

Рисунок 1 — Суточная выживаемость экспериментальных животных после БООСА в группах с низкой (НА) и высокой (ВА) поведенческой активностью

Заключение

Таким образом, при моделировании ОНМК методом БООСА самцы беспородных белых крыс, прожившие менее суток после операции, обладали более высокой исходной вертикальной двигательной активностью по сравнению с крысами с продолжительностью жизни 24 и более часов после оперативного вмешательства, $p = 0,016$.

Экспериментальные животные, прожившие менее 3 часов после БООСА, обладали более высокой исходной исследовательской активностью по сравнению с крысами с продолжительностью жизни от 3 до 24 часов после оперативного вмешательства, $p = 0,042$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Смертность в Республике Беларусь за 2010–2011 гг.: офиц. стат. сб. за 2010–2011 гг. — Минск: ГУ РНМБ, 2012. — 232 с.
2. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control / World Health Organization; editors: Sh. Mendis, P. Puska, B. Norrving. — Geneva: WHO, 2011. — 164 p.
3. Свойства альбумина сыворотки у больных с геморрагическим инсультом полушарной локализации / М. Ю. Мартынов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. — 2012. — Вып. 2, № 8. — С. 8–14.
4. Очерки ангионеврологии / под ред. З. А. Суслиной. — М.: Атмосфера, 2005. — 368 с.
5. Ганнушкина, И. В. О некоторых нерешенных вопросах патофизиологии нарушений мозгового кровообращения / И. В. Ганнушкина // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Инсульт. — 2007. — Вып. 19. — С. 3–11.
6. Судаков, К. В. Системные основы эмоционального стресса / К. В. Судаков, П. Е. Умрюхин. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 112 с.
7. Майоров, А. Ю. Оценка индивидуально-типологических особенностей поведения и устойчивости интактных белых крыс-

самцов на основе факторной модели нормального этологического спектра показателей в тесте «открытое поле» / А. Ю. Майоров // Клиническая информатика и телемедицина. — 2011. — Т. 7, Вып. 8. — С. 21–32.

8. Антипенко, Е. А. Индивидуальная стрессоустойчивость и прогноз заболевания при хронической ишемии головного мозга / Е. А. Антипенко, А. В. Густов // Медицинский альманах. — 2014. — № 3. — С. 36–38.

9. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. П. Хьюстон; под ред. А. С. Батуева. — М.: Высш. шк., 1991. — 399 с.

10. Pisula, W. Sequential analysis of rat behavior in the open field / W. Pisula // International journal of comparative psychology. — 1994. — Vol. 7, № 4. — P. 194–201.

11. Поведенческие реакции у экспериментальных животных с различной прогностической устойчивостью к стрессу в тесте «открытое поле» / А. А. Пермяков [и др.] // Вестник Удмурдского университета. — 2013. — Вып. 3. — С. 83–90.

12. Гусев, Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.

13. Haddad, G. G. Brain hypoxia and ischemia / G. G. Haddad, Sh. P. Yu. — New York: Humana Press, 2009. — 345 p.

14. Диагностика и дифференцированное лечение ишемического инсульта в бассейне каротидных артерий: инстр. по применению / Г. К. Недзведь [и др.]. — Минск: НИИ неврологии, нейрохирургии и физиотерапии МЗ РБ, 2005. — 32 с.

15. Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации: этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследования (Сеул, 2008) // Морфология. — 2010. — Т. 4, № 2. — С. 69–72.

16. Мельникова, Е. В. Нейропротекторный эффект мелоксикама при ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга в условиях артериальной гипертензии / Е. В. Мельникова, А. А. Шмонин, И. В. Чурилова // Журнал неврологии и психиатрии. — 2009. — № 6. — С. 50–53.

17. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера, 2002. — 312 с.

18. Stevens, J. P. Applied multivariate statistics for the social sciences / J. P. Stevens. — New York: Taylor&Francis Group, 2009. — 664 p.

Поступила 27.04.2015

УДК: 577.213/.217+612.111.1:616-053.9-074

ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Е. В. Воропаев, О. Ю. Баранов, А. А. Зятьков, О. В. Осипкина

Гомельский государственный медицинский университет

Цель: выявить генетические маркеры, выступающие в качестве предикторов различных возраст-ассоциированных изменений, для их ранней диагностики.

Материалы и методы. В исследование включены 35 пациентов с диагнозом «Хронический гастрит», обследованных в Республиканском научно-практическом центре радиационной медицины и экологии человека (г. Гомель). Проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР), электрофоретическое фракционирование ДНК.

Результаты. Сформирован набор праймеров для фрагментного анализа по 2 локусам, позволяющих проводить оценку содержания митохондриальной ДНК в клетках как маркера старения.

Заключение. Выявлена зависимость содержания митохондриальной ДНК (мтДНК) от календарного возраста: с увеличением хронологического возраста происходит уменьшение количества мтДНК.

Ключевые слова: фрагментный анализ ДНК, геронтология, диагностика.

APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF THE BIOLOGICAL AGE BY MEANS OF THE MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS

E. V. Voropayev, O. Yu. Baranov, A. A. Zyatkov, O. V. Osipkina

Gomel State Medical University

Objective: to reveal genetic markers acting as predictors of various age-associated changes for their early diagnosis.

Material and methods. The study included 35 patients diagnosed with chronic gastritis and examined in the Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology (Gomel). Polymerase chain reaction (PCR) and electrophoretic DNA fragment analysis were done.

Results. We formed a set of primers for the fragment analysis by 2 loci which made it possible to assess the content of mitochondrial DNA in cells as a marker for senescence.

Conclusion. We revealed the dependence of the content of mitochondrial DNA (mtDNA) on the calendar age: the increase of the chronological age leads to the decrease of the mtDNA content.

Key words: DNA fragment analysis, gerontology, diagnostics.

Введение

Онтогенез является комплексным процессом, и выявление генетических механизмов его формирования — фундаментальная проблема биологии развития, эволюционной генетики и молекулярной геронтологии. Задача биологии старения — выяснение механизмов старения организма, которые достаточно многообразны и подразумевают не только механический износ организма, но и определенные генетические особенности структуры и функционирования ДНК ядра и цитоплазматических оргanelл, в частности, митохондрий.

В настоящее время митохондриальная генетика — самостоятельное научное направление. Открытие ведущей роли митохондрий в чувствительности к лекарствам, старении, апоптозе и нейродегенеративных расстройствах привело к созданию митохондриальной медицины. В рамках этой науки изучаются болезни, связанные с нарушением функций митохондрий, основной задачей которых является образование молекул АТФ в процессе клеточного дыхания.

Генетическая система митохондрий характеризуется кодом, отличающимся от универсального, редактированием РНК после ее синтеза [1]. Особенности мтДНК животных являются: отсутствие некодирующих областей — интронов; некоторые отличия генетического кода по сравнению с ядерной ДНК (ядДНК); более простая организация и отсутствие связи с белками-гистонами; несовершенство системы репарации митохондриальной ДНК (мтДНК).

Два последних фактора лежат в основе того, что частота мутаций в мтДНК выше, чем в

ядДНК. В большинстве случаев вариабельность мтДНК обусловлена точечными заменами оснований: транзициями, трансверсиями, делециями, инсерциями.

Количество митохондрий в клетках сильно варьирует: от 1–2 тыс. в клетках печени до 200 тыс. в зрелых яйцеклетках [2]. Одна митохондрия обычно содержит несколько копий мтДНК, в среднем около пяти. Поэтому популяция молекул мтДНК в любой клетке и ткани является весьма значительной. Каждая молекула мтДНК реплицируется самостоятельно, и при делении клетки различные молекулы мтДНК вместе с митохондриями в случайном порядке переходят в цитоплазму дочерних клеток. Таким образом, в нормальных условиях все митохондрии в клетке содержат одинаковую копию мтДНК (гомоплазмия). Однако в митохондриальном геноме могут происходить мутации, и вследствие параллельного существования мутантной и нормальной мтДНК в различных соотношениях в клетке возникает гетероплазмия. Набор митохондрий в зиготе и, следовательно, во всех клетках организма имеет исключительно материнское происхождение: из цитоплазмы яйцеклетки, поэтому мтДНК всегда наследуется по материнской линии.

Митохондриальная нестабильность и высокий уровень мутагенеза мтДНК также связаны с протекающим в митохондриях окислительным фосфорилированием, в результате которого вырабатывается АТФ. В ходе окислительного фосфорилирования часть электронов образуют активные формы кислорода (АФК), такие как супероксиды, пероксиды, гидро-

кисильные радикалы, которые начинают взаимодействовать со всем, что попадает им на пути, вызывая окислительные повреждения органических соединений, что приводит к снижению продукции АТФ. Воздействие АФК на мтДНК вызывает накопление мутаций, снижение скорости окислительного фосфорилирования и еще большее накопление АФК. В итоге нарушается функционирование клетки и она погибает [2].

Именно окислительное повреждение митохондрий признается одним из основных факторов старения и сопровождающих его дегенеративных болезней: рака, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней иммунной системы, дисфункций ЦНС, катаракты и ряда других.

В настоящее время существуют 2 основные группы теорий старения: генетические и теории клеточного повреждения [3], и ни одна из них не может игнорировать роль митохондрий.

Исходя из генетической теории, старение — генетически запрограммированный процесс, который был выработан в результате эволюции. В основе лежит так называемый лимит Хейфлика — ограниченное число делений клеток организма.

Самое широкое распространение получила свободнорадикальная теория преждевременного старения, которая утверждает, что старение происходит из-за накопления повреждений в клетках, нанесенных свободными радикалами с течением времени [4]. Накопление большого количества таких повреждений в клетках приводит к нарушению их нормальной работы с последующими изменениями, соответствующими старению и приводящими к заболеваниям.

В 1950 г. Дэнхем Харман предложил митохондриальную теорию старения (МТС), а в 1972 г. ее модифицировал. Центральный постулат МТС гласит, что ведущей причиной старения является затухание клеточной биоэнергетики. Это затухание приписывается накоплению повреждений в мтДНК, АФК. Поскольку АФК генерируются респираторной цепью самих митохондрий, то образуется порочный цикл, ведущий к прогрессивному увеличению АФК, нарастанию количества поврежденных ими биополимеров и, как следствие, снижению биоэнергетики [5].

Согласно этой теории, начиная с рождения и в течение жизни человека, в его мтДНК накапливаются мутации. Вследствие этого митохондрии вырабатывают все меньше и меньше энергии, клетки потихоньку отмирают, а организм дряхлеет. Основным источником мутаций мтДНК являются АФК. Как полагают, уменьшение их количества в митохондриях снижает число вновь образующихся мутаций мтДНК и, таким образом, продлевает жизнь клетки, увеличивая тем самым продолжительность жизни [2].

Старение человека — универсальный и закономерный процесс, неизбежно затрагиваю-

щий в той или иной степени все уровни биологической организации и характеризующийся постепенностью, неравномерностью и неуклонным прогрессирующим [3].

Материалы и методы

В исследование включены 35 пациентов с диагнозом «Хронический гастрит», обследованных в РНПЦ РМ и ЭЧ (г. Гомель). С использованием информированного согласия отобран биологический материал (биоптаты желудка) для изучения возраст-ассоциированных изменений в организме. ДНК выделяли с использованием колоночного набора Genomic DNA from tissue («Macherey-Nagel», Германия).

Проведенный спектрофотометрический анализ полученных препаратов нуклеиновых кислот показал, что из навески 3–10 мг образца можно получить 2–5 мкг суммарной ДНК. Соотношение экстинкций A260/A280 находилось в диапазоне 1,85–1,97, что удовлетворяло требованиям, предъявляемым к методике.

Проведение ПЦР. Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл составляли следующим образом: 2×ПЦР-буфер DreamTaq PCR («Thermo Scientific», США) — 12,5 мкл, смесь праймеров НВГ + Мт (100 пкмоль/мкл р-р) — 0,26 мкл, ДНК-полимераза Pfu — 0,5 мкл, образец ДНК (20 нг/мкл) — 1 мкл. Конечный объем доводили водой до 25 мкл. При использовании Taq ДНК-полимеразы в качестве фермента для проведения амплификации электрофоретические спектры всех продуктов молекулярного клонирования характеризуются двумя и более пиками, что было связано с наличием «n + 1» форм ампликонов, образующихся при синтезе нуклеотидных цепей с помощью Taq-полимеразы, что является особенностью полимеразы данного типа: отсутствие корректирующей активности.

С целью элиминации артефактных ПЦР-фрагментов в смесь добавляли ДНК-полимеразу Pfu, тем самым повышая эффективность количественной оценки соотношения уровня амплификации локусов мтДНК и яДНК (рисунок 1).

Для проведения ПЦР более 1 образца готовили общий раствор (Master-mix), в который входили все компоненты смеси в количестве, соответствующем числу образцов, кроме образца ДНК. Образец вносили индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) Master-mix.

Программа амплификации была следующей: 1-й этап (1 цикл). Денатурация. t = 3 мин, T = 95 °C. 2-й этап (35 циклов). Денатурация. t = 15 с, T = 95 °C. Отжиг t = 20 с, T = 60 °C. Элонгация t = 20 с, T = 72 °C. Структура праймеров для выявления ядерной (НВГ) и митохондриальной (МТ-TL1) ДНК приведена в таблице 1.

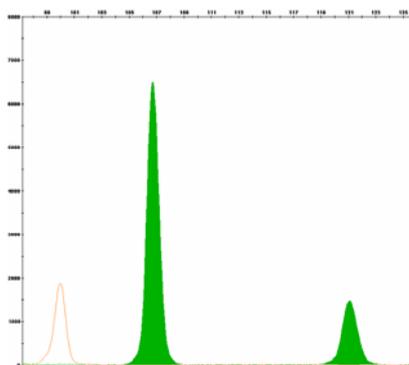


Рисунок 1 — Ампликоны образца, синтезированные с добавлением Pfu ДНК-полимеразы

Таблица 1 — Структура праймеров

Название локуса	Название праймера	Нуклеотидная последовательность
MT-TL1	MtF3212	(R6G*)CACCCAAGAACAGGGTTTGT
	MtR3319	TGGCCATGGGTATGTTGTTA
HBG	hbgF	(R6G*)GCTTCTGACACAACACTGTGTTCAC TAGC
	hbgR	CACCAACTTCATCCACGTTACC

*R6G — Rhodamine 6G — флуороновый краситель

Электрофоретический анализ. Предварительное электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции проводили в агарозном геле (2,0 %) при стандартных условиях.

В зависимости от интенсивности окрашивания (рисунок 2) меченые ампликоны растворяли в бидистиллированной воде (в соотношениях 1:10; 1:30; 1:60; 1:90; 1:120; 1:300), а затем из полученного раствора брали 1 мкл смеси и растворяли в 18,7 мкл формамида с 0,3 мкл маркера молекулярного веса GS500Liz

(«Applied Biosystems», США). Для анализа более 1 образца готовили общий раствор, в который входили все компоненты смеси в количестве, соответствующем числу образцов. Образец вносили индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) раствор, и денатурировали на водяной бане (T = 95 °C) в течение 5 мин. Затем образцы резко охлаждали и хранили при -20 °C для последующего электрофоретического фракционирования.

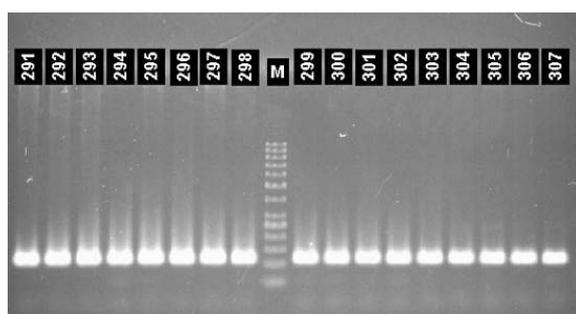


Рисунок 2 — Электрофореграмма ампликонов, меченых красителем R6G

Электрофоретический анализ и детекцию меченых продуктов проводили в генетическом анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Объем внесенного образца составил 20 мкл. Для исследования был использован 4 % денатурирующий гель POP-4TM. В ходе анализа был выбран модуль анализа GS POP4 (1 ml) G5 для 47 см (50 мкм) капилляра. Анализ полученных результатов проводился с по-

мощью программного пакета «GeneMapper», 4.0 («Applied Biosystems», США). Корреляционный анализ полученных данных проводился с использованием программного пакета «Statistica», 6.0.

Результаты и их обсуждение

В ходе анализа качественных и количественных характеристик ампликонов локусов MT-TL1 (Mt) и HBG (ядНК) рассчитывали отношения уровней флуоресценции проб данных локусов. Следует отметить, что каждый амплифицированный

локус был представлен одним пиком (рисунок 1), что позволяет проводить достоверную диагностику как кинетических характеристик ампликонов, так и уровня мутаций, приводящих к мононуклеотидным делециям в изучаемых локусах.

С целью графического отображения отношения количественной характеристики ампликонов локусов МТ-ТL1 (Mt) и НВG (яднк) к календарному возрасту пациентов построена точечная диаграмма (рисунок 3). Как видно на

графике, массив данных имеет обратную закономерность: с увеличением календарного возраста происходит уменьшение мтДНК, что соответствует литературным данным о повреждении мтДНК с возрастом [2].

Значительное отклонение ряда образцов от всего массива может быть связано с индивидуальными особенностями пациентов или особенностями препаратов ДНК и, в частности, с пролиферативной активностью ткани.

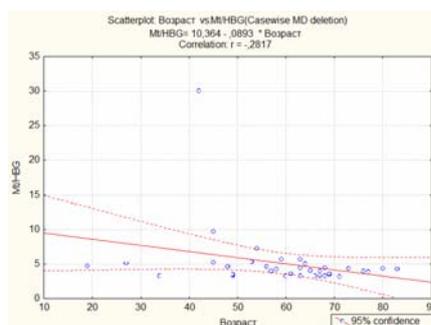


Рисунок 3 — Анализ соотношения количества мтДНК и яднк в зависимости от календарного возраста

Заключение

Таким образом, для определения биологического возраста возможно использование количественной оценки содержания мтДНК в клетках.

Выводы

1. Сформирован набор праймеров для фрагментного анализа по 2 локусам: МТ-ТL1 и НВG, позволяющих проводить оценку содержания мтДНК в клетках как маркера старения.

2. Оптимизированы и унифицированы методические подходы в количественной оценке локусов мтДНК в образцах тканей с различным биологическим возрастом.

3. Выявлена определенная тенденция (-0,28) изменения содержания мтДНК в зависимости

от календарного возраста: с его увеличением происходит уменьшение количества мтДНК.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Игамбердиев, А. У.* // Сорос. образоват. журн. № 1. — 2000. — С. 32–36.
2. *Мазунин, И. О.* Митохондрии: жизнь в клетке и ее последствия / И. О. Мазунин, Н. В. Володько // Природа № 10. — 2010. — С. 3–14.
3. *Кишкун, А. А.* Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции / А. А. Кишкун. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 976 с.
4. *Murphy, M. P.* How mitochondria produce reactive oxygen species / M. P. Murphy // Biochem. J. — 2009. — Vol. 417 (1). — P. 1–13.
5. *Трубицын, А. Г.* Модифицированный вариант митохондриальной теории старения / А. Г. Трубицын // Успехи геронтологии. — 2006. — Вып. 18. — С. 21–28.

Поступила 07.05.2015

ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 616.831-005.1-036.11-036.22 (476.2)

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ Г. ГОМЕЛЯ И ГОМЕЛЬСКОГО РАЙОНА

О. А. Иванцов

Гомельский областной клинический госпиталь ИОВ

Проведен анализ эпидемиологических особенностей когорты пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения, проживающих в г. Гомеле и Гомельском районе. Показано абсолютное преобладание пациентов с инфарктом мозга. Выявлен значимый перевес мужчин в нозологических подгруппах инфаркта мозга и внутримозгового кровоизлияния, установлены возрастные особенности пиков заболеваемости и гендерных различий пациентов с инсультом.

Ключевые слова: инсульт, эпидемиология, заболеваемость, смертность.