

УДК 576.38:577.215.3:616.36-004

ОСОБЕННОСТИ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ микроРНК В ТКАНИ

Кущин М.К. (2 курс, лечебный факультет), Ладик Н.О. (2 курс, лечебный факультет), Абаимова М.О. (ассистент кафедры нормальной физиологии), Лебедева Е.И. (к.б.н., доцент), Бабенко А.С. (к.х.н., доцент), Гласкович А.А. (к.в.н., доцент)

*Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

Аннотация. Целью исследования явилась отработка процедуры забора образцов и метода выделения микроРНК из ткани для последующего их изучения с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

В результате исследования был выявлен ряд особенностей, которые могут усложнить работу по выделению микроРНК и повлиять на результаты исследования. В частности, особое внимание необходимо уделять следующим этапам: забор образцов, отбор пробы, процесс гомогенизации и очистки. При планировании проведения исследований, направленных на изучение микроРНК в ткани первоначально необходимо провести оптимизацию пробоподготовки. Следует учитывать физические и химические свойства биологического материала.

Ключевые слова: крысы-самцы Вистар, печень, микроРНК, пробоподготовка.

Введение. МикроРНК (microRNA, miRNA) представляют собой класс малых некодирующих молекул длиной около 22 нуклеотидов [3]. Они вовлечены в регуляцию биосинтеза белка на посттранскрипционном уровне, путем комплементарного взаимодействия с мРНК. Глубокое понимание того, как микроРНК регулируют уровень экспрессии генов, приведет к появлению новых маркеров и терапевтических мишеней [4].

Для анализа микроРНК преимущественно используют методы секвенирование и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [1]. Выполнение данного типа исследований требует строго соблюдения методических указаний так как ошибки могут возникать на любом из этапов и привести к не корректным результатам. К сожалению, в изученной нами литературе вопросам пробоподготовки авторы уделяют весьма мало внимания.

Целью исследования: явилась отработка процедуры забора образцов и метода выделения микроРНК из ткани для последующего их изучения с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала использовали печень 24 крыс-самцов Вистар со средней массой 200 г. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному

обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный медицинский университет» (протокол №13 от 31.03.2022 г.). Крысы случайным образом были разделены на 2 группы (n=12 в каждой). Животным первой группы 2 раза в неделю вводили интрагастрально через зонд раствор тиацетамида в дозе 200 мг/кг массы тела в течение 3 нед. Крысы второй группы (контрольная) получали воду без тиацетамида в аналогичном объеме.

Результаты исследования: Забор образцов проводили непосредственно после декапитации крыс. Скальпелем из большой левой доли печени животного забирали фрагмент нативной ткани диаметром не более 5 мм. После забора образцы быстро помещали в криопробирки (GenFollower, Cry Tube 5,0 мл) и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения микроРНК.

Гомогенизацию фрагментов печени проводили с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания ткани. Перед процедурой выделения ступки охлаждали при температуре -20°C в течение суток. В охлажденную ступку с жидким азотом (ЖА) вносили образец и с помощью пестика его дробили на небольшие кусочки. Для гомогенизации оставляли объем равный 30 мг. Затем фрагмент печени перетирали до состояния пудры, испаряли жидкую фракцию азота и помещали в свободные от РНКаз полипропиленовые пробирки (2,0 мл) с крышками. Дальнейшие действия проводились в соответствии с протоколом производителя [2].

В процессе работы на некоторых этапах мы столкнулись со следующими особенностями пробоподготовки.

1. Забор образцов. Время препарирования одного животного не должно превышать 2 мин. Пробирки с фрагментами ткани до помещения их в сосуд Дьюара с ЖА и последующей транспортировки необходимо хранить на льду.

2. Отбор пробы для исследования. По рекомендации производителя для выделения микроРНК необходимо брать 30 мг материала. Мы взвесили один образец и ориентировались на его объем. Взвешивание приводит к оттаиванию ткани, что недопустимо.

3. Процесс гомогенизации. Патологически измененные образцы печени тяжело подвергались растиранию, фиброзная соединительная ткань и патологические сосуды при заморозке в ЖА становились слишком прочными для ручного измельчения. При этом по рекомендации производителя следует не допускать разморозки ткани [2]. Это требует постоянного добавления ЖА и посторонней помощи.

4. Осветление раствора и очистка микроРНК от белков, ДНК и крупных РНК. На данном этапе мы столкнулись с проблемой непрохождения материала через фильтры производителя за заявленное время и количество оборотов центрифуги. Во время осветления раствора причина затруднительного прохождения вполне понятна – это недостаточное измельчение исходной ткани ввиду сложности ее перетирания из-за развития фиброзной ткани и

патологического ангиогенеза. При дальнейшей изоляции микроРНК от других частиц причина недостаточного прохождения имеет более сложный характер. Для отделения нуклеиновых кислот производитель предлагает гуанидина тиоционат [3], который разрушает гидратную оболочку белков, вызывая их денатурацию, а также улучшает аффинное взаимодействие нуклеиновых кислот с силикатной мембраной [3]. Данный реагент очень удобен для выделения РНК, однако его использование сопряжено с высокой концентрацией денатурированного осадка белка в растворе, что затрудняет его прохождение через силикатную мембрану. Поэтому для тканей, богатых растворимыми белками, как например печень, использование данного реагента сопряжено со сложностями фильтрации.

Решение каждой из проблем, описанных выше, вариативно и в зависимости от материального оснащения лаборатории каждый исследователь может оптимизировать процесс самостоятельно, однако изложение данных трудностей поможет в будущем учесть их до начала эксперимента и максимально подготовить для него материальную базу.

Заключение. Таким образом, при планировании проведения исследований, направленных на изучение микроРНК в ткани первоначально необходимо провести оптимизацию пробоподготовки. Следует учитывать физические и химические свойства биологического материала.

Список литературы:

1. Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТПЦР). Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 722-728. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728> Korobkina E.A.1,5, Knyazeva M.S.1,5, Kil Yu.V.3, Titov S.E.4,6, Malek A.V.1,2

2. User manual «isolation of small and large RNA» / MACHEREY-NAGEL; 2019. - 35 с.

3. National library of medicine [electronic resource]: Improve sample preparation process for miRNA isolation from the culture cells by using silica fiber membrane, 2020. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7713297/> – Date of access: 22.09.2023

4. National library of medicine [electronic resource]: Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis^ not all kits are created equal, 2018. - Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857145/> Date of access: 22.09.2023

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**«СТУДЕНЧЕСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ НАУКА
XXI ВЕКА»**

*XXIII Международная научно-практическая конференция
студентов и молодых ученых*

26-27 октября 2023 г.

Витебск, 2023