

mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research*. 2016; 44: D1251. doi: 10.1093/nar/gkv1003

5. Clay M, Deng JJ, Bai Y, et al. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of genetics and genomics*. 2009; 3 (36):125. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60099-5

6. Ding J., Sidore C., Butler TJ, et al. Assessing Mitochondrial DNA Variation and Copy Number in Lymphocytes of ~2,000 Sardinians Using Tailored Sequencing Analysis Tools. *PLoS Genetics*. 2015; 7 (11): 1005306. doi: 10.1371/journal.pgen.1005306

7. Kazantseva A, Davydova Yu, Enikeeva R, et al. AVPR1A main effect and OXTR-by-environment interplay in individual differences in depression level. *Heliyon*. 2020;10 (6): e05240. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05240

8. Lee W, Johnson J, Gough DJ, et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. *Cell Death & Disease*. 2015; 2 (6): e1664–e1664. doi: 10.1038/cddis.2015.34

9. Liu X, Longchamps RJ, Wiggins KL, et al. Association of mitochondrial DNA copy number with cardiometabolic diseases. *Cell Genomics*. 2021; 1:100006. doi: 10.1016/j.xgen.2021.100006

10. Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. The

mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 52 (102):18769–18770. doi: 10.1073/pnas.0509776102

11. Picard M. Blood mitochondrial DNA copy number: What are we counting? *Mitochondrion*. 2021; 60:1–11. doi: 10.1016/j.mito.2021.06.010

12. Picard M, Juster RP, McEwen BS. Mitochondrial allostatic load puts the «gluc» back in glucocorticoids. *Nature reviews. Endocrinology*. 2014; 5 (10): 303–310. doi: 10.1038/nrendo.2014.22

13. Picard M, McEwen BS. Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. *Psychosomatic medicine*. 2018; 2 (80): 141. doi: 10.1097/PSY.0000000000000545

14. Ridout KK, Khan M, Ridout SJ. Adverse Childhood Experiences Run Deep: Toxic Early Life Stress, Telomeres, and Mitochondrial DNA Copy Number, the Biological Markers of Cumulative Stress. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2018; 9 (40): e1800077. doi: 10.1002/bies.201800077

15. Tyrka AR, Parade SH, Price LH, et al. Alterations of Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length with Early Adversity and Psychopathology. *Biological psychiatry*. 2016; 2 (79): 78. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.025

16. Wang L, Lv H, 1, Ji P, et al. Mitochondrial DNA copy number is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma in Chinese population. *Cancer Medicine*. 2018; 6 (7): 2776. doi: 10.1002/cam4.1452

17. Zhang L, Zhou R, Li X et al. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Medical hypotheses*. 2006; 6 (66): 1205–1208. doi: 10.1016/j.mehy.2005.11.041

18. Zhang R, Wang Y, Ye K et al. Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics*. 2017; 1 (18): 890. doi: 10.1186/s12864-017-4287-0

19. Zhao H, Chang D, Ye Y. Associations of blood mitochondrial DNA copy number with social-demographics and cancer risk: results from the Mano-A-Mano Mexican American Cohort. *Oncotarget*. 2018; № 39 (9): 25491. doi: 10.18632/oncotarget.25321

20. Ziada AS, Smith MSR, Côté HCF. Updating the Free Radical Theory of Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 908. doi: 10.3389/fcell.2020.575645

21. Mustafin RN, Khusnutdinova EK, Kazantseva AV et al. Epigenetics of aggressive behavior. *Russian Journal of Genetics*. 2019; 55 (9):1051–1060. doi: 10.1134/S0016675819090091

Е.В. Тапьев, А.Ю. Асанов, О.И. Симонова,
А.Л. Сухомясова, К.К. Павлова, И.Ю. Чебеляев

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МУТАЦИИ Z ГЕНА *PI* У ПАЦИЕНТОВ С ДЕФИЦИТОМ АЛЬФА-1 АНТИТРИПСИНА

DOI 10.25789/YMJ.2022.78.04

УДК 61:575

В статье предложен простой метод выявления одной из наиболее частых мутаций PiZ, ассоциированных с дефицитом альфа-1 анти-трипсина, с использованием технологии полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Приоритетное исключение мутации PiZ как наиболее значимой может позволить ускорить диагностику и сделать её более доступной для практического здравоохранения.

Ключевые слова: SERPINA1, дефицит альфа-1-антитрипсина, ПЦР реального времени.

The aim of this study is to develop a method for diagnosing PiZ mutation associated with alpha-1 antitrypsin deficiency using real-time PCR technology.

A simple method is proposed for detecting one of the most frequent mutations of the *Pi* gene PiZ associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. Priority exclusion of the PiZ mutation as the most significant one may provide rapid diagnosis and make it more accessible to practical healthcare.

Keywords: SERPINA1, alpha-1-antitrypsin deficiency, real-time PCR.

ТАПЬЕВ Евгений Викторович – врач-лаборант-генетик ГАУ РС(Я) «Республиканская больница №1-Национальный центр медицины» (РБ№1-НЦМ), genetika@inbox.ru; **АСАНОВ Алий Юрьевич** – д.м.н., проф. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; **СИМОНОВА Ольга Игоревна** – д.м.н., гл.н.с., врач-педиатр ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России; **СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична** – к.м.н., зав. Медико-генетическим центром РБ№1-НЦМ; **ПАВЛОВА Кюнна Константиновна** – к.м.н., врач лаборант-генетик РБ№1-НЦМ; **ЧЕБЕЛЯЕВ Игорь Юрьевич** – к.м.н., доцент Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

Введение. Целью данного исследования является разработка метода диагностики мутации PiZ, ассоциированной с дефицитом альфа-1 анти-трипсина (ААТ), с использованием технологии полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТД) является наследственным заболеванием, ассоциированным с рядом мутаций в гене протеазного ингибитора *Pi*. Ген, контролирующий структуру ААТ – SERPINA1, располагается на длинном плече хромосомы

14 (14q31-32.2), содержит 7 экзонов (четыре кодирующих (2-4 и 5) и три некодирующих (1a, 1b, 1c)), для которых известно более 200 [1] аллельных вариантов, наследующихся по ауто-сомно-кодминантному типу (OMIM 107400).

Обозначение аллелей гена *Pi* осуществляется буквами латинского алфавита от А до Z в зависимости от положения продукта в геле при изоэлектрическом фокусировании. Наиболее частыми вариантами аллелей являются аллели PiM, при которых

концентрация ААТ в сыворотке крови находится в пределах нормальных значений (90-200 мг/дл или 16,5-36,8 μmol/L согласно использованным нами методам). Аллели, ассоциированные с недостаточным уровнем белка, регистрируются значительно реже и в отдельных случаях характеризуются помимо дефицита снижением функциональной активности ААТ, как, например, аллель Z, являющийся наиболее значимым в клинической практике [2]. Известно, что 95% пациентов с ААТД имеют генотип PiZZ [3].

Дефицит альфа-1 антитрипсина является повсеместно распространённым, но по сей день редко диагностируемым заболеванием [4]. Диагноз часто задерживается на несколько лет и в популяции может присутствовать много недиагностированных индивидов с ААТД [5]. Поскольку PiZ является наиболее распространённым патологическим аллелем в большинстве популяций, в зависимости от спектра мутаций в конкретной популяции есть смысл начинать молекулярную диагностику именно с него. Предложенный нами метод генотипирования может помочь ускорить и сделать более доступной диагностику ААТД.

Одним из наиболее востребованных и распространённых методов молекулярной диагностики является ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR), имеющая ряд преимуществ перед классическим методом с детекцией продуктов ПЦР посредством гель-электрофореза и, в некоторых случаях, перед технологией Lumiplex, применяемой для мультиплексного генотипирования [6], таких как:

- снижение риска контаминации и, соответственно, получения недостоверных результатов; метод не требует работы непосредственно с продуктом ПЦР;

- ускорение постановки эксперимента в результате исключения гель-электрофореза, метода полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) и дополнительных этапов, связанных с использованием отдельных систем детекции;

- возможность полной автоматизации теста – от экстракции ДНК до интерпретации результата;

- более доступная реагентика и оборудование для проведения ПЦР в реальном времени. Борьба с продолжающейся в настоящее время пандемией коронавируса SARS-CoV-19 и применение RT-PCR как основного метода ранней диагностики способствовали значительному расширению

мирового парка оборудования для ПЦР в реальном времени. В практическом здравоохранении широко распространены лаборатории, работающие главным образом по данной технологии.

Мы предлагаем метод верификации мутации PiZ по технологии ПЦР реального времени. Приоритетное исключение мутации PiZ как наиболее значимой может позволить ускорить диагностику дефицита альфа-1 антитрипсина и сделать её более доступной для практического здравоохранения.

Материалы и методы исследования. В ходе выполнения экспериментальной части работы были отобраны образцы ДНК 503 пациентов детского возраста с характерными для ААТД поражениями лёгких и/или печени [7]. Из них 200 пациентов с поражением печени и 303 – с заболеваниями дыхательных путей, в последнюю группу кроме пациентов с характерными для ААТД хроническими неспецифическими заболеваниями лёгких были включены пациенты с бронхиальной астмой и муковисцидозом. Контрольную группу составил 81 практически здоровый ребенок. Экспериментальные выборки были набраны на базе ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (НЦЗД) г. Москва и ГАУ РС(Я) «Республиканская больница №1-Национальный центр медицины» г. Якутск.

У законных представителей всех пациентов и группы сравнения, включённых в исследование, было получено информированное согласие.

Образцы ДНК в выборке пациентов получали из венозной крови, а у детей контрольной группы ДНК – из средней порции утренней мочи. Выделение ДНК производили на спин-колонках с сорбентом на матрице из силикагеля Blood genomicPrep Mini Spin Kit («Cytiva Life Sciences», США) согласно протоколу производителя. В Якутске ДНК выделялась путём стандартной фенол-хлороформной экстракции. Качество экстракции ДНК проверялось методом спектрофотометрии в микрообъёме, использовался спектрофотометр Nanodrop («ThermoFisher Scientific», США) или BioSpec Nano («Shimadzu», Япония).

Для постановки ПЦР использовался ДНК-амплификатор в «реальном времени» CFX96 («Bio-Rad labs», США). ПЦР в реальном времени проводилась по технологии Taqman [8].

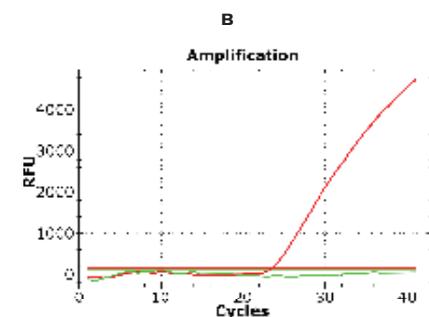
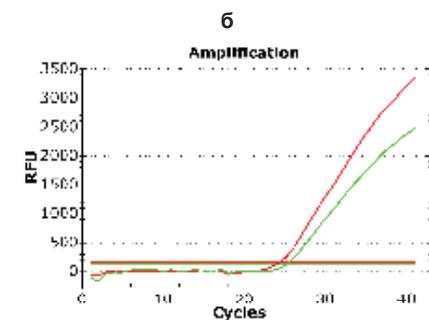
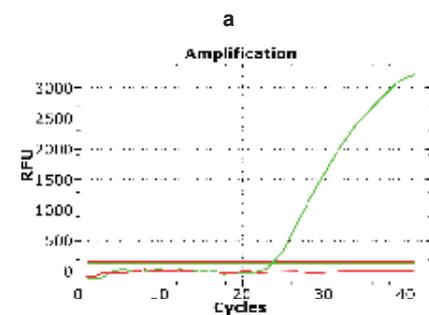
Использовались следующие праймеры и зонды:

Прямой
5'-GCTTCCTGGGAGGTGTCCACG-3'
Обратный
5' - T T C C C A T G A A G A G G G -
GAGACTTGG-3'
Зонды
Дикий тип
5' - FAM-CCAGCAGCTTCAGTC-
CCTTTCTCGTC-RTQ1-3'
Мутант
5' - R6G-CCAGCAGCTTCAGTC-
CCTTTCTTGTC-BHQ2-3'

Для разработки олигонуклеотидных последовательностей использовался онлайн инструмент Primer-BLAST («NCBI», США).

Протокол амплификации был следующим:

| | | | |
|---------------------------|-------|--------|-----------|
| Начальная денатурация | 95 °C | 15 мин | 40 циклов |
| Денатурация | 95 °C | 15 с | |
| Отжиг праймеров | 70 °C | 1 мин | |
| Регистрация флуоресценции | | | |



Кривые флуоресценции при ПЦР реального времени: а – нормальный аллель, б – гетерозигота по мутантному аллелю, в – гомозигота по мутантному аллелю

ПЦР проводилась в реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл буфера «С» (рН 8,8) для Taq полимеразы ThermoStar, 1,5 ммоль каждого dNTP, 10 пмоль каждого праймера, 0,25 пмоль каждого зонда, 1,5 ЕД Taq ThermoStar полимеразы («Силекс», Россия) и 0,3-1,0 мкг геномной ДНК в общем объеме 25 мкл. В качестве реакционных сосудов использовались полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» ёмкостью 200 мкл с оптической крышкой или стандартные 96-луночные микропланшеты ёмкостью 200 мкл, запечатанные оптически прозрачной плёнкой.

При нормальном аллеле регистрировалась флюоресценция только от зонда FAM (рисунок, а), при гомозиготе по мутантному аллелю - только от R6G (рисунок, в) и в случае гетерозиготного состояния регистрировались оба зонда (рисунок, б).

В каждой серии ПЦР применялись отрицательный и положительный контрольные образцы, подтверждённые секвенированием по Сэнгеру на базе ФГБНУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта», г. Москва. В качестве положительного контроля использовался первый образец, гомозиготный по аллелю PiZ, выявленный в данном исследовании.

Результаты и обсуждение. Всего было выявлено 7 пациентов, гетерозиготных по мутантному аллелю PiZ (генотип PiMZ), и 5 пациентов с гомозиготным генотипом PiZZ. Выявленные случаи мутации верифицировались с помощью ПЦР-ПДРФ.

Применение широкодоступного метода ПЦР в реальном времени с

приоритетным исключением частых мутаций может ускорить постановку диагноза [9].

Алгоритм лабораторной диагностики ААТД с применением ПЦР в реальном времени для исключения частых мутаций может выглядеть так:

1. Клиническое обоснование необходимости исключения ААТД.

2. Определение уровня ААТ в сыворотке. При выявлении пониженного или порогового уровня ААТ – переход к этапу 3.

3. Исключение частых для данной популяции мутаций, например PiZ, методом ПЦР в реальном времени. Выявление на данном этапе частой мутации даёт информацию, позволяющую завершить диагностический поиск. В случае исключения частых мутаций – переход к этапу 4.

4. Поиск редких мутаций путём секвенирования кодирующих экзонов гена *Pi*. Может быть произведен в учреждении более высокого уровня (например, научно-исследовательском институте).

Ввиду высокой вариабельности [10] уровня ААТ в сыворотке при различных мутациях и генотипах, воспалительных реакциях, молекулярно-генетическая диагностика рекомендуется не только при пониженном или пороговом уровне ААТ, но и пациентам, у которых наблюдается концентрация ААТ, попадающая в «серую зону».

Своевременное выявление мутаций, ассоциированных с дефицитом альфа-1 антитрипсина, является ключом к оптимальному ведению пациента, что существенно повышает каче-

ство жизни и ожидаемую её продолжительность.

Литература

1. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР), 2019. URL: https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf
2. Fundamentals of polymerase chain reaction (PCR), 2019. URL: https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf
3. Kimberly E. Foil. Variants of SERPINA1 and the increasing complexity of testing for alpha-1 antitrypsin deficiency // Therapeutic Advances in Chronic Disease. 2021, Vol. 12. P. 33–48
4. James K. Stoller, and Loufi S. Aboussouan. A Review of α 1-Antitrypsin Deficiency // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2011. Vol. 185, Issue 3.
5. Cristina M-G, Ignacio B, Isidro D, Patricia B, Marc M. Estimated Prevalence and Number of PiMZ Genotypes of Alpha-1 Antitrypsin in Seventy-Four Countries Worldwide // International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2021 Sep 17. Vol. 16, P. 2617–2630.
6. Kohnlein T, Janciauskiene S, Welte T. Diagnostic delay and clinical modifiers in alpha-1 antitrypsin deficiency // Ther Adv Respir Dis. 2010. Vol 4(5). P. 279–87.
7. Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: a continuing problem // Chest. 2005. Vol. 128(4). P. 1898–94.
8. Martina V, et al. Diagnosing Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Using A PCR/Luminescence-Based Technology // International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2019. Vol. 14. P. 2535–2542.
9. Ilaria F, Stefania O, Annalisa D-S Angelo GC. Update on α 1-antitrypsin Deficiency // Breathe. 2018. Vol. 14. P. 17–24.
10. Mark Q, Paul E, Anita P, Alice MT. Obstacles to Early Diagnosis and Treatment of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Perspectives // Therapeutics and Clinical Risk Management. Vol. 16. P. 1243–1255.
11. Timothy J. Craig, Maria Paula Henao. Advances in managing COPD related to α 1-antitrypsin deficiency: An under-recognized genetic disorder: // Allergy. 2018. Vol. 73. P. 2110-2121.

А.М. Еникеева, И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина, К.А. Пупыкина, Р.Г. Фархутдинов

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У САМОК КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВОДНОГО НАСТОЯ ТРАВЫ *PULMONARIA OBSCURA DUM.*

В статье представлены результаты исследования биоэлектрической активности неокортекса в условиях перорального введения водного настоя травы медуницы неясной (*Pulmonaria obscura Dum.*) самкам крыс линии WAG/Rij. Результаты исследования показали статистически значимое снижение мощностей тета- и бета-ритма высоких частот к концу первой недели эксперимента в передней области головного мозга, а также дельта- и тета-ритма в задней доле мозга. Так, изменения тета- и бета-ритма высокой частоты в лобной доле неокортекса самок крыс, возможно, связаны со снижением возбудимости, тревожности, страха. Данные нашей работы продемонстрировали стиму-

DOI 10.25789/YMJ.2022.78.05

УДК 616.31-08-039.71

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа: **ЕНИКЕЕВА Алия Маратовна** – магистрант 2 года обучения, enikeeva.aliya.98@gmail.com, **САДРТДИНОВА Индира Илдаровна** – к.б.н., доцент, indira.ildarovna@mail.ru, **ХИСМАТУЛЛИНА Зухра Рашидовна** – д.б.н., доцент, зав. кафедрой, hismatullinazr@mail.ru, **ПУПЫКИНА Кира Александровна** – д.фарм.н., проф., pupykinaka@gmail.com, **ФАРХУТДИНОВ Рашид Габдулхаевич** – д.б.н., проф., frg2@mail.ru.