

дают более высокой адсорбционной способностью по отношению к токсичным тяжелым металлам. Например, его адсорбционная емкость по ртути в 5 раз больше, чем у микроцеллюлозы, в 4 раза больше, чем у полифепана и в 2,5 раза — чем у энтеросгеля.

3. Использование белого угля позволяет свести к минимуму потери организмом полезных компонентов. Так, его адсорбционная емкость по магнию в 3 раза меньше, чем у микроцеллюлозы, в 1,5 раза — чем у полифепана и в 1,2 раза — чем у энтеросгеля. Белый уголь поглощает кальций в 14 раз меньше, чем микроцеллюлоза, в 25 — чем полифепан и 18 раз — чем энтеросгель. Адсорбция витамина С белым углем в 6–10 раз меньше, чем энтеросорбентами более ранних поколений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Энтеросорбция / под ред. Н. А. Белякова. — Л., 1991. — 336 с.
2. Мурзина, Э. А. Обоснование применения энтеросорбентов в комплексной терапии хронических аллергодерматозов / Э. А. Мурзина // Мистецтво лікування. — 2013. — № 2–3. — С. 50–53.
3. Бондарев, Е. В. Применение энтеросорбентов в медицинской практике / Е. В. Бондарев, С. Ю. Штрыголь, С. Б. Дырявый // Провизор. — 2008. — № 13. — С. 45–49.
4. Беляков, Н. А. Энтеросорбция — механизм лечебного действия / Н. А. Беляков, А. В. Соломенников // Эфферентная терапия. — 1997. — Т. 3, № 2. — С. 15–19.
5. Основы аналитической химии: учебник: в 2-х кн. Кн. 2. Методы химического анализа / под ред. Ю. А. Золотова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 2000. — С. 494.
6. Евстратова, К. И. Физическая и коллоидная химия: учеб. для фарм. вузов и факультетов / К. И. Евстратова, Н. А. Купина, Е. Е. Малахова; под ред. К. И. Евстратовой. — М.: Высш. шк., 1990. — 487 с.
7. Теоретические основы адсорбционной терапии атеросклероза / А. В. Лысенкова [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. ГомГМУ. — 2010. — № 1 (23). — С. 101–104.

Поступила 06.10.2015

УДК 575.113:611.018.1

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ СЕНЕСЦЕНЦИИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ГЕНОВ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Е. В. Воропаев¹, А. А. Зятков¹, О. В. Осипкина¹, О. Ю. Баранов¹,
Н. В. Галиновская¹, В. Н. Доценко²

¹Гомельский государственный медицинский университет

²Гомельская городская клиническая больница скорой медицинской помощи

Цель: апробировать метод молекулярно-генетической диагностики процессов клеточной сенесценции на основе количественного анализа генов ядерной (яДНК) и митохондриальной ДНК (мтДНК).

Материалы и методы. Выборка пациентов составила 81 человек, материал для исследований — цельная кровь. Количественный анализ мтДНК проведен с применением метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) по протоколу TaqMan. Оценка значимости различий средних величин отношения мтДНК/яДНК возрастных групп проведена методом однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты. Различия средних величин отношения мтДНК/яДНК возрастных групп статистически значимо на уровне $p < 0,05$, сила влияния фактора возраста составляет 46 %.

Заключение. Апробированный метод, основанный на расчете отношения числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1) с применением стандартов, может быть использован для количественного анализа мтДНК как генетического маркера возраст-ассоциированных изменений.

Ключевые слова: отношение тДНК/яДНК, возраст-ассоциированные заболевания, группы риска.

THE METHOD OF MOLECULAR AND GENETIC DIAGNOSIS OF THE PROCESS OF CELL SENESCENCE BASED ON QUANTITATIVE ANALYSIS OF NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL DNA GENES

E. V. Voropayev¹, A. A. Ziatskov¹, O. V. Osipkina¹, O. Y. Baranov¹,
N. V. Galinovskaya¹, V. N. Dotsenko²

¹Gomel State Medical University

²Gomel City Clinical Emergency Hospital

Objective: to test the method of molecular and genetic diagnosis of cellular senescence based on quantitative analysis of nuclear genes (nDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA).

Material and methods. The sample of patients was 81, the material for the study — whole blood. The quantitative analysis of mtDNA was carried out using the method of polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) protocol TaqMan. The differences of average values of the relation of mtDNA/nDNA age groups were assessed by one-way ANOVA.

Results. The difference between the average value of the ratio of mtDNA / nDNA age groups is statistically significant at $p < 0.05$, the strength of the influence of the age factor is 46 %.

Conclusion. The proven method based on the calculation of the ratio of mtDNA copy number loci (mtND1) to nuclear DNA (RPPH1) with the application of the standards can be used for the quantitative analysis of mtDNA as a genetic marker of age-related changes.

Key words: the ratio of mtDNA/nuclear DNA, age-associated disease risk.

Введение

Выявление генетических механизмов и показателей (маркеров) сенесценции (старения) клеток и тканей, которые оказывают влияние на продолжительность жизни организма в целом, является основной задачей эволюционной генетики и молекулярной геронтологии. Длина теломер хромосом различных клеток организма является одним из маркеров, позволяющих оценивать общее состояние здоровья пациента [1]. Однако механизмы сенесценции организма достаточно многообразны и подразумевают не только генетические особенности структуры и функционирования ядерной ДНК (ядНК), но и ДНК-содержащих цитоплазматических органелл, в частности, митохондрий. Митохондрии — клеточные органеллы, которые присутствуют во всех эукариотических организмах, основной задачей которых является образование молекул АТФ (энергия используется в клетке для поддержания ее жизнедеятельности и обеспечения специальных клеточных функций) в биохимических циклах клеточного дыхания. Основными происходящими в митохондриях процессами являются цикл трикарбоновых кислот, окисление жирных кислот, карнитиновый цикл, транспорт электронов в дыхательной цепи и окислительное фосфорилирование. Митохондрии также выполняют важную роль во внутриклеточной сигнализации, апоптозе, промежуточном метаболизме, а также в метаболизме аминокислот, липидов, холестерина, стероидов и нуклеотидов [2]. Количество митохондрий в клетках различных тканей сильно варьирует. Средний размер митохондриальной ДНК (мтДНК) человека составляет 16569 пар оснований, кодирующие последовательности представлены 2 генами рибосомальной РНК, 22 генами транспортной РНК, 13 генами, детерминирующими ферменты, участвующие в процессах дыхания, репликации мтДНК, транскрипции и трансляции [3]. Генетическая система митохондрий характеризуется кодом, отличающимся от универсального [4]. Особенности мтДНК животных и человека являются: отсутствие интронов; связи с белками-гистонами, несовершенство системы репарации мтДНК;

более простая организация и, как следствие, восприимчивость к повреждению [5]. Данные факторы лежат в основе того, что частота мутаций в мтДНК выше, чем в яДНК. Причастность митохондрий к дегенеративным болезням выявлена в 1988 г. [5]. Дегградация мтДНК обуславливает снижение основных функций митохондрий, уменьшение их количества, что, в свою очередь, приводит к сенесценции клетки в целом [6]. Таким образом, дегградация и уменьшение количества мтДНК может служить в качестве биомаркеров различных возраст-ассоциированных заболеваний.

Цель работы

Апробировать метод молекулярно-генетической диагностики процессов клеточной сенесценции на основе количественного анализа генов яДНК и мтДНК.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница скорой медицинской помощи» и У «Гомельский областной клинический госпиталь инвалидов Отечественной войны». Испытания проводились на базе научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет». Выборка пациентов составила 81 человек, средний возраст $49,2 \pm 19,6$ года, они были разделены на 3 возрастные группы (по 27 человек в каждой): 21–40 лет, 41–60 лет и 61–80 лет.

В качестве материала для выделения ДНК с целью определения количества мтДНК использована цельная кровь пациентов. Для выделения ДНК предпочтительно применять готовые коммерческие наборы. Для количественного анализа мтДНК во всех образцах проведено выявление фрагмента гена мтДНКND1 (NADH-дегидрогеназа) и фрагмента гена яДНК RPPH1 (Ribonuclease P RNA Component H1). Применен метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) по протоколу TaqMan. Праймеры изготовлены компанией «Праймтех» (Беларусь), структура праймеров и зондов, используемых для анализа, представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Структура праймеров и зондов, используемых для определения количества яДНК и мтДНК

Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
Mt-ND1 (мтДНК)	mtND 1-F	CCCTAAAACCCGCCACATCT	69
	mtND 1-R1	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT	
	mtNDprobe1	HEX-ATCACCCCTCTACATCACCGCCCCG-BHQ1	
RPPH1-1 (ядНК)	RPPH1-F	AGCTGAGTGCGTCTGTCACT	108
	RPPH1-NEW	GAACCTCACCTCCCCGAAGCT	
	RPPH1probe	HEX-CCGCCTCTGGCCCTAGTCTCAGACC-BHQ1	

Программа амплификации исследуемых участков генов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) была следующей: 95 °С — 10 мин (1 цикл); 95 °С — 15 с, 60 °С — 20 с (40 циклов).

Для детекции продуктов амплификации можно использовать метод электрофореза в агарозном геле (рисунок 1а) или анализ кривых плавления (meltingcurves), основанный на нагревании смеси после окончания ПЦР и непрерывном измерении флуоресценции, которая будет меняться с достижением температуры плавления продукта амплификации (рисунок 1б).

Для качественного контроля ПЦР-РВ в ходе каждой реакции использованы дополнительные образцы: «отрицательный» (дистиллированная вода) и «положительный» (проба,

содержащая ДНК, для которой в ходе предварительного изучения была получена достоверная амплификация). Качество препаратов ДНК проверяли путем количественного анализа разведений. Для этого готовили 4 варианта разведений: 1:0 (1x); 1:1 (2x); 1:3 (4x); 1:7 (8x). В случае низкого качества препарата ДНК (в частности, наличия ингибиторов ПЦР) отмечают изменение угла наклона экспоненциальной части кривой вариантов или выявление несоответствия разницы порогового цикла амплификации (Ct) между первыми и последними вариантами разведений. Некачественные или контаминированные образцы ДНК и реагенты подлежат элиминации из дальнейшей работы.

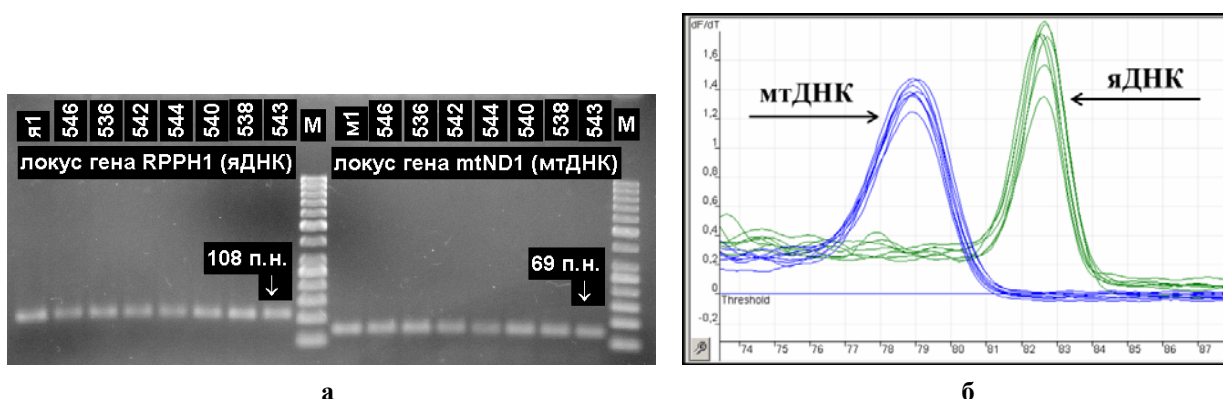
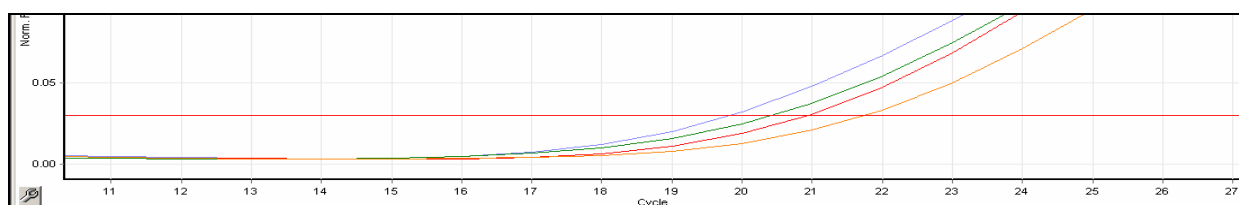


Рисунок 1 – Методы детекции продуктов ампликации: а — электрофорез в агарозном геле; б — анализ кривых плавления

Для количественного расчета мтДНК и яДНК использовали стандарты с известным числом копий молекул ДНК: очищенные ампликоны исследуемых участков генов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1). После очистки с помощью фотометра определяли концентрацию (нг/мкл) и производили расчет числа копий молекул в полученных препаратах. Расчет выполнен с помощью программ конверсии концентрации в число молекул, широко представленных в свободном доступе на электронных ресурсах.

В начале анализа определяли значения показателя эффективности протекания ПЦР на экспоненциальной фазе для каждого выявляемого локуса. Для этого предварительно выбирали образец ДНК со значением Ct, равным 15–30 циклам, так как проводить сравнение графиков (определять Ct, эффективность реакции) лучше всего на экспоненциальном участке, затем готовили следующие варианты разведения: 1:0; 1:1 (2x); 1:3 (4x); 1:7 (8x) (рисунок 2).



Номер	Цвет	Образец	Название гена	Ct	Концентрация	Разведение
1	Синий	559	RPPH1	19.86	100 нг/мкл	1:0
2	Зеленый	559	RPPH1	20.45	50 нг/мкл	1:1
3	Красный	559	RPPH1	20.96	25 нг/мкл	1:3
4	Оранжевый	559	RPPH1	21.79	12.5 нг/мкл	1:7

Рисунок 2 — Результаты ПЦР-РВ анализа титров образца 559 по гену RPPH1

Для вычисления эффективности реакции используют формулу:

$$E = (R_2/R_1)^{1/(C_2-C_1)}, \quad (1)$$

где R — степень разведения образца

Ct — цикл уровня пороговой флюоресценции (наиболее часто значение уровня пороговой флюоресценции находится в пределах 0,05–0,1 единиц флюоресценции).

При этом разница Ct между разведениями должна быть примерно одинаковой, в ином случае расчет эффективности амплификации для данного локуса будет недостоверным.

В случае эффективной амплификации коэффициент E должен стремиться к 2. Более низкое значение показателя эффективности амплификации (< 1,7) указывает на необходимость оптимизации ПЦР-реакции: изменение программы амплификации, выбор праймеров другого типа, подбор соотношения реагентов ПЦР-смеси. Значение E, превышающее 2, говорит о наличии артефактов и высоком уровне погрешности при проведении измерений. Исходя из методологических особенностей (весовых и гистологических различий) исследуемых образцов, эффективности выделения ДНК из разных проб и др., препараты образцов могут различаться по количественному содержанию ДНК. Для определения количества копий ДНК исследуемых локусов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) в каждом образце использовали следующий алгоритм:

- при проведении ПЦР-РВ для выявления локусов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) в каждую постановку помимо образцов необходимо включать соответствующий стандарт;

- с помощью стандарта определяют значение Ct для каждого образца;
- рассчитывают число копий локусов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) по формуле:

$$N_{\text{образец}} = N_{\text{стандарт}} / (1+E)^{(Ct_{\text{образец}} - Ct_{\text{стандарт}})}, \quad (2)$$

где N_{образец} — число копий локусов мтДНК (mtND1) или яДНК (RPPH1)

N_{стандарт} — число копий локусов стандартов мтДНК (mtND1) или яДНК (RPPH1);

- рассчитывают отношение числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1).

Полученный показатель (отношение числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1)) использовали в качестве генетического маркера возраст-ассоциированных патологий.

Результаты и обсуждение

На формирование величины отношения мтДНК/яДНК в той или иной мере оказывает влияние ряд факторов. В качестве нулевой гипотезы выдвинуто предположение, что такой фактор, как возраст пациента не вносит существенный вклад в формирование величины данного отношения. Для проверки выдвинутой гипотезы проведено сравнительное исследование величины отношения мтДНК/яДНК у пациентов, имеющих существенные различия по возрасту. При статистической обработке использован программный пакет «Statistica», 6.0. Для выполнения анализа проведена группировка данных по возрастным категориям и методом описательной статистики, рассчитаны средние величины и стандартные отклонения отношения мтДНК/яДНК по каждой возрастной группе пациентов (таблица 2).

Таблица 2 — Результаты описательной статистики исследуемых возрастных групп пациентов

Фактор возраст, лет	Средняя величина (СО)	Коэфф. вариации, %	Доверительный интервал, 95 %	
			нижняя граница	верхняя граница
21–40	241,70 (89,92)	37	206,13	277,27
41–60	133,42 (69,86)	52	105,78	161,06
61–80	96,13 (29,49)	31	84,46	107,79

Результаты описательной статистики исследуемых возрастных групп пациентов позволяют констатировать расхождение средних величин отношения мтДНК/яДНК (таблица 2). Наибольшая средняя величина отношения мтДНК/яДНК — 241,70 ± 89,92 (95 % ДИ 206,13–277,27) характерна для возрастной группы 21–40 лет. Средние величины отношения мтДНК/яДНК возрастных групп пациентов 41–60 и 61–80 лет составляют: 133,42 ± 69,86 (95 % ДИ 105,78–161,06) и 96,13 ± 29,49 (95 % ДИ 84,46–107,79) соответственно. Оценка значимости различий средних величин от-

ношения мтДНК/яДНК возрастных групп проведена методом однофакторного дисперсионного анализа. С помощью F-критерия (33,47) при уровне значимости p < 0,05 отвергнута нулевая гипотеза о том, что фактор возраста пациента не вносит существенный вклад в формирование величины отношения мтДНК/яДНК. Установлена сила влияния фактора возраста — 46 %.

Полученные результаты различий между средними значениями отношения мтДНК/яДНК конкретных возрастных групп пациентов представлены на рисунке 3.

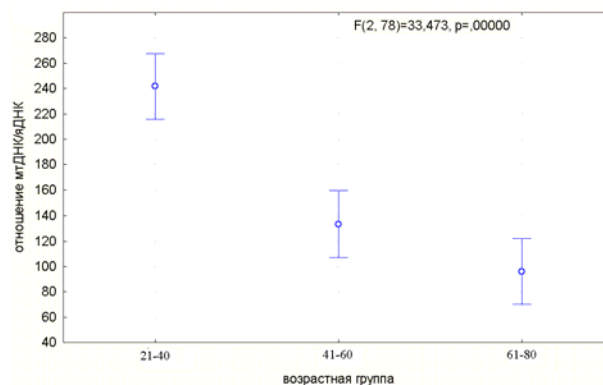


Рисунок 3 — Графическое представление различий между средними значениями отношения мтДНК/ядДНК в возрастных группах пациентов

Выводы

Апробированный метод, основанный на расчете отношения числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1) с применением стандартов, может быть использован для количественного анализа мтДНК как генетического маркера возраст-ассоциированных изменений.

Различия средних величин отношения мтДНК/ядДНК в возрастных группах статистически значимо на уровне $p < 0,05$, сила влияния фактора возраста составляет 46 %. Референтный диапазон величин отношения мтДНК/ядДНК в возрастной группе 21–40 лет составляет 206,13–277,27; в возрастной группе 41–60 лет — 105,78–161,06 и в возрастной группе 61–80 лет — 84,46–107,79. Отношение мтДНК/ядДНК может быть использовано как дополнительный критерий с целью определения групп риска по возраст-ассоциированным заболеваниям. Если значение отношения мтДНК/ядДНК, рассчитанное для пациента, ниже референтного значения

в соответствующей возрастной группе, то необходимо медицинское наблюдение и оценка при подозрении на заболевание или патологическое состояние (код МКБ-10 — Z03) в соответствии с профилем возраст-ассоциированного заболевания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кишкун, А. А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции / А. А. Кишкун. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 976 с.
2. Wei, Y. H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging / Y. H. Wei // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1998. — № 217 (1). — P. 53–63.
3. Sherratt, H. S. Mitochondria: structure and function / H. S. Sherratt // Rev. Neurol. — 1991. — Vol. 147. — P. 417–430.
4. Игамбердиев, А. У. Уникальная генетическая система митохондрий / А. У. Игамбердиев // Сорос. образоват. журн. — 2000. — № 1. — С. 32–36.
5. Сухоруков, В. С. Митохондриальная патология и проблемы патогенеза психических нарушений / В. С. Сухоруков // Журнал неврологии и психиатрии. — 2008. — № 6. — С. 83–90.
6. Wolf, A. Study of the Change in Mitochondrial DNA from Various Tissues of Mice of Varying Ages / A. Wolf, A. Karlsson // Research Academy for Young Scientists. — 2013. — № 1. — P. 1–15.

Поступила 20.11.2015

УДК 612.461.25:577.127.4

РОЛЬ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СИСТЕМЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

С. Л. Зыблев¹, З. А. Дундаров¹, А. И. Грицук¹, С. В. Зыблева²

¹Гомельский государственный медицинский университет

²Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

Цель: изучить роль мочевой кислоты в системе антиоксидантной защиты организма в эксперименте.

Материал и методы. Моделирована острая гипоксия путем забора 60–65 % объема циркулирующей крови (ОЦК). Оценивались гематологические показатели и антиоксидантная активность (АОА) сыворотки крови.

Результаты. У животных опытной группы выявлен рост уровня мочевой кислоты, лактата, снижение рН, падение уровня бикарбонатов крови и рост дефицита оснований. Сыворотка крови этих животных обладала выраженной прооксидантной активностью (ПОА), что свидетельствует об усилении свободно-радикальных процессов. Выявлена сильная отрицательная взаимосвязь концентрации мочевой кислоты и ПОА сыворотки крови у животных опытной группы: $r_s = -0,89$ ($p < 0,05$).

Заключение. В условиях острой гипоксии истощается система антиоксидантной защиты организма с развитием окислительного стресса. Полученные данные указывают на участие мочевой кислоты в системе антиоксидантной защиты организма.

Ключевые слова: гипоксия, мочевая кислота, окислительный стресс.