

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова
подпись инициалы, фамилия
«___» июля 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Использование наноразмерных частиц при выделении нуклеиновых кислот с
тема
последующей детекцией полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 при гестозе
и онкогематологических заболеваниях

Руководитель _____ доцент, к.м.н. А. В. Барон
подпись, дата _____ должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____
подпись, дата

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Магнитные частицы	6
1.2 Хронические миелопролиферативные заболевания	8
1.3 Острый лейкоз	10
1.4 Гестоз	12
1.5 Ген XRCC1	14
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	23
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	24
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	25

ВВЕДЕНИЕ

Особое внимание к наноматериалам вызвано наличием у них исключительных физико-химических свойств. Именно благодаря этому становится возможным создание структур с новыми механическими, оптическими и электрическими свойствами на основе наночастиц. Не мало исследований направлено на использование магнитных частиц в роли носителей для целевой доставки лекарственных веществ, агентов локальной гипертермии. В практике они уже используются для выделения ДНК и клеток крови [1].

Использование наноматериалов в медицине и фармакологии является существенным направлением, дающим возможность решать насущные проблемы в данных сферах. Данные технологии модифицируют сформировавшиеся научные дисциплины и позволяют учреждать другие виды исследований. Формирование такой дисциплины как нанобиотехнология стало результатом объединения достижений нанотехнологии и биотехнологии. Ее становление может привести к образованию наноконструкций, способных регулировать биосистемы на молекулярном уровне [2].

Выделение ДНК — необходимый этап подготовки проб перед диагностическими и биохимическими процессами. При выборе метода следует учитывать приоритет предъявляемых к нему требований, например, высокий выход нуклеиновой кислоты, быстрота метода, большая пропускная способность или высокое качество продукта. Имеется немало способов, позволяющих выделять нуклеиновую кислоту из обширного ряда образцов, но только несколько способны к автоматизации и на многих этапах выделения существует высокий риск контаминации. Наличие загрязняющих веществ, таких как белки или карбогидраты, в подобных комплексных смесях часто мешает провести необходимые реакции и методики.

Эксплуатация магнитных носителей в биохимических и молекулярно биологических процессах имеет множество достоинств по сравнению с

немагнитными сепарационными методами. Так, выделение ДНК методом магнитных частиц характеризуется возможностью выделять большое количество нуклидов из-за значительного объёма сорбента, минимизацией потери в момент выделения, малым риском перекрестной контаминации, так как почти все нуклеиновые молекулы связываются сорбентом, масштабностью методики, высоким качеством продукта на выходе, а также возможностью автоматизации процесса.

Вдобавок при таком методе выделении ДНК легко можно отделить составляющие клеточного лизата, которые способны ингибировать ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию.

Одним из основных способов поддержания стабильности генетического материала является репарация ДНК, функционирование которой в норме обеспечивает восстановление повреждений в структуре ДНК [3]. Репарация – это сложный ферментативный процесс, контролируемый более чем 150 генами [4]. Мутации в этих генах приводят к тяжелой наследственной патологии, сопровождающейся хромосомной нестабильностью и злокачественными новообразованиями [5].

Особое место среди антионкогенов занимают гены, кодирующие компоненты системы эксцизионной репарации ДНК. Они могут восстанавливать повреждения ДНК, появляющиеся в результате внешних (канцерогены, ксенобиотики) и внутренних (ошибки репликации) воздействий, и удалять с помощью апоптоза клетки, у которых генетический аппарат не может восстановиться [6]. Доказано, что накопление повреждений в ДНК, ведущих к ослаблению репарационной системы, приводит к повышению частоты заболеваний раком [7].

Одним из важных генов принимающих участие в эксцизионной репарации является ген XRCC1, нарушение функции которого приводит к злокачественному перерождению клетки. Ввиду важности выполняемых им функций в процессе поддержания генетической стабильности изучение генов репарационной системы является актуальным [8,9].

Популяция человека как вида генетически неоднородна, поэтому нуклеотидная последовательность генов, кодирующих ферменты систем поддержания целостности генома, у различных людей может различаться (генетический полиморфизм). Чаще всего это приводит к вариациям в активности отдельных элементов систем репарации ДНК. Что, в свою очередь, может переместить баланс восстановительных и повреждающих процессов. Экспериментально доказано, что полиморфизмы генов систем репарации ДНК связаны с такими последствиями воздействия повреждающих агентов как высокий уровень мутаций в гене, повышенный уровень спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций, сниженная эффективность и плохая переносимость химической и лучевой терапии. И, как следствие, являются факторами повышенного риска развития разных онкопатологий. Таким образом, есть основания предполагать, что эти полиморфизмы могут являться возможными маркерами индивидуальной чувствительности организма к генотоксичным факторам.

Целью настоящей работы было повышение эффективности метода выделения ДНК с помощью магнитных частиц и исследование частоты встречаемости полиморфизма Arg399Gln в гене XRCC1 у пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями, острым лейкозом и гестозом.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- 1) Исследовать выделение ДНК методом магнитных частиц с различными покрытиями;
- 2) Изучить распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 у больных гестозом, острым лейкозом и ХМПЗ.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Магнитные частицы

Наночастицы обладают высокоразвитой активной поверхностью, а следовательно и высокой сорбционной емкостью. Из-за своих размеров (менее 100 нм), сопоставимых с размерами клеток (10—100 мкм), вирусов (20—450 нм), белков (5—50 нм) и ДНК (2 нм шириной, 10—100 нм длиной), они способны приближаться к биообъекту и взаимодействовать с ним [10].

Можно выделить следующие основные подходы к созданию наночастиц:

- 1) Получение из макроскопических веществ методом эмульгирования;
- 2) Химический синтез;
- 3) Превращение с изменением состава.

К сегодняшнему дню разработан ряд общих методов синтеза наночастиц. Большинство из них можно использовать и для получения магнитных наночастиц, существенной особенностью которых является получение частиц заданного размера и формы (разброс по размерам должен быть не большим (5-10%) и поддаваться контролю) [11].

Свойства магнитных наночастиц зависят от многих факторов, таких как их размер и форма, химический состав и тип кристаллической решетки [1].

При переходе вещества в наносостояние значительно изменяются его магнитные свойства, вследствие чего частицы обладают ферро- и суперпарамагнитными свойствами. Суперпарамагнетики магнитны только при наложении магнитного поля, а ферромагнетики имеют постоянный средний магнитный момент и более сильные магнитные свойства [12].

Наночастицы, обладающие магнитными свойствами, представляют особый интерес для медицины. Это связано с возможностью их дистантного

управления и конструкциями на их основе при наложении внешнего магнитного поля.

Оксидные частицы обладают более слабыми магнитными свойствами, чем частицы на основе металлов, хотя они более устойчивы к окислению. На сегодняшний день наиболее широкое применение в биомедицине получили частицы оксида железа, так как они обладают низкой токсичностью и стабильностью [13].

Оригинальностью поведения наночастиц в растворе является их стремление к агрегации, поэтому перед практическим использованием необходимо их стабилизировать (нанести покрытия на поверхность магнитного «ядра», добавить стабилизаторы, подобрать растворители). Применяемые покрытия делятся на органические (полимеры) и неорганические (кремнезем, углерод, благородные металлы) [14].

Кроме защиты покрытие может играть роль спейсера для соединения фармацевтических агентов или биомолекул с магнитным носителем. С помощью покрытия становится возможным модификация поверхности частиц различными функциональными группами, что способствует ковалентному связыванию частиц с биомолекулами или лекарственными средствами [15].

Иммобилизация на поверхности наночастицы приводит к стабилизации биомолекул и их защите от деградации. Доказано, что ДНК, иммобилизованная на поверхности наночастицы, сохраняет свою стереометрию и становится устойчива к действию нуклеаз [16].

Наночастицы благородных металлов отличаются универсальными свойствами. Так, наночастицы серебра, демонстрируют плазмонный резонанс, обладают повышенной химической и биологической активностью, ингибируют вирусы. Их биоцидный эффект превосходит воздействие соответствующих ионов в тех же концентрациях. Показано, что покрытия из благородных металлов на поверхности магнитных частиц сохраняют их свойства, а также улучшают биосовместимость. Применение композитов, содержащих частицы

магнитных материалов и благородных металлов, позволяет использовать комплекс уникальных свойств их составляющих, реализовать новые свойства, возникающие вследствие взаимного влияния элементов, и предложить новые подходы к лечению и диагностике опухолей [17].

1.2 Хронические миелопролиферативные заболевания

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) — это группа, включающая несколько клональных Ph-негативных гематологических болезней. К самым частым ХМПЗ относятся истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ) [18]. Их генезис связан с преобразованием гемопоэтической стволовой клетки, из-за этого начинается чрезмерная продукция зрелых клеток эритроидного, мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков с относительно длительным течением заболевания. Вдобавок они схожи клинической картиной и общими генетическими изменениями, в том числе, наличием мутации V617F в гене тирозиновой янус-киназы (Jak2). Данная мутация ведет к аутофосфорилированию Jak2 в гемопоэтических клетках и, следовательно, к активации сигнальных путей, регулирующих разрастание гемопоэтических клеток [19].

ИП отличается гиперплазией эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков миелопоэза, с преобладающей пролиферацией эритроидного ростка кроветворения, увеличением количества эритроцитов и уровня гемоглобина, тромбоцитозом, лейкоцитозом в периферической крови, независимостью эритропоэза от нормальных механизмов регуляции. Болезнь часто развивается с увеличением размеров селезенки, высоким риском кровотечений и тромбоэмбологических осложнений.

ЭТ характеризуется тромбоцитозом ($>450 \times 10^9/\text{л}$ тромбоцитов) с разрастанием главным образом мегакариоцитарного ростка, увеличение

селезенки распознается редко, существует высокий риск тромботических или геморрагических ухудшений. Возраст старше 60 лет и перенесенные ранее тромбозы являются основными факторами риска при ИП и ЭТ. Тем не менее соматические мутации тоже включены в прогностическую шкалу как факторы риска [20].

МФ проявляется развитием ретикулинового или коллагенового (на поздних стадиях) фиброза костного мозга, разрастанием мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков кроветворения с признаками неправильного развития мегакариоцитов [21,22]. Миелофиброз, как первичный, так и посттромбоцитемический, имеет достаточно агрессивное течение (в отношении общей выживаемости и качества жизни) среди классических РН-негативных ХМПЗ. Трансплантация гемоцитобласт у пациентов с высоким и промежуточным риском на данный момент является единственным способом лечения, дающим возможность удлинить продолжительность жизни, но связана с высоким риском смерти [23].

ХМПЗ включают также хронический миелолейкоз (ХМЛ) с характерным присутствием филадельфийской хромосомы и репликацией химерного транскрипта bcr-abl [19]. ХМЛ развивается вследствие гиперпродукции гранулоцитов гемоцитобласта, которая проходит в костном мозге, а также в селезенке и печени. Хотя преобладает продукция гранулоцитов, опухолевый клон включает в себя также эритроциты, мегакариоциты, моноциты и иногда Т- и В-клетки. Нормальные стволовые клетки сохраняются и могут активизироваться после лекарственной супрессии опухолевого клона.

В настоящее время доказано, что высокий уровень аллельной нагрузки мутации JAK V617F связан с более агрессивным течением ИП. Он также влияет на клинико-гематологическую картину пациентов с ЭТ, вместе с этим отмечается повышение численности нейтрофилов, высокую скорость тромбообразования и более усиленное развитие МФ. Количественное определение доли мутантного аллеля V617F может использоваться для

косвенного определения степени фиброза в костном мозге и селезенке при ПМФ. Напротив, низкая аллельная нагрузка мутации при ПМФ связана со снижением показателей выживания больных. Актуальность количественного определения уровня аллельной нагрузки тоже связана с возможностью оптимизации схем лечения, влияющих на активность этого фермента [24].

До обнаружения специфических генетических дефектов у Ph-негативных ХМПЗ их диагностика строилась с учетом гистологии костного мозга и некоторых лабораторных и клинических данных. Большой частью это давало возможность отличить клональные миелопролиферации от реактивных и одно ХМПЗ от другого.

Общие характеристики, которые объединяют эти болезни, включают гиперклеточность костного мозга, склонность к тромбозам и геморрагиям, риск лейкозной трансформации и развитие фиброза в процессе эволюции болезни. Однако, несмотря на активное изучение этих болезней, их молекулярная основа оставалась неизвестной в течение более пяти десятилетий [25].

В последние годы в связи с появлением высокочувствительных тестов удается выявлять низкие (менее 2%) нагрузки мутантного аллеля V617F за долго до появления первых признаков онкогематологического заболевания. Вместе с тем, у людей с низкой аллельной нагрузкой и без сдвигов в формуле крови отмечается повышенная склонность к развитию таких заболеваний как ишемический инсульт, инфаркт миокарда и тромбозы глубоких вен [26]. Одно из возможных объяснений длительной персистенции данной соматической мутации также может заключаться в недостаточной эффективности систем репарации ДНК.

1.3 Острый лейкоз

Острый лейкоз (ОЛ) - заболевание, в принципе которого лежит образование клона злокачественных (blastных) клеток, имеющих общую

клетку-предшественнику. Бласты проникают в костный мозг, вытесняя с течением времени нормальные гемопоэтические клетки, что приводит к стремительному угнетению кроветворения. Для многих типов лейкозов характерна также бластная инфильтрация внутренних органов. Острый лейкоз делят на миелобластный (ОМЛ) и лимфобластный (ОЛЛ). Последний наиболее часто появляется в возрасте 2 - 10 лет (пик в 3 - 4 года), потом распространенность болезни падает, тем не менее после 40 лет фиксируется повторный подъем. ОЛЛ составляет примерно 85% лейкозов у детей. ОМЛ, наоборот, чаще встречается у взрослых, причем его шанс возникновения увеличивается с возрастом [27].

Клиническая картина острого лейкоза очень изменчива, и на данный момент нет четкого представления о молекулярно-генетических механизмах, участвующих в клиническом проявлении течения заболевания. Развитие онкогенеза содержит патологические изменения как на молекулярном, так и на клеточном уровне. Например, для лейкозных клонов в результате дестабилизации структуры генома и дисбаланса процессов пролиферации и апоптоза характерны различные нарушения клеточной саморегуляции. Стремительный прогресс исследований значения апоптоза и пролиферации в развитии злокачественных новообразований содействовало разработке новых лечебно-диагностических мероприятий при заболеваниях кроветворной системы [28].

Подверженность к развитию злокачественных новообразований и опухолевая прогрессия видоизменяются аллельными вариантами генов, контролирующих деление, апоптоз клеток и эксцизионную репарацию ДНК. В их число входит однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) G28152A гена XRCC1[29].

1.4 Гестоз

Гестоз – это патологическое состояние, появляющееся после 20-й недели беременности. Он характеризуется такими основными симптомами, как артериальная гипертензия, протеинурия, отеки. Их проявление может сильно варьировать [30]. Часто наблюдается неврологическая симптоматика (головная боль, тошнота, рвота), в 1-1,5% от всех гестозов возникает тяжелая форма - эклампсия, которая характеризуется обмороками, судорогами и комой. Она может привести к отеку легких и мозга, кровоизлиянию в мозг, и, в результате, стать причиной смерти матери и плода [30,31,32]. Ежегодно в мире от эклампсии погибает около 50 000 женщин [33]. В 10-20% случаев во время эклампсии развивается HELLP-синдром (гемолиз, повышение активности ферментов печени, тромбоцитопения) [34], который представляет из себя острую жировую дистрофию печени и холестатический гепатоз, он характеризуется высокой перинатальной и материнской смертностью. Тем не менее нет единогласного утверждения, является ли HELLP-синдром отдельной формой гестоза или является самостоятельным заболеванием [31,34]. Гестоз может появиться на разных сроках беременности. При развитии до 34 недели риск материнской смертности увеличивается в 22 раза по сравнению с женщинами, у которых заболевание возникает в более поздние сроки. К тому же вероятность благополучного исхода для плода составляет менее 50% [35]. После родов симптомы гестоза проходят. Клиническое течение гестоза может быть медленным, скачкообразным, стремительно прогрессирующим и молниеносным [30,32]. Не всегда удается предугадать исход беременности. Любая форма гестоза непредсказуема, может быстро прогрессировать и приводить к развитию осложнений, угрожающих жизни матери и плода [31]. У 70–80% беременных гестоз протекает на фоне предшествовавшего заболевания [36]. В зависимости от этого гестоз подразделяют на чистый и сочетанный. Чистым называется

гестоз, возникающий у женщин с невыявленными экстрагенитальными заболеваниями [30,36,37,38].

Появляется все больше свидетельств того, что окислительный стресс имеет большое значение в механизме возникновения и развитии гестоза [39,40]. При здоровой беременности баланс между антиокислительными процессами и перекисью липидов поддерживается. Напротив, беременность с гестозом характеризуется дисбалансом в этих процессах, приводящим к увеличению окислительного стресса [41-43]. Концентрация кислорода на границе плода и матери колеблется вследствие изменения структуры сосудов в тканях матки [44]. Инфекция, воспаление, прогрессивное ремоделирование тканей и изменения в сосудистой перфузии порождают активные формы кислорода (АФК), включая O_2 -гидроксильный радикал и перекись водорода (H_2O_2), способные повредить нуклеиновые кислоты, белки и липиды, если уровни этих АФК превосходят внутриклеточную антиоксидантную защиту [45].

Наибольшая часть поврежденной ДНК может быть удалена и восстановлена при переносе ферментов, восстанавливающих ДНК. По этой причине нормальная функция этих ферментов необходима для сохранения целостности генома [46]. Различные процессы репарации ДНК, такие как восстановление эксцизионных оснований (BER), эксцизионное восстановление нуклеотидов (NER) и несоответствие и восстановление двухцепочечных разрывов, прогрессировали для реализации критических функций восстановления. Недостаток репарации ДНК связан с мутациями в генах, приводящих к полной утрате функции белка репарации ДНК, между тем как более мелкие различия в способности к репарации происходят из-за наследования полиморфизмов в генах [47]. Гены репарации ДНК несут генетические полиморфизмы с потенциалом изменять функцию гена и способность репарации ДНК [48]. Например, белок XRCC1 играет решающую роль в координации двух перекрывающихся путей репарации,

BER и репарации одноцепочечных разрывов (SSBR) [49]. Замена Arg399Gln (rs25487) может изменять функцию белка XRCC1 [50,51].

1.5 Ген XRCC1

Ген XRCC1 является важным звеном в механизме исправления ошибок - эксцизионной репарации оснований, при которой поврежденное азотистое основание удаляется специфической ДНК-гликозилазой до вскрытия сахарофосфатного каркаса ДНК (рис. 1).

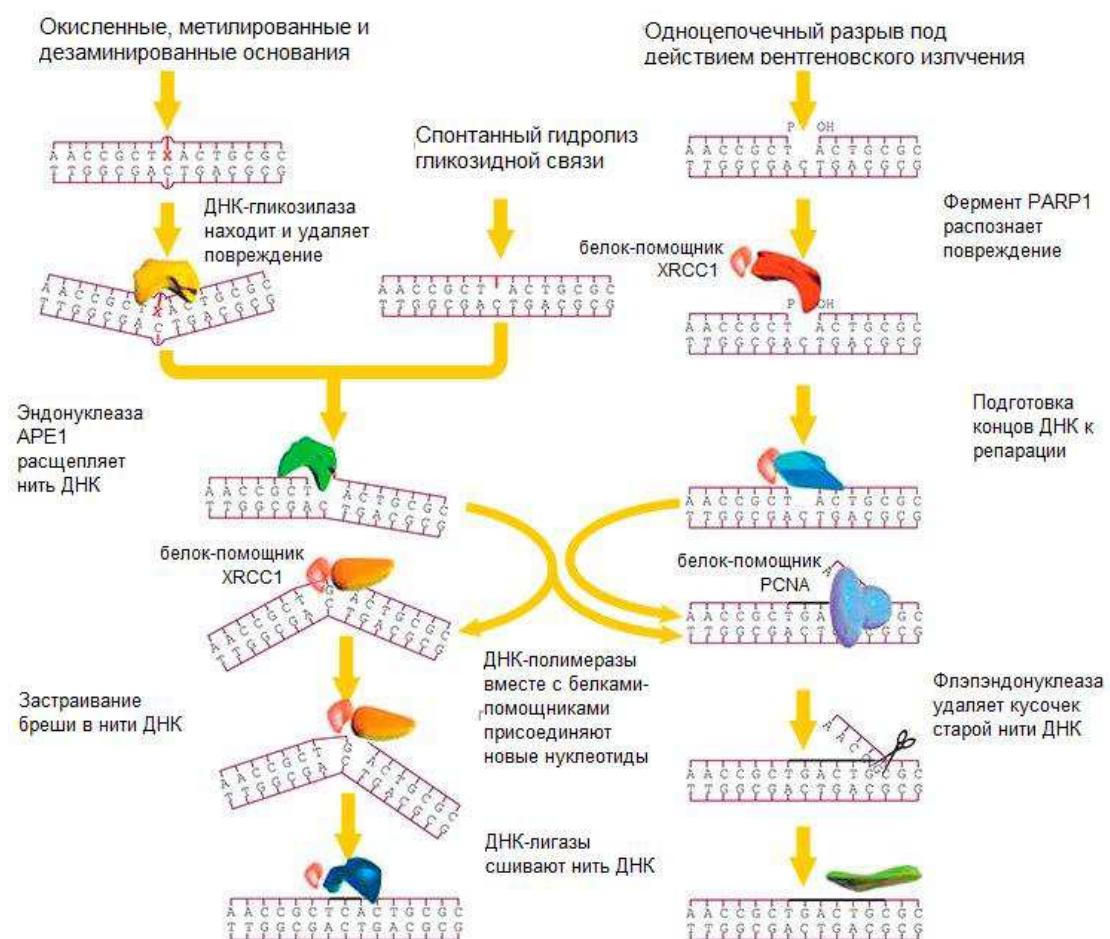


Рисунок 1 – Схема эксцизионной репарации ДНК [52]

Наиболее исследованный полиморфизм гена XRCC1 находится в 399 кодоне около С-белкового конца, в сайте взаимодействия XRCC1 с поли(ADP-рибоза) полимеразой [53]. ОНП гена XRCC1 Arg399Gln

обуславливает замену аминокислоты аргинин на глутамин в структуре кодируемого белка, снижая его активность, вследствие чего замедляется сборка репарационного комплекса [28]. Данную мутацию в гене XRCC1 связывают с повышенным риском развития злокачественной трансформации клеток, в том числе образования рака легкого, рака желудка, лимфом [54,55]. В ряде работ отмечается связь между полиморфизмом Arg399Gln с развитием лимфопролиферативных опухолей и ОЛЛ [56]. Также есть факты указывающие, что этот полиморфизм принимает участие в развитии миелоидного лейкоза, но не связан с заболеваниями, не нарушающими терминальной дифференцировки клеток крови [19].

Роль генов BER трудно переоценить, потому что нарушения в согласованной работе систем поддержания стабильности генома являются начальным звеном в цепочке событий, приводящих к злокачественной трансформации клетки.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования были использованы данные обследования 602 больных пациентов и 114 клинически здоровых добровольцев, составивших группу контроля. Диагноз участников эксперимента в сравниваемых группах представлен в табл. 1. Его устанавливали согласно клиническим рекомендациям ВОЗ (2008).

Таблица 1 - Характеристика пациентов при различных заболеваниях

Диагноз	Число проб	Пол		Возраст, годы: медиана
		М	ж	
ХМПЗ	480	211	269	63
ЭТ	196	70	126	65
ИП	199	109	90	62
МФ	74	29	45	67
ОЛ	13	8	5	57
ХМЛ	24	6	18	67
Гестоз	29	0	29	40
Низкие нагрузки мутации JAK V617F	56	27	29	45
Группа контроля	114	72	42	21

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью магнитных частиц [57]. Сами магнитные частицы были изготовлены в Институте Физики СО РАН путем химического соосаждения ионов Fe_2 и Fe_3 в щелочном растворе с последующей обработкой в гидротермальных условиях. 100 мл раствора (1М FeSO_4 , 7 H_2O и 2М FeCl_3) тщательно перемешивали и добавляли к 8М гидроксиду аммония при постоянном перемешивании при 25°C. Полученные таким образом частицы проявляли сильные магнитные свойства. Примесные ионы (хлориды и сульфаты) ликвидировали, промывая частицы горячей дистиллированной водой. Выход осажденных магнитных частиц определяли при помощи удаления известных аликвот супензии и сушки до постоянной массы при 60°C. В итоге магнитные частицы диспергировали в ТЕ-буфере (10 мМ Трис- HCl и 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) и хранили при исходной концентрации 10 мг/мл. Полученные магнитные наночастицы были стабильны при комнатной температуре (25-30°C) без агломерации. Средний размер частиц, определенный с помощью просвечивающей электронной микроскопии, составлял около 40 нм.

Получение $\text{Ag}-\text{Fe}_3\text{O}_4$ проводили с помощью образования мицеллярных структур при обработке ультразвуком раствора, содержащего частицы Fe_3O_4 в органической фазе и AgNO_3 в воде (рис. 2). Под воздействием ультразвука поставляется энергия, необходимая для формирования микроэмulsionи, стабилизируемой наночастицами, которые самоупорядочиваются на границе раздела жидкость/жидкость [17].

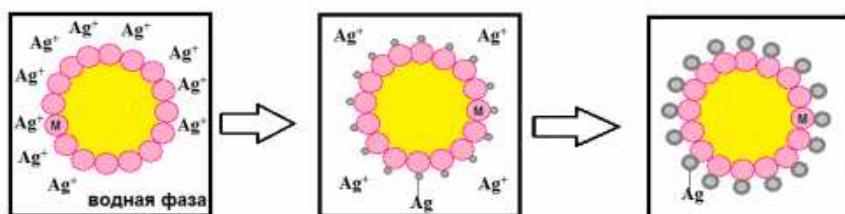


Рисунок 2 – Схема мицеллярного синтеза гетеродимеров $\text{Ag}-\text{Fe}_3\text{O}_4$

Для получения ДНК брали 30 мкл образца и добавляли к нему 30 мкл 1% раствор додецилсульфата натрия. Пробирку перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течение минуты. После инкубации к лизату клеток добавляли 10 мкл магнитных частиц, покрытых серебром, с последующим внесением 75 мкл буфера для связывания (1,25M NaCl и 10% ПЭГ 6000). Суспензию взбалтывали и оставляли на 3 минуты при комнатной температуре. Магнитные частицы иммобилизовали с помощью внешнего магнита и сливали супернатант. Магнитный осадок промывали 70% этанолом и сушили 10 минуты при 65°C. После осадок ресуспендировали в 50 мкл ТЕ-буфера (10мМ Трис-HCl, 1мМ ЭДТА, pH 8,0) и ДНК, связанную с магнитными частицами, элюировали 5 минутной инкубацией при 65°C. Супернатант с ДНК вносили в новую пробирку и анализировали.

Концентрацию ДНК измеряли при помощи набора dsDNA HS Assay Kit на флюориметре Qubit («Invitrogen», США).

Выявление полиморфизма Arg399Gln в гене XRCC1 проводили методом ПЦР-РВ с использованием системы TaqMan Assay и двух пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участку гена XRCC1 (F: GTA-AGG-AGT-GGG-TGC-TGG-ACT-GT; R: GTC-TGA-CTC-CCC-TCC-AGA-TTC-C) и двух зондов (A-аллель: FAM-CTG-CCC-TCC-CAG-AGG-TAA-GGC-CTC-BHQ1; G-аллель: HEX-CTG-CCC-TCC-CGG-AGG-TAA-GGC-C-BHQ1).

Статистическую обработку результатов распределения частот полиморфных вариантов гена XRCC1 среди сравниваемых групп проводили методом χ^2 в соответствии с аддитивной моделью с помощью веб-приложения «Генетический калькулятор» на сайте ООО «ГенЭксперт» (http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования проведен анализ полиморфизма Arg399Gln гена системы репарации ДНК XRCC1 в отношении риска развития гестоза, острого лейкоза и ХМПЗ.

Исходя из поставленных задач, были получены следующие результаты:

- 1) Показано успешное использование магнитных частиц покрытых серебром в выделении ДНК из лейкоцитов периферической крови человека;
- 2) Не выявлено достоверной связи полиморфизма Arg399Gln с развитием ХМПЗ;
- 3) Обнаружен уровень значимости близкий к статистической тенденции у пациентов с низкими нагрузками мутации JAK V617F и гестозом для полиморфизма Arg399Gln;
- 4) Связь риска развития острого лейкоза и изучаемого полиморфизма не подтвердилась, но требует дальнейшего изучения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BCR-ABL – гибридный белок, продукт гибридного гена BCR-ABL1; онкобелок;

BER (base excision repair) – эксцизионная репарация оснований;

Jak2 – ген тирозиновой янус-киназы;

XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) – перекрестно-дополняющий белок 1 репарации рентгеновских лучей;

АФК – активные формы кислорода;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИП – истинная полицитемия;

МФ – миелофиброз;

ОЛ – острый лейкоз;

ОЛЛ – лимфобластный лейкоз;

ОМЛ – миелобластный лейкоз;

ОНП – одноклеточный полиморфизм;

ПМФ – первичный миелофиброз;

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

ХМЛ – Хронический миелолейкоз;

ХМПЗ – хронические миелопролиферативные заболевания;

ЭТ – эссенциальная тромбоцитемия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Васюков, Г. Ю. Поверхностно модифицированные магнитные наночастицы для медико-биологического применения / Г.Ю. Васюков, И.В. Митрофанова, В.В. Иванова, В.Д. Прокопьева // Бюллетень сибирской медицины, 2014. – Т. 13. - № 6. – С. 33–40.
2. Першина, А. Г. Использование магнитных наночастиц в биомедицине / А.Г. Першина, А.Э. Сазонов, И.В. Мильто // Бюллетень сибирской медицины, 2008. – № 2. – С. 70-78.
3. Ганцев, Ш. Х., Функционирование генов онкосупрессии (TP53, BRCA1) и их взаимодействие с цитокинами при раке молочной железы / Ш.Х. Ганцев, В.Ю. Горбунова, Г.Ф. Галикеева, Е.В. Воробьева, Э.М. Васильева, Р.А. Рустамханов // Креативная онкология и хирургия, 2012. – №2.
4. Tamer, L. Human DNA repair genes / L. Tamer, N.A. Ates, C. Ates, B. Ercan, T. Elipek, H. Yildirim, H. Camdeviren, R.D. Wood, M. Mitchell, T. Lindahl // Mutation Research, 2005. – Vol. 577. – P. 275-283.
5. Агеенко, А. И. Онкогены и канцерогенез - М.: Медицина, 1986. – С. 255.
6. Knudson, A. G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // ProcNatlAcadSci U S A, 1971. – V. 68. – P.820-823.
7. Ракитин, С. С. Генетический полиморфизм системы репарации ДНК у больных раком желудка с различными гистологическими типами опухоли / С.С. Ракитин, А.И. Дмитриева, В.В. Новицкий, И.А. Кузнецова, Н.В. Севостьянова // Фундаментальные исследования, 2011. – № 3. – С. 125.
8. Tamer, L. Human DNA repair genes / L. Tamer, N.A. Ates, C. Ates, B. Ercan, T. Elipek, H. Yildirim, H. Camdeviren, R. D. Wood, M. Mitchell, T. Lindahl // Mutation Research, 2005. – Vol. 577. – P. 275-283.
9. Scharer, O. D. Chemistry and biology of DNA repair // AngewandteChemie International Edition, 2003. – V. 42. – P. 2946-2974.

10. Salata, O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>.
11. Губин, С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства / С.П. Губин, Ю.А. Кокшаров, Г.Б. Хомутов, Г.Ю. Юрков // Успехи химии, 2005. – №74. – С. 539-574.
12. Pankhurst, Q. A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson // Journal of Physics D. Applied Physics, 2003. – V. 36. – P. 167-181.
13. Berry, C. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / C. Berry, A. Curtis // Journal of Physics D. Applied Physics, 2003. – V 1. – P. 36.
14. Першина, А. Г. Использование магнитных наночастиц в биомедицине / А.Г. Першина, А.Э. Сазонов, И.В. Мильто // Бюллетень сибирской медицины, 2008. – № 2. – С. 70-78.
15. Tomasovicova, N. Infrared study of biocompatible magnetic nanoparticles / N. Tomasovicova, M. Koneracka, P. Kopcansky // Measurement Science Review, 2006. – V. 6. – № 3. – P. 32-35.
16. He, X. X. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage / X.X. He, K. Wang, W. Tan // Journal of the American Chemical Society, 2003. – V. 125. – P. 7168-1769.
17. Туранская, С. П. Синтез, свойства и применение в экспериментальной медицине и биологии магниточувствительных нанокомпозитов, содержащих благородные металлы / С.П. Туранская, А.Д. Четыркин, И.В. Дубровин, В.В. Туров, П.П. Горбик // Поверхность, 2011. – Вып. 3(18). – С. 343-366.
18. Tefferi, A. Classification and of myeloproliferative neoplasms: Tye 2008 World Health Organization criteria and point-of care diagnostic algotryms / A. Tefferi, J.W. Vardiman // Leukemia, 2008. – Vol. 22. – P. 14-22.
19. Шевчук, Д. В. Частота встречаемости полиморфизма Arg399Gln в гене XRCC1 у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями //

Молодежь и наука: сборник материалов X Юбилейной Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию образования Красноярского края [Электронный ресурс]. – Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, 2014. – Режим доступа: <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2014/directions.html>.

20. Barbui, T. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet / T. Barbui , G. Barosi , G. Birgegard , F. Cervantes , G. Finazzi , M. Griesshammer // Journal of Clinical Oncology, 2011. – 29(6). – P. 761-770.
21. Tefferi, A. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos / A. Tefferi, J. Thiele, J.W. Vardiman // Cancer, 2009. – № 115(17). – P. 3842-3847.
22. Barosi, G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter // Best Practice & Research Clinical Haematology, 2014. – V. 27(2). – P. 129-140.
23. Vannucchi, A. M. Management of myelofibrosis. American Society of Hematology Education Program, 2011. – V. 2011(1). – P. 222-230.
24. Дунаева, Е. А. Количественное определение мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования / Е.А. Дунаева, К.О. Миронов, О.П. Дрибноходова, Т.Н. Субботина, Е.Е. Башмакова, И.А. Ольховский, Г.А. Шипулин // Клиническая лабораторная диагностика, 2014. – № 11. – С. 60-63.
25. Соколова, М. А. Современные представления о «классических» pH-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях // Клиническая онкогематология, 2010. – Том 3. – № 3. – С. 235-242.
26. Ольховский, И. А. Выявляемость пациентов с онкогенной соматической мутацией янускиназы-2 (V617F JAK2) в рамках программ диспансерного и профилактического осмотров / И.А. Ольховский, Г.Э. Карапетян, А.С.

- Горбенко, Т.Н. Субботина, М.А. Столляр, Т.Н. Дюпина, Е.В. Галко // Клиническая лабораторная диагностика, 2016. – № 61. – С. 275-278.
27. Нурмухаметова, Е. Гематология. Острые лейкозы: классификация, диагностика и лечение // Регулярные выпуски «РМЖ», 1997. – № 18. – С. 9.
28. Воропаева, Е. Н. Ассоциация полиморфизма Arg399Gln гена репарации ДНК XRCC1 с риском развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности / Е.Н. Воропаева, Т.И. Поспелова, М.И. Воевода // Гематология и трансфузиология, 2013. – №1. – С. 4-6.
29. Усенова, А. А. Полиморфизм генов XRCC1 и P53 у больных острым лейкозом // Вестник КРСУ, 2018. – Том 18. – № 2. – С. 157-160.
30. Сидорова, И. С. Гестоз. Учебное пособие. - М.: Медицина, 2007. – С. 340.
31. Айламазян, Э. К. Гестоз: теория и практика // Э. К. Айламазян, Е. В. Мозговая. - М.: А36 МЕДпресс информ, 2008. – С. 272.
32. Репина, М. А. Эклампсия. Ошибки акушерской тактики. - М.: Специальное издательство медицинских книг, 2014. – С. 245.
33. Gerhardt, A. The polymorphism of platelet membrane integrin alpha2beta1 (alpha2807TT) is associated with premature onset of fetal loss / A. Gerhardt, R. E. Scharf, B. Mikat-Drozdzynski // Thromb Haemost, 2005. – Vol. 93. – № 1. – P. 124-129.
34. Haram, K. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome / K. Haram, J. H. Mortensen, B. Nagy // Journal of Pregnancy, 2014. – Vol. 2014. – № 2014. – P. 13.
35. Шифман, Е. М. Активированный протеин С и преэклампсия / Е. М. Шифман, Е. Г. Гуменюк, А. А. Ившин // Российский медицинский журнал, 2006. – № 3. – С. 49-53.
36. Айламазян, Э. К. Акушерство: национальное руководство / Э. К. Айламазян, В. И. Кулаков, В. Е. Радзинский. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 76.
37. Репина, М. А. Преэклампсия и материнская смертность. - СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2005. – С. 208.

38. Савельева, Г. М. Акушерство: учебник для вузов / Г. М. Савельева, Р. И. Шалина, Л. Г. Сичинава. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 656.
39. Patil, S. B. Lipid peroxidation and antioxidant activity in complicated pregnancies / S.B. Patil, M.V. Kodliwadmath, M. Kodliwadmath // Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology, 2009. – Vol. 36. – № 2. – P. 110-112.
40. Siddiqui, I. A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia / I.A. Siddiqui, A. Jaleel, W. Tamimi, H.M. Al Kadri // Archives of Gynecology and Obstetrics, 2010. – Vol. 282. – P. 469-474.
41. Wang, Y. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia / Y. Wang, S.W. Walsh // Placenta, 1998. – Vol. 19. – P. 581-586.
42. Kaur, G. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia / G. Kaur, S. Mishra, A. Sehgal, R. Prasad // Molecular and Cellular Biochemistry, 2008. –Vol. 313. – P. 37-44.
43. Poranen, A. K. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies / A.K. Poranen, U. Ekblad, P. Uotila, M. Ahotupa // Placenta, 1996. – Vol. 17. – P. 401-405.
44. Brosens, J. J. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy / J.J. Brosens, M.G. Parker, A. McIndoe, R. Pijnenborg, I.A. Brosens // American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2009. – Vol. 200. – P. 615 e1-615 e6.
45. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser // The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2007. – Vol. 39. – P. 44-84.
46. Hazra, T. K. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective / T.K. Hazra, A. Das, S. Das, S. Choudhury, Y.W. Kow, R. Roy // DNA Repair, 2007. – Vol. 6. – P. 470-480.
47. Shen, M. R. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans / M.R. Shen, I.M. Jones, H. Mohrenweiser // Cancer Research, 1998. – Vol. 58. – P. 604-608.

48. Xi, T. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function / T. Xi, I.M. Jones, H.W. Mohrenweiser // Genomics, 2004. – Vol. 83. – P. 970–979.
49. Caldecott, K.W. XRCC1 and DNA strand break repair // DNA Repair, 2003. – Vol. 2. – P. 955-969.
50. Duell, E. J. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells / E.J. Duell, J.K. Wiencke, T. J. Cheng, A. Varkonyi, Z.F. Zuo, T.D. Ashok, E.J. Mark, J.C. Wain, D.C. Christiani, K.T. Kelsey // Carcinogenesis, 2000. – Vol. 21. – P. 965-971.
51. Relton, C. L. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and the frequency of somatic mutations at the glycophorin A locus in newborns / C.L. Relton, C.P. Daniel, A. Fisher, D.S. Chase, J. Burn, E.J. Tawn // Mutation Research, 2002. – Vol. 502. – P. 61-68.
52. Ходырева, С. Н. Как клетка ремонтирует ДНК / С.Н. Ходырева, О.И. Лаврик // Наука из первых рук, 2007. – Том 15. – №3. – С. 82.
53. Адсаламова, X. M. Гены репарации ДНК: частота генотипов полиморфных вариантов XRCC1 (rs25487, rs1799782) и XRCC4 (rs1805377, rs2075685) / X.M. Адсаламова, Р.А. Сулейманова // [Электронный ресурс]. – Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: сб. ст. по мат. LIX междунар. студ. науч.-практ. конф. № 12(58). – Режим доступа: [https://sibac.info/archive/nature/12\(58\).pdf](https://sibac.info/archive/nature/12(58).pdf).
54. Гервас, П. А. Генетический полиморфизм гена-онкосупрессора p53 и функционально связанных с ним генов CCR5 И XRCC1 при раке легкого: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.14., 14.00.16. / П. А. Гервас – Томск, 2007. – С. 28.
55. Ракитин, С. С. Полиморфизм генов репарации ДНК XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 339 и XPD 751 при раке желудка / С.С. Ракитин, А.И. Дмитриева, В.В. Новицкий, И.А. Кузнецова, В.А. Авхименко // Бюллетень сибирской медицины, 2011. – № 6 – С. 35-39.

56. Казначеев, К. С. Варианты полиморфных изменений генов p53, XRCC1 и XPD у детей с острым лимфобластным лейкозом / К.С. Казначеев, В.А. Белявская, В.В. Ляхович, Т.И. Поспелова // Бюллетень сибирской медицины, 2008. – Приложение 2. – С. 47-53.
57. Saiyed, Z. M. Extraction of Genomic DNA Using Magnetic Nanoparticles (Fe_3O_4) as a Solid-Phase Support / Z.M. Saiyed, C.N. Ramchand // American Journal of Infectious Diseases, 2007. – Vol. 3. – P. 225-229.
58. Saadat, I. Association between polymorphisms in DNA repair genes (XRCC1 and XRCC7) and risk of preeclampsia / I. Saadat, Z. Beyzaei, F. Aghaei, S. Kamrani, M. Saadat // Archives of Gynecology and Obstetrics, 2012. – Vol. 286. – № 6. – P. 1459-1462.
59. Vural, P. Genetic polymorphisms in DNA repair gene APE1, XRCC1 and XPD and the risk of pre-eclampsia / P. Vural, S. Değirmencioğlu, S. Doğru-Abbasoğlu, N.Y. Saral, C. Akgül, M. Uysal // European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology, 2009. – Vol. 146. – № 2. – P. 160-164.
60. Sandoval-Carrillo, A. Polymorphisms in DNA Repair Genes (APEX1, XPD, XRCC1 and XRCC3) and Risk of Preeclampsia in a Mexican Mestizo Population / A. Sandoval-Carrillo, E. M. Méndez-Hernández, F. Vazquez-Alaniz, M. Aguilar-Durán, A. Téllez-Valencia, M. Barraza-Salas // International Journal of Molecular Sciences, 2014. – Vol. 15. – № 3. – P. 4273-4283.
61. Wang, F. The association between XRCC1 Arg399Gln polymorphism and risk of leukemia in different populations: a meta-analysis of case-control studies / F. Wang, Q. Zhao // OncoTargets and Therapy, 2015. – Vol. 8. – P. 3277-3287.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

М.Н.Волова Т.Г. Волова
подпись инициалы, фамилия

« 5 » июля 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

код – наименование направления

Использование наноразмерных частиц при выделении нуклеиновых кислот с
тема
последующей детекцией полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 при гестозе
и онкогематологических заболеваниях

Руководитель

АП

подпись, дата

доцент, к.м.н.

должность, ученая степень

А. В. Барон

инициалы, фамилия

Выпускник

Егорова

подпись, дата

Е. К. Егорова

инициалы, фамилия

Красноярск 2019