосома	Ген	Количество полиморфизмов в сравнении с референсной последовательностью					
		1 п	2 п	3 п	4 п	5 п	6 п
1	2	3	4	5	6		
1	MTHFR	13	13	13	14	23	23
1	CLCN6	0	1	0	0	1	1
1	ZMPSTE24	4	3	3	4	1	4
3	CPOX	1	8	7	8	8	10
5	TERT	9	5	14	3	6	5
5	IL17B	0	2	0	2	1	1
6	PPARD	4	6	4	5	5	1
6	VEGFA	2	4	3	2	8	5
6	IL17F	0	0	0	0	0	1
6	GSTA4	11	12	9	15	11	15
6	SOD	4	0	6	2	0	6
6	HLADRB1	45	19	6	0	15	10
7	NOS3	19	14	12	14	12	14
9	TLR4	0	1	1	1	2	2
10	ACTA2	1	1	1	2	0	0
10	FAS	0	4	8	5	7	9
11	SIRT3	9	12	8	12	8	1
11	TH	17	16	15	8	16	18
11	DRD2	19	12	16	14	19	20
13	IL17D	3	1	2	1	1	1
15	CYP1A2	5	3	3	4	3	4
16	SULT1A1	41	33	37	10	39	37
16	IL17C	3	3	2	3	4	2
17	TP53	7	7	6	6	7	6
17	ACE	4	28	24	22	21	25
19	APOE	3	3	3	2	2	5
X	FOXP3	3	3	4	0	2	2
14 хромосом	27 генов	227	214	207	159	222	228

Таблица 2

Характеристика индекса экспрессии гена дефензина альфа у пациентов с различным уровнем содержания стронция в крови

№ п/п	Экспрессия			Содержание CD8 ⁺ , %	Концентрация стронция в крови, мкг/мл
	спонтанная	индуцированная стронцием	Индекс экспрессии		
1	0,007	0,01718	2,26	24	0,0181
2	0,011	0,0121	1,05	26	0,012
3	0,062	0,2349	3,8	35	0,123
4	0,010	0,007	0,67	17	0,090
5	0,603	0,359	0,60	14	0,0862
6	0,128	0,085	0,66	21	0,0553
7	0,051	0,1429	2,8	28	0,0216
8	0,072	0,19541	2,71	29	0,0347
9	0,024	0,0394	1,63	32	0,032
10	0,033	0,05215	1,58	28	0,0201
	Норма		0,7–3,0	28,0 ± 4,7	0,024 ± 0,007

Приведенные значения спонтанной и индуцированной экспрессии и предлагаемого индекса у экспонированных стронцием пациентов достоверно отличались от аналогичных данных пациентов, с содержанием стронция в крови ниже референтного уровня (0,077 мг/дм³) ($p < 0,05$). Для обоснования пороговости ин-

декса экспрессии, который бы характеризовал иммунные нарушения у пациента, исходили из следующего принципа. Принцип пороговости предполагает разрыв между пороговыми (минимально действующими) уровнями фактора и недействующими с коэффициентом 3 и выше. Ряд авторов (например, Е.А. Трифонова и др.)

считают значимым изменение уровня экспрессии гена более чем в 1,5 раза, хотя они же идентифицируют повышение ее интенсивности у женщин с преэклампсией в 6–8 раз. Поэтому нами рекомендуется в качестве диагностически значимого критерия измененной экспрессии снижение ее в 1,5 раза как критический уровень угнетения экспрессии гена и индекс 3,0 как порог допустимого увеличения экспрессии гена, что будет выражаться диапазоном коэффициентов оптимума экспрессии (индекс экспрессии) от 0,7 до 3,0. Разница между коэффициентами, ограничивающими увеличение и снижение экспрессии генов, объясняется особенностями и интенсивностью этих процессов у эукариотов, режим сохранения генетического материала при супрессии и инициация синтеза при стимуляции (достигается путем многократной инициации синтеза ДНК) приводит в последнем случае к значительному увеличению генетического материала. При анализе клеточных фенотипов, отвечающих за иммунорезистентность, выявлен их дефицит, что в ассоциации с высокой контаминацией биосред стронцием и угнетением экспрессии дефензина альфа указывает на наличие иммунодефицитного состояния в иммунной системе пациента, обусловленного действием стронция.

Анализ индуцированной экспрессии генов рекомендуется использовать для определения выраженности индивидуальных и популяционных эпигенетических изменений в контингентах, подвергающихся хронической гаптенной интоксикации в алгоритмической последовательности, следующей за сиквенсом и ПЦР-идентификацией кандидатных генов.

Таким образом, предложена методология генотипирования нуклеотидных замен, заключающаяся в алгоритмической последовательности проведения сиквенса, ПЦР-типирования и экспрессии кандидатных генов. Результаты анализа полиморфизма генов в условиях повышенной экспозиции стронцием указывают на избыточную вариабельность генов CYP1A2, TERT, FAS, FOXP3, TP53, HLA DRB1, MTHFR, GSTA, SULT1A1, NOS, SIRT, ACE, отвечающих за особенности иммунорегуляции и детоксикации. Изложенные подходы и принципы идентификации генов иммунной дезадаптации позволяют подобрать для определенных условий (среда, территория, нозология) сочетание

генетических маркеров для идентификации нарушений здоровья

Выводы. Идентификация маркеров чувствительности с использованием современных генетических методологий должна включать в себя алгоритмическую последовательность тестирования биопроб методами полимеразной цепной реакции, секвенирования и оценки экспрессии кандидатных генов.

Генетические маркеры позволяют дать оценку особенностям влияния факторов среды обитания на состояние здоровья, обеспечить службу современными тестами ранней диагностики доказательства вреда здоровью при воздействии химических факторов

Разработанные на примере стронция методические подходы к идентификации особенностей генетического полиморфизма у детей, ассоциированного с факторной нагрузкой, включают в себя соблюдение следующих условий и особенностей их реализации:

- ♦ достаточность выборки, ее популяционная однородность, отсутствие врожденных аномалий, адекватность подбора контрольного контингента, проживающего вне ареала влияния виновного фактора;

- ♦ комплексный подход к анализу полиморфных вариантов кандидатных генов с использованием возможностей ПЦР-анализа в режиме реального времени, их сиквенса с подсчетом тандемных повторов и транзиций и трансверсий генов с проведением оценки спонтанной и митоген-индуцированной экспрессии генов;

- ♦ анализ ключевых однонуклеотидных полиморфизмов и вариантных аллелей кандидатных генов («иммунные», обменные, соматические, онкопролиферативные и детоксикационные гены), отвечающих за особенности метаболизма действующего фактора или за состояние эффекторных органов и систем (тканей-мишеней);

- ♦ анализ состояния транскриптома по величине относительной экспрессии матричной РНК кандидатных генов сепарированных клеточных мишеней изучаемого фактора;

- ♦ анализ ассоциаций ген-рецептор-лиганд с изучением состояния не только гена, но и экспрессируемого им белка, имеющего разные формы: внутриклеточную (транскрипционные факторы), мембранную (рецептор), внеклеточную (лиганд).

Список литературы

1. Венгеровский А.И., Хлусов И.А., Нечаев К.А. Молекулярные механизмы действия бисфосфонатов и стронция рanelата // Экспер. и клин. фармак. – 2014. – Т. 77 (9). – С. 43–46.
2. Иммунологические и генетические маркеры внешнесредовой экспозиции стронцием / К.Г. Горшкова, О.А. Бубнова, Е.Д. Маерова, О.В. Долгих // Санитарный врач. – 2014. – № 3. – С. 72–74.
3. Иммунологические и генетические маркеры воздействия ароматических углеводов на работающих / О.В. Долгих, А.В. Кривцов, А.М. Гугович, Р.А. Харахорина, Д.В. Ланин, Т.С. Лыхина, М.А. Сафонова // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – № 12. – С. 30–33.
4. Иммунные маркеры и полиморфизм генов у детей в условиях экспозиции тяжелыми металлами / О.В. Долгих, К.Г. Старкова, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, Н.А. Вдовина, Е.А. Пирогова // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». – 2015. – № 3. – С. 240–244.
5. Куценко С.А. Основы токсикологии. – СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2002. – 395 с.
6. Методические подходы к расчету вероятности негативных ответов для оценки индивидуальных рисков здоровью человека / Н.В. Зайцева, П.З. Шур, Д.А. Кирьянов, В.М. Чигвинцев, О.В. Долгих, К.П. Лужецкий // Профилактическая и клиническая медицина. – 2015. – № 3 (56). – С. 5–11
7. Полиморфизм генов белков ангиогенеза в условиях шумовой и химической техногенной экспозиции / Р.А. Предеина, О.В. Долгих, О.О. Сеницына, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова, Е.Д. Данилова, Д.Г. Дианова, Т.С. Лыхина // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. – № 11 (248). – С. 42–44.
8. Спонтанная и индуцированная стронцием экспрессия гена дефензина / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, А.В. Кривцов, О.А. Бубнова // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 1 (274). – С. 31–33.
9. Рахманин Ю.А., Новиков С.М., Иванов С.И. Современные научные проблемы совершенствования методологии оценки риска здоровью населения // Гигиена и санитария. – 2005. – № 2. – С. 3–8.
10. Assessment of immunotoxic effects in humans / J. Descotes [et. al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, № 12. – P. 1870–1873.
11. Caverzasio J., Thouverey C. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth // Cell. Physiol. Biochem. – 2011. – Т. 27 (3–4). – P. 243–250.
12. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence // Toxicology in Vitro. – 1994. – Vol. 8, № 5. – P. 963–966.
13. Molecular markers of apoptosis in industrial workers / O. Dolgikh, N. Zaitseva, D. Dianova, A. Krivtsov // In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. – 2011. – Vol. 25, № 3. – P. 523–524.
14. Fromigué O., Hay E., Barbara A. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate // JMM. – 2009. – Vol. 13 (8B). – P. 2189–2199.
15. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa / P.G. Gervasi, V. Longo, F. Naldi, G. Panattoni, F. Ursino // Biochem. Pharmacol. – 1991. – Vol. 41. – P. 177–184.
16. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways / A.S. Hurtel-Lemaire, R. Mentaverri, A. Caudrillier, F. Courmarie, A. Watel, S. Kamel, E.F. Terwilliger, E.M. Brown, M. Brazier // JBC. – 2009. – Vol. 284. – P. 575–584.
17. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity / K. Krzystyniak [et. al.] // Environ. Health Perspect. – 1995. – Vol. 103, suppl 9. – P. 17–22.
18. Switching Akt: From survival signaling to deadly response / M. Los, S. Maddika, B. Erb, K. Schulze-Osthoff // BioEssays. – 2009. – Vol. 31 (5). – P. 492–495.
19. Mulder G.J. Metabolic Activation of Industrial Chemicals and Implications for Toxicity // Toxicology of industrial compounds. Taylor & Francis Ltd. UK. – 1995. – P. 37–44.
20. Van Bladeren P.J., van Ommen B. Metabolism of Reactive Chemicals // Toxicology of industrial compounds. Taylor & Francis Ltd. – 1995. – P. 61–72.
21. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling / F. Yang, D. Yang, J. Tu, Q. Zheng, L. Cai, L. Wang // Stem cells. – 2011. – Vol. 29. – P. 981–999. doi: 10.1002/stem.646.
22. Yurchenko M., Shlapatska L.M., Sidorenko S.P. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome // Exp. oncol. – 2012. – Vol. 34 (3). – P. 200–2011.
23. Zaitseva N.V., Dianova D.G., Dolgikh O.V. Effects of cellular immunity in conditions of surplus supply of strontium with consumed water // European journal of natural history. – 2014. – № 1. – P. 7–8.

References

1. Vengerovskiy A.I., Hlусov I.A., Nechaev K.A. Molekuljarnye mehanizmy dejstvija bisfosfonatov i stroncija ranelata [Molecular mechanisms of bisphosphonate and strontium ranelate action]. *Jeksep. i klin. Farmak.* 2014, vol. 77 (9), pp. 43–46. (in Russian).

2. Gorshkova K.G., Bubnova O.A., Maerova E.D., Dolgih O.V. Immunologicheskie i geneticheskie markery vneshnesredovoj jekspozicii stronciem [Immunological and genetic markers of environmental exposure strontium]. *Sanitarnyj vrach*, 2014, no. 3, pp. 72–74. (in Russian).

3. Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Gugovitch A.M., Kharakhorina R.A., Lanin D.V., Lykhina T.S., Safonova M.A. Immunologicheskie i geneticheskie markery vozdejstviya aromaticeskikh uglevodorodov na rabotajushchih [Immunologic and genetic markers of exposure to aromatic hydrocarbons in workers]. *Medicina truda i promyshlennaja jekologija*, 2012, no. 12, pp. 30–33. (in Russian).

4. Dolgikh O.V., Starkova K.G., Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Vdovina N.A., Pirogova E.A. Immunnye markery i polimorfizm genov u detej v uslovijah jekspozicii tjazhelymi metallami [Immune markers and gene polymorphism in children exposed to heavy metals]. *Vestnik Permskogo Universiteta. Serija Biologija*, 2015, no. 3, pp. 240–244 (in Russian).

5. Kucenko, S. A. Osnovy toksikologii [Bases of toxicology]. St. Petersburg: Voenno-medicinskaja akademija im. S.M. Kirova, 2002, 395 p. (in Russian).

6. Zaitseva N.V., Shur P.Z., Kir'janov D.A., Chigvincev V.M., Dolgih O.V., Luzhetsij K.P. Metodicheskie podhody k raschetu verojatnosti negativnyh otvetov dlja ocenki individual'nyh riskov zdorov'ju cheloveka [Methodological approaches to the calculation of the probability of negative responses to assessment of the individual risks to human health]. *Profilakticheskaja i klinicheskaja medicina*, 2015, no. 3 (56), pp. 5–11. (in Russian).

7. Predeina R.A., Dolgikh Oleg, Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Danilova E.D., Sinityna O.O., Dianova D.G., Lykhina T.S. Polimorfizm genov belkov angiogeneza v uslovijah shumovoj i himicheskoj tehnogennoj jekspozicii [Polymorphism of genes of proteins angiogenesis noise and conditions of chemical exposure technogenic]. *Zdorov'e naselenija i sreda obitanija*, 2013, no. 11 (248), pp. 42–44. (in Russian).

8. Rakhmanin Yu.A., Novikov S.M., Ivanov S.I. Sovremennye nauchnye problemy sovershenstvovanija metodologii ocenki riska zdorov'ju naselenija. [Current scientific problems in the improvement of methodology for assessing a human health risk]. *Gigiena i sanitarija*, 2005, no. 2, pp. 3–8. (in Russian).

9. Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Kir'janov D.A., Bubnova O.A. Spontannaja i inducirovannaja stronciem jekspressija gena defenzina [Spontaneous and induced by strontium expression of the defensin gene]. *Zdorov'e naselenija i sreda obitanija*, 2016, no. 1 (274), pp. 31–33 (in Russian).

10. Descotes J. [et. al.] Assessment of immunotoxic effects in humans. *Clin. Chem*, 1995, vol. 41, no. 12, pp. 1870–1873.

11. Descotes J. [et. al.] Assessment of immunotoxic effects in humans. *Clin. Chem*, 1995, vol. 41, no. 12, pp. 1870–1873.

12. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence. *Toxicology in Vitro*, 1994, vol. 8, no. 5, pp. 963–966.

13. 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*, 2011, vol. 25, no. 3, pp. 523–524.

14. Fromigué O., Hay E., Barbara A. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *JCMM*, 2009, vol. 13 (8B), pp. 2189–2199.

15. Gervasi P.G., Longo V., Naldi F., Panattoni G., Ursino F. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. *Biochem Pharmacol*, 1991, vol. 41, pp. 177–184.

16. Hurtel-Lemaire A.S., Mentaverri R., Caudrillier A., Cournarie 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. *JBC*, 2009, vol. 284, pp. 575–584.

17. Krzystyniak K. [et. al.]. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environ Health Perspect*, 1995, vol. 103, suppl 9, pp. 17–22.

18. Los M., Maddika S., Erb B., SchulzeOsthoff K. Switching Akt: From survival signaling to deadly response. *BioEssays*, 2009, vol. 31 (5), pp. 492–495.

19. Mulder G.J. Metabolic Activation of Industrial Chemicals and Implications for Toxicity. *Toxicology of industrial compounds. Taylor & Francis Ltd. UK*, 1995, pp. 37–44.

20. Van Bladeren P.J., van Ommen B. Metabolism of Reactive Chemicals. *Toxicology of industrial compounds. Taylor & Francis Ltd*, 1995, p. 61–72.

21. 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, vol. 29, pp. 981–99. DOI: 10.1002/stem.646.

22. Yurchenko M., Shlapatska L.M., Sidorenko S.P. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome. *Exp. Oncol*, 2012, vol. 34 (3), pp. 200–2011.

23. Zaitseva N.V., Dianova D.G., Dolgikh O.V. Effects of cellular immunity in conditions of surplus supply of strontium with consumed water. *European journal of natural history*, 2014, no. 1, pp. 7–8.

DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACH TO THE IDENTIFICATION OF THE FEATURES OF THE GENETIC POLYMORPHISMS AND GENE EXPRESSION IN CHILDREN UNDER INFLUENCE OF CHEMICAL ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE EXAMPLE OF STRONTIUM

O.V. Dolgikh^{1,2,3}, N.V. Zaitseva^{1,2,3}, A.V. Krivtsov¹, K.G. Starkova¹, D.G. Dianova¹, O.A. Bubnov^{1,3}, E.A. Otavina¹, N.V. Bezruchenko^{1,3}

¹ FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Russian Federation, Perm, 82 Monastyrskaya St., 614045

² FBSEI HPE "Perm National Research Polytechnic University", Russian Federation, Perm Komsomolsky Av., 29, 614990

³ FBSEI HPE "Perm State National Research University", Russian Federation, Perm, 15 Bukireva St., 614990

Methodological approaches evaluating the features of genetic polymorphism associated with exposure to chemical etiology factors for the identification of genetic susceptibility markers were developed. The technologies, methodological aspects of the use of polymerase chain reaction, DNA sequencing fragments, studies of spontaneous and induced strontium expression of candidate genes that help identify changes in the genome and transcriptome in order to identify early disorders of adaptation processes in chronic environmental burden to prove the injury and assessment of individual exposure risk chemical factors were suggested.

Key words: sensitivity markers, genetic polymorphisms, gene expression, sequencing, strontium.

© Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Krivtsov A.V., Starkova K.G., Dianova D.G., Bubnov O.A., Otavina E.A., Bezruchenko N.V., 2016
Dolgikh Oleg Vladimirovich – Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of immunobiological diagnostic methods of FBUN, professor of environmental Perm National Research Polytechnic University, Professor of Human Ecology and Life Safety of the Perm State National Research University (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).

Zaitseva Nina Vladimirovna – Doctor of Medicine, academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Director (e-mail: root@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 237-25-34).

Krivtsov Alexander Vladimirovich – Ph.D., Head of the Laboratory of Immunogenetics (e-mail: krivtsov@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).

Starkova Kseniya Gennadievna – Ph.D., Head of the Laboratory of Immunology and Allergology (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).

Bubnova Olga Alekseevna – Junior Researcher at the Department of immunobiological diagnostic methods (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).

Dianova Dina Gumerovna – Ph.D., senior researcher, Laboratory of cell diagnostic methods (e-mail: dianovadina@rambler.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).

Otavina Elena Alekseevna – Junior Researcher at the Department of immunobiological diagnostic methods (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).

Vdovina Nadezhda Vladimirovna – Junior Researcher at the Department of immunobiological diagnostic methods (e-mail: oleg@fcrisk.ru; tel.: + 7 (342) 236-39-30).