

Зайцева Н.В., Землянова М.А., Долгих О.В.

Геномные, транскриптомные и протеомные технологии как современный инструмент диагностики нарушений здоровья, ассоциированных с воздействием факторов окружающей среды

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь

Введение. На сегодняшний день актуальным является использование современных критических технологий для задач выявления и оценки негативных эффектов, ассоциированных с воздействием химических веществ, на стадиях донозологических изменений, что позволяет повысить эффективность раннего выявления развития предпатологических состояний до наступления выраженных функциональных изменений и развития болезни. Одним из наиболее перспективных подходов является использование методов молекулярной диагностики на основе технологий геномного, транскриптомного и протеомного анализа.

Цель работы – анализ аспектов и практического использования возможностей современных критических технологий (геномные, транскриптомные и протеомные технологии) при выполнении медико-биологических и экспериментальных исследований для задач идентификации биомаркеров негативных эффектов химических факторов риска на примере условий экспозиции соединениями алюминия.

Материал и методы. Анализ протеома осуществлялся методом двухмерного электрофореза, полиморфизма аллелей и генотипов кандидатных генов методом ПЦР в режиме реального времени. Оценка состояния транскриптома выполнялась по результатам изучения экспрессии гена. Изучение экспрессии мембранных и сывороточных белков производилось методами биохимического и иммунологического анализа. Статобработка результатов осуществлялась в системах «ГенКалькулятор» и «Ген Эксперт» и онлайн-программе «SNPStats».

Результаты. Результаты использования технологий протеомного анализа позволили идентифицировать белки аннексин-13, SH3-доменный белок-RF3, катепсин L1 и соответственно гены CTSL, SH3RF3, THO комплексная субъединица 2 в качестве омик-маркеров аэрогенной экспозиции неорганических соединений. Результаты анализа полиморфизма генов у населения, экспонированного амфотерными металлами, позволили установить изменённую частотность вариантных аллелей и генотипов генов: иммунной регуляции – TLR4 (толл-подобный рецептор); сосудистых факторов – eNOS rs1799983 (эндотелиальная NOсинтаза); детоксикации – копропорфириногеноксидазы CPOX (rs1431857), цитохрома p450 CYP1A1 (rs 1048943); нейро-гуморальной регуляции ANKK1 rs1800497 (ген дофаминового рецептора) и HTR2A rs7997012 (ген серотонинового рецептора). Результаты анализа экспрессии генов позволили за счёт выделения специфических клеточных фенотипов CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, экспрессирующих ген протеомного профиля плазмы крови липопротеина А (ген LPA), установить индуцированные воздействием амфотерных металлов их негативные транскриптомные эффекты.

Обсуждение. Полученные результаты коррелируются с данными ряда научных исследований, отмечающих важность идентификации полиморфных отклонений генов, определяющих индивидуальный риск нарушений здоровья в условиях многообразия воздействующих на человека стрессорных факторов среды обитания. Минорные генотипы кандидатных генов в условиях избыточной контаминации компонентами загрязнения окружающей среды достоверно увеличивают риск отклонений показателей иммунной регуляции, что модифицирует механизмы апоптоза, имеющие ключевое значение для формирования атопии и онкопролиферации.

Заключение. Использование геномных, транскриптомных и протеомных технологий как современного инструментария диагностики нарушений здоровья позволило обосновать перечень приоритетных омик-маркеров экспозиции и эффекта, ассоциированных с аэрогенным воздействием амфотерных металлов, оказывающих модифицирующее влияние на патогенетические механизмы формирования нарушения функций нервной и иммунной систем, детоксикации 1-й и 2-й её фазы, вероятности развития сосудистых нарушений и онкопролиферативных процессов.

К л ю ч е в ы е с л о в а : полиморфизм генов; протеом; транскриптом; химические факторы риска.

Для цитирования: Зайцева Н.В., Землянова М.А., Долгих О.В. Геномные, транскриптомные и протеомные технологии как современный инструмент диагностики нарушений здоровья, ассоциированных с воздействием факторов окружающей среды. *Гигиена и санитария*. 2020; 99 (1): 6-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-1-6-12>

Для корреспонденции: Долгих Олег Владимирович, доктор мед. наук, зав. отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов: получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание – Зайцева Н.В.; получение данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание – Землянова М.А.; получение данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание – Долгих О.В.

Поступила: 09.10.19

Принята к печати: 12.12.19

Опубликована: 27.02.2020

Zaitseva N.V., Zemlianova M.A., Dolgikh O.V.

Genomic, transcriptomic and proteomic technologies as a modern tool for health disorders diagnostics, associated with the impact of environmental factors

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of Federal Service on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision, Perm, 614045, Russian Federation

Introduction. Today, it is relevant to use modern critical technologies for identifying and evaluating the negative effects associated with the effects of chemicals at the stages of pre-nosological changes. This improves the efficiency of the early detection of progress in pre-pathological conditions prior to the onset of pronounced functional changes and the aggravation of the disease. The use of molecular diagnostic methods based on genomic, transcriptomic, and proteomic analysis technologies is one of the most promising approaches.

Aim of the work is an analysis of both aspects and practical use of the modern critical technologies capabilities (genomic, transcriptomic and proteomic technologies) in the implementation of biomedical and experimental studies for the tasks of the detection biomarkers of negative effects of chemical risk factors on the example of exposure conditions with aluminum compounds.

Material and methods. The proteomic analysis was carried out by the method of two-dimensional electrophoresis, polymorphism of alleles and genotypes of candidate genes by a real-time polymerase chain reaction. The transcriptome state was assessed based on the results of gene expression studies. The expression of membrane and serum proteins was studied by biochemical and immunological methods analysis. Statistical processing of the results was carried out in the systems "Gencalculator," "Gene Expert" and online program "SNPStats".

Results. The results of using proteomic analysis technologies made it possible to identify proteins annexin-13, SH3-domain protein-RF3, cathepsin L1 and, accordingly, genes CTSL, SH3RF3, THO complex subunit 2 as Ohmic markers of aerogenic exposure of inorganic compounds. The results of the analysis of gene polymorphism in the population exposed to environmental pollution allowed establishing the changed frequency of variant alleles and genotypes of genes: immune control – TLR4 (toll-like receptor); vascular factors – eNOS rs1799983 (endothelial NOSintase); detoxification – coproporphyrinogen oxidase CPOX (rs1131857), cytochrome P450 CYP1A1 (rs 1048943); neuro-humoral regulation of ANKK1 rs1800497 (dopamine receptor gene) and HTR2A rs7997012 (serotonin receptor gene). The results of gene expression analysis made it possible to establish negative transcriptomic effects induced by exposure to amphoteric metals due to the isolation of specific CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ cell phenotypes expressing the proteomic profile gene of blood plasma lipoprotein A (LPA gene).

Discussion. The obtained results correspond data of a number of scientific studies, noting the importance of identifying polymorphic deviations of genes determining the individual risk of health problems in a variety of stressful environmental factors affecting humans. Minor genotypes of candidate genes under conditions of excessive contamination with amphoteric metal compounds significantly increase the risk of deviations in immune regulation indices, which modifies apoptosis mechanisms, which are crucial for the formation of atopy and onco-proliferation.

Conclusion. The use of genome, transcriptomic and proteomic technologies as a modern tool for the diagnostics of health disorders allowed justifying the set of priority exposition and effect Ohmic-markers, associated with aerogenic effect of amphoteric metals, which have a modifying effect on the pathogenetic mechanisms of the formation of disorders of nervous and immune systems, the 1st and 2nd phase of detoxification, the likelihood of vascular disorders and onco-proliferative processes.

К е у о р д с : gene polymorphism; proteome; transcriptome; chemical risk factors.

For citation: Zaitseva N.V., Zemlianova M.A., Dolgikh O.V. Genomic, transcriptomic and proteomic technologies as a modern tool for diagnostics of health disorders associated with the impact of environmental factors. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (1): 6-12. (In Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-1-6-12>

For correspondence: Oleg V. Dolgikh, MD, Ph.D., DSci., head of the Department of immunobiological diagnostic methods, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Information about the authors:

Zaitseva N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2356-1145>; Zemlianova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-8013-9613>; Dolgikh O.V., <http://orcid.org/0000-0003-4860-3145>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contribution: Zaitseva N.V. – receipt and interpretation of research data, writing a manuscript, approval of the final version for publication, full responsibility for the content. Zemlianova M.A. – obtaining research data, making adjustments to the manuscript, approving the final version for publication, full responsibility for the content. Dolgikh O.V. – obtaining research data, making adjustments to the manuscript, approving the final version for publication, full responsibility for the content.

Received: October 09, 2019

Accepted: December 12, 2019

Published: February 27, 2020

Введение

Постоянно продолжающееся загрязнение окружающей среды химическими примесями на территории Российской Федерации, доказанная взаимосвязь между гигиеническими факторами и состоянием здоровья населения требуют разработки научно обоснованных гигиенических рекомендаций диагностической и профилактической направленности, в том числе с использованием современных критических технологий.

В «Стратегии развития медицинской науки в РФ до 2025 года» принятой Правительством РФ, говорится о необходимости создания унифицированного комплекса методов оценки генетического статуса при эпидемиологических обследованиях населения экологически неблагоприятных регионов с целью прогнозирования и коррекции иммунодефицитных состояний [1, 2].

В настоящее время развитие системы идентификации маркеров негативных эффектов базируется не только на известных стандартных методах, включающих методы анализа опасности и оценки риска негативного воздействия внешнесредовых и производственных факторов, теоретическую оценку механизма их токсического действия, эпидемиологические исследования, но и базируется на современных наукоёмких достижениях клеточно-молекулярных технологий (геномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных, нанобионных, постгеномных – клеточных), что позволяет обосновать маркеры негативных эффектов не только на системном и органно-тканевом уровнях, но и на клеточно-молекулярном уровне ответных реакций организма. Особое внимание при этом уделяется технологиям, которые позволяют устанавливать принципиально новые маркеры эффекта на самых ранних стадиях изменений состояния организма – на молекулярном

уровне – геномные, транскриптомные, протеомные технологии. Наиболее чувствительным и информативным подходом к решению такого рода задач в настоящее время является технология протеомного анализа биосубстратов, например, плазмы крови, которая позволяет даже в условиях низкоуровневых воздействий идентифицировать изменения структуры протеина [3–7].

Изучение дисбаланса протеома, идентификация новых белковых маркеров заболеваний человека и кодирующих их генов являются актуальными гигиеническими задачами в целях снижения неинфекционной заболеваемости, ассоциированной со средовыми факторами. Технология является многоэтапной и включает достаточно дорогостоящие процедуры, однако информативная ценность получаемых данных в аспекте доказательной базы реализации рисков здоровью крайне высока [8].

Цель – анализ аспектов и практического использования возможностей современных критических технологий (геномные, транскриптомные и протеомные технологии) при медико-биологических и экспериментальных исследованиях для идентификации биомаркеров негативных эффектов химических факторов риска на примере условий экспозиции соединениями алюминия.

Материал и методы

Идентификация генетических и иммунологических маркеров выполнена у 188 детей в возрасте 4–10 лет, проживающих в условиях экспозиции к приоритетным факторам риска здоровью в зоне влияния выбросов алюминиевого производства (территория Юга Сибири), в том числе 77 детей (группа наблюдения, 4–7 лет), посещающих дошкольные образовательные учреждения, и 111 детей (8–10 лет), посещающих начальную общеобразовательную школу, которые составили группу сравнения, – дети аналогичного возраста, проживающие в условиях отсутствия экспозиции к химическим факторам риска (территория курортной зоны Иркутской области).

В условиях воздействия химических соединений осуществлялась оценка полиморфизма генов, кодирующих протеомный профиль плазмы, с использованием методологии генотипирования нуклеотидных замен, которая заключается в алгоритмической последовательности анализа ПЦР-типирования и экспрессии кандидатных генов. До проведения анализа пробы (цельная кровь) хранили не более суток в холодильной камере (+3–4 °C), сыворотку хранили при температуре от 25 градусов ниже нуля.

Количественная оценка содержания алюминия в крови выполнена в соответствии с МУК 4.1.3230-14 «Методика измерений массовых концентраций алюминия в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой»* с использованием масс-спектрометра Agilent 7500cx (Agilent Technologies Inc., США).

Угнетение экспрессии гена глутамата, снижение концентрации глутамата в крови по сравнению с нижней границей нормы, возникновение функциональных изменений вегетативной нервной системы в виде проявлений астеновегетативного синдрома, а также избыточная контаминация биосред алюминием, превышающая референтный уровень, характеризуют негативное воздействие условий экспозиции к алюминию на формирование протеомного профиля плазмы крови. Определение индикаторных показателей генома и транскриптома, характеризующих состояние полиморфизма и экспрессии белков протеома плазмы крови (ген ионотропного рецептора глутамата *GRIA1 rs545098* и ген матриксной металлопептидазы *MMP9 rs17576*) с идентификацией белков, формирующих протеомный профиль плазмы крови, – глутамата, специфического IgG к алюминию и антиапоптотического транскрипционного фактора, характеризующих вероятность развития нарушений у детей в виде расстройства аутистического спектра, астеновегетативного синдрома с последующим расчётом риска для здоровья (на примере экспозиции алюминием) [9–12].

Алюминий особенно активно накапливается до токсичного уровня в железосодержащих клетках, нарушая гомеостаз (саморегуляцию) железа, прежде всего минорных белков плазмы крови, отвечающих за состояние красной крови, обмена липидов (липо-

протеин А – LPA), обуславливая формирование полиморбидной и коморбидной патологии [13–15].

Вдыхание алюминиевой пыли в концентрации 0,13–1,95 мг/м³ сопровождается постепенным замещением лёгочной ткани фиброзной, эмоциональной возбудимостью, бессонницей, лабильностью настроения [16]. Доказана роль развития таких аутоиммунных осложнений, спровоцированных поступлением соединений алюминия (0,5–1,7 мг/кг/сут), как болезнь Альцгеймера [10, 17, 18].

Выполнен анализ результатов изучения полиморфизма генов в условиях средовой контаминации алюминием, что позволило выявить SNP-особенности детского населения, отличающиеся повышенной распространённостью вариантов аллелей кандидатных генов, а также особенностями индуцированной гаптенами экспрессии генов. Генотипирование пациентов по генам копропорфириногенаксидазы *CPOX* (rs1131857), эндотелиальной синтазы оксида азота *eNOS* (rs1799983), толл-подобного рецептора *TLR4* (rs1927911), цитохрома *p450 CYP1A1* (rs 1048943), *BRCA1* rs3950989, а также генов нейрогуморальной регуляции – *ANKK1* rs1800497 (ген дофаминового рецептора) и *HTR2A* rs7997012 (ген серотонинового рецептора) проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени путём дискриминации аллелей с помощью TaqMap-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных компанией «Синтол» (Москва) [17, 19–28].

Выбор генов и их полиморфных вариантов основывался на сведениях научной литературы и известных токсикологических эффектах соединений алюминия, согласно Руководству по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду (P 2.1.10.1920-04) [17, 19–37].

Исследование протеомного профиля плазмы крови выполнено по технологии двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в соответствии с методиками, рекомендованными для используемого оборудования. Полученные электрофореграммы плазмы крови визуализировали методом окраски серебром и документировали с помощью системы для гель-документирования (BioRad, США). Анализ полученных протеомных карт проводили с помощью программного комплекса PDQuest (Bio-Rad, США). В полученной протеинограмме выделяли значимые белковые пятна по их интенсивности и проводили последующий анализ методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом на хроматографе UltiMate 3000 (Германия) и tandemном масс-спектрометре ABSciex 4000 QTRAP с источником ионизации Nanospray 3 (Канада).

Исследована экспрессия генов *GRIA* Hs00609557_m1 и *MMP9* Hs00234579_m1 у 188 детей, имеющих различный уровень контаминации алюминием биосред и клинические проявления в виде астеновегетативного синдрома. Для нормализации уровня экспрессии использовался ген *ACTB* Hs99999903_m1. Эксперимент с определением уровня экспрессии производился в условиях 48-часовой нагрузки алюминием ГСО 8714-2005 *in vitro* в референтной концентрации 0,01 мг/дм³ и без нагрузки на кровь, нейтрофилы и лимфоциты [6, 38].

GRIA1 (глутамат-ионотропный рецептор AMPA-тип субъединицы 1) представляет собой ген кодирования данного белка, отвечающего за вегетативные отклонения. Среди элементов его функционала – метаболизм белков. Ген матриксной металлопротеиназы (*MMP9*) отвечает за образование соединительной ткани как результат воспалительного повреждения эпителия дыхательных путей [6, 38].

Статистическая обработка иммунологических показателей осуществлялась в программе Statistica 10.0. Статистическая обработка иммунологических показателей осуществлялась в программе Statistica 10.0, определялись значения \bar{X} – среднее, N – количество, D – дисперсия, SD – стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка, pW – уровень значимости для критерия Шапиро–Уилка для оценки нормальности распределения показателя. После установленных характеристик исследуемых выборок для оценки различий между выборками использовались методы параметрической статистики (t -критерий Стьюдента) – для выборок с нормальным распределением и непараметрической (U -критерий Манна–Уитни) – для выборок с отсутствием нормального распределения. Статистическая обработка генетических показателей осуществлялась в Excel Microsoft Office, онлайн-программе «ГенКалькулятор» компании «Ген Эксперт», и

* МУК 4.1.3230-14 Методика измерений массовых концентраций алюминия в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Утверждено Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 19 декабря 2014 г.

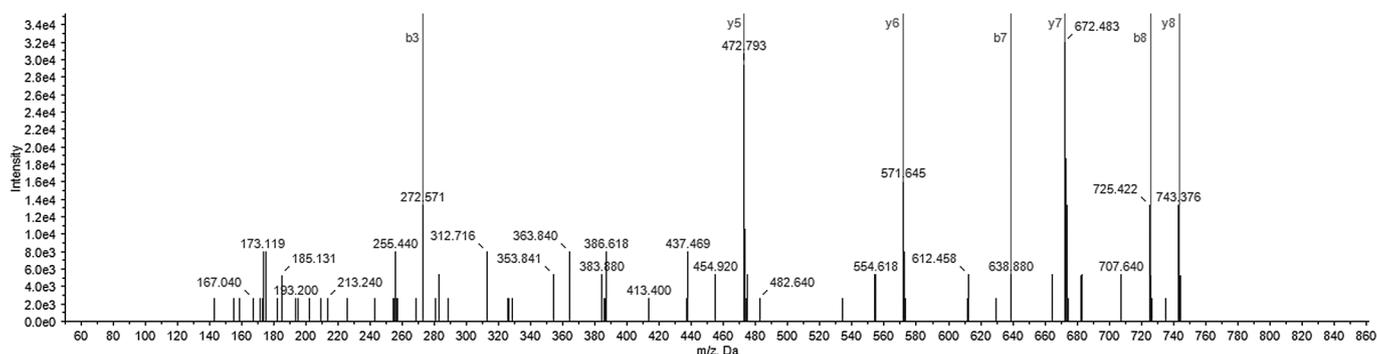


Рис. 1. Спектр пептида КАТЕПСИН L1 (VATVGPISV).

онлайн-программе «SNPStats». Оценивалось соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга, а полученные мультипликативные модели позволили изучить аллельный вклад в развитие нарушений репродуктивной сферы.

Результаты

В ходе данной работы были описаны результаты исследований протеома, генома, транскриптома.

Технологиями протеомного анализа показано, что у детей в зонах экспозиции химическими соединениями происходит нарушение протеомного профиля плазмы крови, ассоциированного с повышенной концентрацией металлов в крови (МУК 4.1.3230-14). В результате выполненных исследований получены новые данные о влиянии ряда металлов на протеомный профиль плазмы крови на примере алюминия. Так, показано, что у детей с отсутствием клинических признаков заболеваний в условиях экспозиции к металлам от источников выбросов металлургических производств происходит нарушение протеомного баланса, ассоциированного с повышенной до 2–3 раз концентрацией амфотерных металлов на примере алюминия, в крови относительно референтного значения. Это может являться прогностически неблагоприятным признаком в плане развития в последующем соматической патологии [17, 27, 31–33].

Идентифицированы белки аннексин-13, SH3-доменный белок-RF3, катепсин L1 и соответственно гены *CTSL*, *SH3RF3*, THO комплексная субъединица 2 и *ANXA13*, их кодирующие, обоснованы в качестве омик-маркёров экспозиции неорганических соединений (рис. 1, 2).

На основе полученной количественной характеристики изменений содержания пептидов в плазме крови доказана их связь с повышенным уровнем алюминия – обоснованы молекулярные маркёры негативных эффектов, характеризующих нарушения нервной системы, структуры и функции сосудов, функций гемоглобина [6, 7].

При этом клинические признаки каких-либо заболеваний у этих детей не выявлены.

Проведённые исследования закономерностей генетического полиморфизма протеинов протеомного профиля плазмы крови человека, ассоциированных с аэрогенным воздействием алюминия с выявлением омик-маркёров экспозиции, позволили обосновать перечень приоритетных генетических маркёров, оказывающих модифицирующее влияние на патогенетические механизмы формирования нарушения функций нервной и иммунной систем, детоксикации 1-й и 2-й её фазы, вероятности развития онкопролиферативных процессов, а также сосудистых нарушений, компрометирующих эндотелий.

Результаты генетического анализа полиморфизма генов у населения, экспонированного химическими соединениями, выявили повышенные уровни частотности вариантного аллеля следующих генов: гены иммунной регуляции – *TLR4* (rs1927911) (толл-подобный рецептор); гены сосудистых факторов – *eNOS* rs1799983 (эндотелиальная NOсинтаза); гены систем детоксикации – копропорфириногенаксидазы *CPOX* (rs1131857), цитохрома p450 *CYP1A1* (rs 1048943); гены онкологических процессов *BRCA1* rs3950989, а также гены нейрогуморальной регуляции – *ANKK1* rs1800497 (ген дофаминового рецептора) и *HTR2A* rs7997012 (ген серотонинового рецептора).

Результаты анализа экспрессии генов позволили за счёт выделения специфических клеточных фенотипов CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, экспрессирующих гены глутаматного рецептора (*GRIA*) и металлопротеиназы (*MMP9*), липопротеина A (ген *LPA*) обеспечить прогнозирование нарушений, ассоциированных с воздействием амфотерных металлов. Результаты специфической индуцированной экспрессии позволили оценить величину и направленность её изменчивости *ex vivo* в сравнении со спонтанной экспрессией. Это позволило выделить ген липопротеина A (ген *LPA*) для всех клеточных популяций крови (кровь, нейтрофилы, лимфоциты) в качестве маркёрного для оценки транскриптомных изменений, индуцированных контаминацией амфотерных металлов (рис. 3).

Выявленные изменения экспрессии генов протеомного профиля плазмы глутаматного рецептора (*GRIA*) и металлопротеиназы

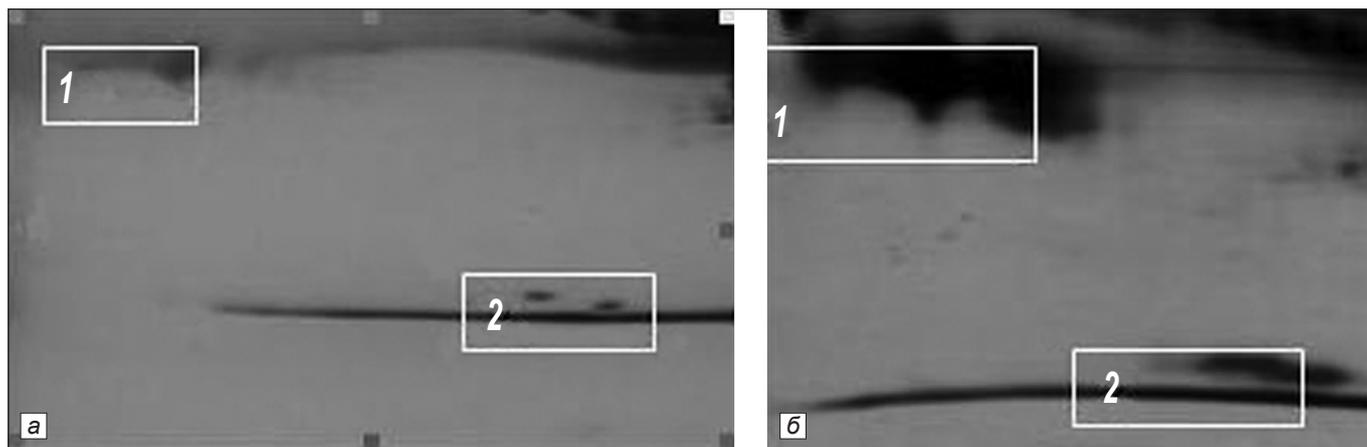
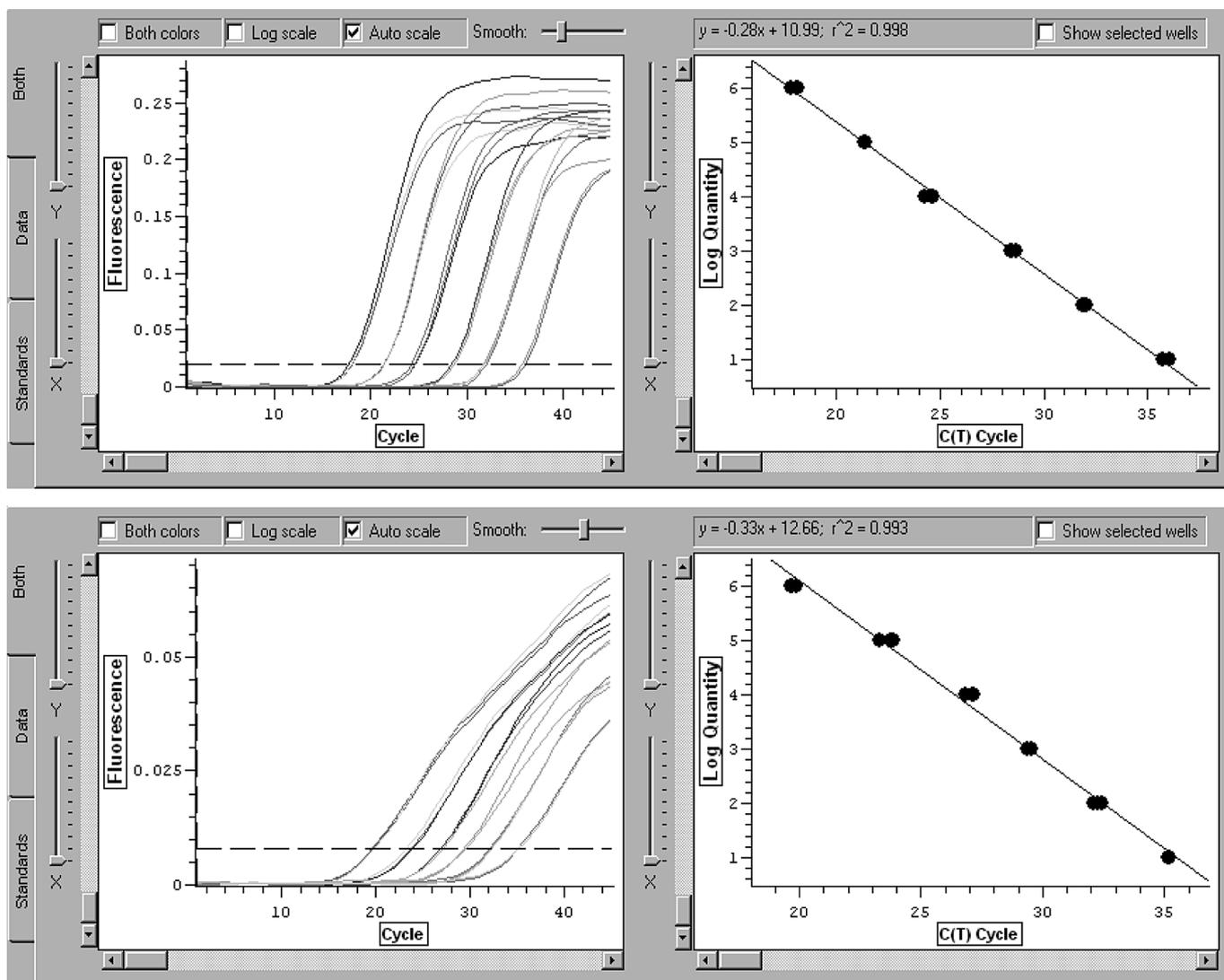


Рис. 2. Протеомные карты плазмы крови детей в условиях экспозиции алюминием: а – группа наблюдения; б – группа контроля.

Рис. 3. FAM детекция гена *LPA* (липопротеин) и HEX детекция гена *ACTB* (актин).

(*MMP9*) указывают на формирование супрессии нейрорегуляторных процессов и репаративных способностей лёгочной ткани у детей, экспонированных металлами [23, 25, 31]. Проведённые исследования по изучению особенностей полиморфных отклонений генов населения регионов Юга Сибири позволили установить следующие маркерные полиморфные генотипы протеома плазмы крови, отвечающие за особенности протеомного профиля плазмы, течения процессов детоксикации 1-й и 2-й фазы, а также нейрогуморальной и иммунной регуляции в условиях аэрогенной экспозиции металлами:

- генотипы, характеризующие особенности функционирования нервной системы *GRIA1* (ген ионотропного рецептора глутамата) *rs545098* (G/A и A/A);
- генотипы, характеризующие особенности функционирования дыхательной системы, – *MMP9* (матриксная металлопептидаза 9) *rs17576* (A/G и G/G);
- генотипы, характеризующие особенности иммунной регуляции, – *TP53* (опухольный протеин P53) C/T, *rs1042522* (C/G и G/G); генотипы толл-подобного рецептора *TLR4* (*rs1927911*) (A/G и G/G).

Условия экспозиции к алюминию реализуются в виде нарушений нейроиммунной регуляции: дефицитом глутамата, гиперпродукцией специфического IgG к алюминию и антиапоптотического транскрипционного фактора Bcl2, что подтверждается наличием достоверных связей маркеров экспозиции и эффекта, которые отсутствуют

в группе контроля, а также наблюдаемыми нарушениями здоровья, характеризующиеся астеновегетативным синдромом [21–23].

При разработке новых медико-профилактических технологий рекомендуется использовать для определения выраженности индивидуальных и популяционных геномных и эпигенетических изменений в контингентах, подвергающихся хронической интоксикации металлами, биомониторинг значимых однонуклеотидных полиморфизмов, включающих в себя следующие гены: *TLR4*, *eNOS*, *CPOX*, *CYP1A1*, *BRCA1*, *ANKK1*, *MMP9*, *SULT1A1*, *HTR2A*, а также определение индикаторных показателей генома и транскриптома, характеризующих состояние полиморфизма и экспрессии белков протеома плазмы крови, – глутаматного рецептора (ген *GRIA*) и металлопротеиназы (ген *MMP9*), липопротеина A (ген *LPA*) с идентификацией белков, формирующих протеомный профиль плазмы крови, – глутамата, специфического IgG к алюминию и антиапоптотического транскрипционного фактора, характеризующих вероятность развития нарушений у детей в виде астеноневротического синдрома [21, 23, 24, 32] с последующим расчётом риска для здоровья. При отсутствии своевременных мер первичной и вторичной профилактики (технологические и санитарно-технические мероприятия на источниках поступления выбросов в атмосферу и мероприятия по медико-экологической реабилитации населения) следствием донозологических изменений может являться развитие патологических состояний со стороны нервной системы, крови, кровообращения.

Обсуждение

Предлагаемые современные наукоёмкие технологические подходы, включающие геномные, транскриптомные и протеомные технологии как инструмент ранней донозологической диагностики нарушений здоровья, ассоциированных с воздействием факторов среды обитания, позволяют своевременно проводить профилактические мероприятия по снижению вреда здоровью (мероприятия по медико-экологической реабилитации (МЭР)). Цель данного исследования другая – «использование возможностей современных критических технологий (геномные, транскриптомные и протеомные технологии) при выполнении медико-биологических и экспериментальных исследований».

Результаты проведенных исследований по изучению геномно-протеомного профиля позволили выявить особенности генетической полиморфности, которые характеризуются достоверно повышенной частотностью мутантных замен в генах, отвечающих за детоксикацию, иммунорегуляцию, клеточную гибель и онкопролиферацию. Полученные результаты коррелируются с данными научных исследований ряда авторов, отмечающих важность полиморфных отклонений в формировании нарушений здоровья в условиях многообразия воздействующих на человека стрессорных факторов [2, 5, 7, 17, 28]. Минорные генотипы кандидатных генов в условиях избыточной контаминации соединениями алюминия достоверно увеличивают риск отклонений показателей иммунной регуляции, что модифицирует механизмы апоптоза, имеющие ключевое значение для формирования атопии и онкопролиферации [25, 27]. Повышенное содержание алюминия в биосредах (> 0,006 мг/л [6]) в группе наблюдения выявлено почти у всей выборки (97,7%).

Результаты анализа полиморфизма генов позволяют обеспечить Службу профилактическим инструментарием минимизации мутагенных эффектов средовых факторов у проживающих в зонах экспозиции алюминием, попадающим в атмосферный воздух с выбросами предприятий цветной металлургии, для решения задач прогнозирования вероятности развития заболеваний (ЦНС, органов дыхания), ассоциированных с ингаляционным поступлением алюминия, а также своевременного выявления групп риска

и повышения эффективности мер профилактики на индивидуальном, групповом и популяционном уровне.

Своевременное выявление групп риска с использованием заявляемых технологий означает установление контингента (на персональном, популяционном уровнях), характеризующегося изменённым генотипом, избыточной контаминацией мутагена, который запускает полиморфный генетический сценарий, и эффектами, например, образованием специфических антител. Обнаружение ранних изменений состояния здоровья позволяет своевременно применить необходимые профилактические меры, такие как мероприятия по медико-экологической реабилитации (МЭР), заключающиеся в иммунологической, детоксикационной, антиоксидантной и т. д. коррекции, для задач предотвращения дальнейшего нанесения вреда здоровью.

Объекты средового загрязнения вторичны, а предлагаемый концептуальный подход будет распространяться и на изменённое качество воды, пищи и т. д. В исследуемой работе уделяется внимание не столько источникам загрязнения, сколько технологиям выявления эффектов загрязнения и соответственно не первичной, а вторичной и третичной профилактике. Информированность об особенностях региональной частотности SNP позволяет осуществлять мероприятия по точечной нозологической реабилитации.

Предлагаемые подходы и технологии позволяют предотвратить и скорректировать запуск полигенных заболеваний с наследственной предрасположенностью в конкретных условиях среды.

На сегодняшний день не вызывает сомнений необходимость внедрения современных высокотехнологических методов исследования в практику санитарно-эпидемиологического надзора для генетического мониторинга и прогнозирования неинфекционных заболеваний у детей, подвергающихся воздействию антропогенных химических соединений. Поэтому идентификация новых генетических маркеров заболеваний человека на основе изучения генов протеомного профиля плазмы крови является актуальной гигиенической задачей в целях снижения неинфекционной заболеваемости, ассоциированной со средовыми факторами.

В результате выполненных исследований получены новые данные о влиянии условий экспозиции металлами на транскриптомный и протеомный профиль плазмы крови.

Литература (пп. 8–18, 20–38 см. References)

- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2018. 268 с.
- Оценка влияния факторов среды обитания на здоровье населения Иркутской области. Информационно-аналитический бюллетень за 2014 год. Иркутск; 2015. 50 с.
- Сучков С.В., Гнатенко Д.А., Костюшев Д.С., Крынский С.А., Пальцев М.А. Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии. *Вестник РАМН*. 2013; 1: 65–71.
- Мурзина Р.Р., Карунас А.С., Гатиятуллин Р.Ф. Фармакогенетика глюкокортикостероидного и β_2 -адренергического рецепторов при бронхиальной астме. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2011; 6 (6): 125–31.
- Мухаммадиева Г.Ф. и соавт. Молекулярно-генетические маркеры в оценке риска развития профессиональных заболеваний у работников химических производств. *Молекулярная медицина*. 2016; 14 (4): 57–61.
- Тиц Н.У. *Клиническое руководство по лабораторным тестам*. М.: ЮНИМЕД-пресс; 2003. 570 с.
- Шугалей И.В., Гарабаджиу А.В., Илюшин М.А., Судариков А.М. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы. *Экологическая химия*. 2012; 21 (3): 172–86.
- Викторова Т.В., Измайлов А.А., Измайлова С.М., Павлов В.Н., Ахмадишина Л.З., Мустафин А.Т. и соавт. Анализ ассоциации полиморфных маркеров генов цитохрома P450 (CYP1A1 и CYP1A2). *Медицинский вестник Башкортостана*. 2010; 8 (2): 25–9.

References

- On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2017: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchija cheloveka; 2018. 268 p. (in Russian)
- Assessment of the impact of environmental factors on the health of the population of the Irkutsk region. Information and analytical Bulletin for 2014. Irkutsk; 2015. 50 p. (in Russian)
- Suchkov S.V., Gnatenko D.A., Kostjushev D.S., Krynskiy S.A., Pal'cev M.A. Proteomics as a fundamental tool of preclinical screening, verification of analyses and evaluation of applied therapy. *Vestnik RAMN [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2013; 1: 65–71. (in Russian)
- Murzina R.R., Karunas A.S., Gatijatullin R.F. Pharmacogenetics of glucocorticosteroid and β_2 -adrenergic receptors in bronchial asthma. *Meditinskij vestnik Bashkortostana*. 2011; 125–31. (in Russian)
- Muhammadiyeva G.F. et al. Molecular genetic markers in assessing the risk of occupational diseases in chemical workers. *Molekulyarnaya meditsina [Molecular Medicine]*. 2016; 14 (4): 57–61. (in Russian)
- Tic N.U. *Clinical guide to laboratory tests [Klinicheskoye rukovodstvo po laboratornym testam]*. Moscow: YuNIMED-press; 2003. 570 p. (in Russian)
- Shugalej I.V., Garabadzhiu A.V., Ijushin M.A., Sudarikov A.M. Some aspects of the influence of aluminum and its compounds on living organisms. *Ekologicheskaya khimiya*. 2012; 21 (3): 172–86. (in Russian)
- PROTEAN i12 IEF System. Instruction Manual Available at: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/1sr/Literature/10022069A.pdf> (accessed: 20.05.2018).
- Shaw Ch.A. Aluminium in the central nervous systems (CNS). Toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immun Res*. 2013; 56 (2–3). DOI: 10.1007/s12026-013-8403-1.
- Pogue A.L., Lukiw W.J. Aluminium, the genetic apparatus of the human CNS and Alzheimer's disease (AD). *Morphologie*. 2016; 100 (329): 56–64. DOI: 10.1016/j.morpho.2016.01.001.
- Reinhard S/M., Razak K., Ethell I.M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 280. DOI: 10.3389/fncel.2015.00280.

12. Rybakowski J.K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9)-a Mediating Enzyme in Cardiovascular Disease, Cancer, and Neuropsychiatric Disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2009; 2009: 904836. DOI: 10.1155/2009/904836.
13. Skarabahatava A.S., Lukyanenko L.M., Slobozhanina E.I., Falcioni M.L., Orlando P., Silvestri S. et al. Plasma and mitochondrial membrane perturbation induced by aluminum in human peripheral blood lymphocytes. *J Trace Elem Med Biol.* 2015; 31: 37–44. DOI: 10.1016/j.jtemb.2015.02.002.
14. Cheng D., Tang J., Wang X., Zhang X., Wang S. Effect of aluminum (Al) speciation on erythrocytic antioxidant defense process: Correlations between lipid membrane peroxidation and morphological characteristics. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 157: 201–6. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.039.
15. Kahbasi S., Samadbin M., Attar F., Heshmati M., Danaei D., Rasti B. et al. The effect of aluminum oxide on red blood cell integrity and hemoglobin structure at nanoscale. *Int J Biol Macromol.* 2019; 138: 800–9. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.154.
16. Sinczuk-Walczak H., Szymczak M., Razniewska G., Matczak W., Szymczak W. Effects of occupational exposure to aluminium on nervous system: clinical and electroencephalographic findings. *Int J Occup Med Environ Health.* 2003; 16 (4): 301–10.
17. Chin-Chan M., Navarro-Yepes J., Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 124.
18. Walton J.R., Wang M.X. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminium in a rodent model for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* 2009; 103: 1548–54.
19. Viktorova T.V., Izmajlov A.A., Izmajlova S.M., Pavlov V.N., Ahmadishina L.Z., Mustafin A.T. et al. Analysis of Association of polymorphic markers of cytochrome P450 genes (CYP1A1 and CYP1A2). *Meditinskiy vestnik Bashkortostana.* 2010; 8 (2): 25–9. (in Russian)
20. Somova L.M., Plehova N.G. Nitric oxide as a mediator of inflammation. *Vestnik DVO RAN.* 2006; 6: 77–80. (in Russian)
21. Anderson M., Deakin J.F.W. Relationship between 5-HT function and impulsivity and aggression in male offenders with personality disorders. *Br J Psychiatry.* 2001; 178: 352–9.
22. Boverhof D.R., Ladies G., Luebke B. Approaches and considerations for the assessment of immunotoxicity for environmental chemicals: a workshop summary. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014; 68 (1): 96–107.
23. Haroon E., Miller A.H. Inflammation effects on glutamate as a pathway to neuroprogression in mood disorders. *Mod Trends Pharmacopsychiatry.* 2017; 31: 37–55.
24. Arreola R. et al. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J Immunol Res.* 2015: 21.
25. Meldrum B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000; 130 (4): 1007–15.
26. Park B.S., Lee J.O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013; 45 (12): 66. DOI: 10.1038/emm.2013.97.
27. Tesse R., Pandey R.C., Kabesch M. Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy. *Allergy.* 2011; 66 (3): 307–16. DOI: 10.1016/j.jyder.2012.02.068.
28. Tenero L., Piazza M., Zanon L. et al. Antioxidant supplementation and exhaled nitric oxide in children with asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2016; 37: 8–13. DOI: 10.2500/aap.2016.37.3920.
29. Ariza M. et al. Dopamine Genes (DRD2/ANKK1-TaqA1 and DRD4-7R) and Executive Function: Their Interaction with Obesity. *PLoS One.* 2012; 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0041482.
30. Ghosh J., Pradhan S., Mittal B. Identification of a novel ANKK1 and other dopaminergic (DRD2 and DBH) gene variants in migraine susceptibility. *Neuromolecular Med.* 2013; 15 (1): 61–73. DOI: 10.1007/s10072-013-1415-8.
31. Radunovic M. et al. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer. *J BUON.* 2016; 21 (3): 597.
32. Yamada T., Tongu M., Goda K., Aoi N., Morikura I., Fuchiwaki T. et al. Sublingual immunotherapy induces regulatory function of IL-10-expressing CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells of cervical lymph nodes in murine allergic rhinitis model. *J Allergy.* 2012; 11. DOI: 10.1155/2012/490905.
33. Malmer B. et al. p53 Genotypes and risk of glioma and meningioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14 (9): 2220–3. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0234.
34. Patricia Alves Reis, Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque, Tatiana Maron Gutierrez, Adriana Ribeiro Silva, Hugo Caire de Castro Faria Neto. Role of Nitric Oxide Synthase in the Function of the Central Nervous System under Normal and Infectious Conditions. DOI: 10.5772/67816.
35. Kielian T. Toll-Like Receptors in Central Nervous System Glial Inflammation and Homeostasis. *J Neurosci Res.* 2006; 83 (5): 711. DOI: 10.1002/jnr.20767.
36. Okuna E., Griffioen K.J., Rothman S., Wan R., Cong Wei-Na, De Cabo R. et al. Toll-Like Receptors 2 and 4 Modulate Autonomic Control of Heart Rate and Energy Metabolism. *Brain Behav Immun.* 2014; 36: 90. DOI: 10.1016/j.bbi.2013.10.013.
37. Simon R. Platt. The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. 2007; 173 (2): 278–86. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.11.007.
38. МР 4.2.0075-13. Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов. М.; 2013. 18 с.