

УДК 611.013.85:577.175.14-07

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПАРАФИНИЗИРОВАННЫХ ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ ПЛАЦЕНТЫ

Полуян О. С., Костюк С. А.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Беременные женщины являются группой высокого риска в связи с сердечно-сосудистыми, легочными, гормональными и иммунологическими изменениями в период гестации. Инфекция, вызванная SARS-CoV-2, увеличивает вероятность таких осложнений и неблагоприятных исходов беременности, как выкидыш, мертворождение, преждевременные роды, гестационный диабет, преэклампсия, задержка роста плода, пороки развития у новорожденных. Метаанализ показал, что у беременных женщин значительно повышен риск тяжелого течения COVID-19, характеризующегося цитокиновым штормом. В настоящей статье представлен протокол разработки и клинической апробации молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α в парафинизированных образцах тканей плаценты, который в дальнейшем будет использован для проведения исследований непосредственно на образцах плаценты пациентов с COVID-19 с целью оценки их диагностической значимости для прогнозирования развития осложнений беременности и родов.

Ключевые слова: плацента, провоспалительные цитокины, ПЦР, уровень нормализованной экспрессии, COVID-19.

Введение. Образцы плаценты могут использоваться как для изучения этапов нормального развития плаценты, выяснения процессов метаболизма и межтканевого обмена, так и для оценки влияния внешней среды и патологии матери на развитие плода. Доказано, что экспрессия различных генов изменяется (уменьшается или увеличивается) в зависимости от действия большого количества факторов [1]. Так, например, увеличение длительности периода родов сопровождается повышением в плацентарной ткани концентрации маркеров оксидативного стресса, в том числе перекисного окисления липидов, а также экспрессии антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы), что приводит к увеличению концентрации шоковых белков и активации сигнальных путей NF- κ B и p38 [2]. Показано, что под действием гипоксии значительно изменяется экспрессия различных генов, в большинстве случаев она снижается [3].

Таким образом, если для рутинного гистологического исследования пригоден материал плаценты, хранившийся в течение 48 ч при температуре 4 °C, то для молекулярно-генетических

исследований необходимо максимально быстро произвести процесс фиксации образцов тканей с последующей парафинизацией. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что при инфицировании COVID-19 у беременных женщин возникает синдром системного воспалительного ответа, который, в свою очередь, приводит к активации процессов воспаления и изменению иммунного ответа. Цитокины, представляющие собой семейство низкомолекулярных белков, секретируемых различными типами клеток, обладают плеiotропными функциями и образуют четко регулируемую сеть, играя главенствующую роль в функционировании иммунной системы. Цитокины, разделенные на различные группы, такие как интерлейкины (IL), интерфероны (IFN), колониестимулирующие факторы (CSF), факторы некроза опухоли (TNF), факторы роста опухоли (TGF) и хемокины, участвуют в дифференцировке, пролиферации, миграции и обеспечении эффекторных функций иммунных клеток. Взаимодействуя друг с другом, они играют решающую роль в регуляции иммунного ответа [4].

В настоящее время фактически отсутствуют фундаментальные научные данные о патогенетических механизмах формирования плацентарных нарушений у беременных, перенесших COVID-19 в различные триместры гестации. Получение новых данных позволит своевременно прогнозировать течение и исходы беременности и родов у SARS-CoV-2-инфицированных женщин и выбирать оптимальную тактику ведения беременных для предотвращения неблагоприятных материнских, перинатальных и неонатальных исходов, связанных с COVID-19.

Цель работы – разработка и клиническая апробация молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α в парафинизированных образцах тканей плаценты.

Материалы и методы. Для проведения молекулярно-генетических исследований в качестве биологического материала использовали парафинизированные образцы тканей плаценты.

Выделение РНК из парафинизированных образцов тканей плаценты проводилось с использованием набора реагентов ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, США).

Для выделения РНК из парафинизированных образцов первоначально проводили подготовку срезов. С помощью стерильного лезвия удаляли излишки парафина с блока ткани и выполняли срезы толщиной 5–50 мкм из парафинизированных блоков с помощью микротомы. При необходимости выделения РНК из срезов тканей, нанесенных на предметные стекла, использовали стерильные лезвия, чтобы соскоблить срезы с предметного стекла. Подготовленные таким образом срезы помещали в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, при этом для анализа образца ткани от 1 пациента за 1 реакцию обрабатывали эквивалент срезов ткани размером не более 100 мкм.

Затем проводили подготовку разведений основных реагентов. Следующим этапом осуществляли депарафинизацию образцов с использованием минерального масла. Для этого в пробирку, содержащие срезы парафинизированных блоков, добавляли по 300 (для срезов размером ≤ 50 микрон) или 500 мкл (для срезов размером > 50 микрон) минерального масла, инкубировали при 80 °С в течение 1 мин и перемешивали на вортексе. Затем проводили лизис образцов путем добавления лизирующего буфера. Смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 15 с при комнатной температуре. После окончания центрифугирования в пробирке образовывались две фазы: нижняя синяя (водная) фаза и верхняя (масляная)

фаза. В нижнюю водную фазу добавляли протеиназу К и перемешивали пипетированием. Смесь инкубировали последовательно сначала при 56 °С в течение 15 мин, затем при 80 °С в течение 1 ч, после чего пробирки незамедлительно помещали на лед на 1 мин для охлаждения, а затем оставляли на 2 мин при комнатной температуре. В случае необходимости, подготовленные таким образом образцы можно хранить в течение 12 ч (в течение ночи) при температуре 2–8 °С (в условиях холодильника).

На следующем этапе проводили обработку образцов ДНКазой. Фермент ДНКазы является чувствительным к физической активации, поэтому все работы с ним следует проводить только путем осторожного пипетирования и только при хранении на льду во время использования. Фермент ДНКазу вносили непосредственно в нижнюю водную фазу образца, перемешивали путем осторожного пипетирования и инкубировали 15 мин при комнатной температуре.

Для связывания нуклеиновых кислот к образцу добавляли соответствующий буфер, изопропанол, перемешивали содержимое путем кратковременного вортексирования, а затем центрифугировали при 10 000 g в течение 15 с при комнатной температуре. После окончания центрифугирования в пробирке образовывались две фазы: нижняя синяя (водная) фаза и верхняя (масляная) фаза. Нижнюю водную фазу переносили в специальную колонку и центрифугировали при 10 000 g в течение 30 с при комнатной температуре. Удаляли содержимое пробирки и проводили отмывку колонки. Для промывки колонки и элюции содержимого в колонку добавляли промывочный раствор, содержащий этанол, центрифугировали при 10 000 g в течение 30 с при комнатной температуре. Процедуры отмывки проводили дважды.

Затем колонку центрифугировали при 16 000 g в течение 3 мин с при комнатной температуре для высушивания колонки (данный этап необходимо проводить с обязательным тщательным высушиванием колонки для предотвращения переноса этанола в элюат).

Затем помещали колонку в чистую пробирку, добавляли деионизированную воду и центрифугировали при 16 000 g в течение 1 мин при комнатной температуре. Выделенную таким образом РНК использовали для определения концентрации и степени очистки, а затем сразу же замораживали для последующего хранения при температуре –80 °С.

Для определения концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты

проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda = 230$ нм. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230. Полученный раствор после оценки качества РНК подвергали обратной транскрипции. Полученную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки ПЦР в режиме реального времени с участием специально подобранных пар праймеров для каждого гена, включая housekeeping ген, с использованием программного обеспечения VectorNTI. Расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) таргетных генов провоспалительных цитокинов осуществляли по формуле (1):

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(Ct \text{ интересующего гена} - Ct \text{ гена } \beta\text{-actin})} \times 100\%, \quad (1)$$

где Ct — пороговый цикл [5].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS версия 16.0 (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормальность проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)).

Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$ [6].

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования с использованием

программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse) для определения УНЭ генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α .

С помощью демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 и встроенного приложения AlignX выбранные последовательности ДНК «выравнивали» для выбора наиболее консервативных участков. Далее проводили «выравнивание» последовательностей ДНК исследуемого гена.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для каждого выбранного гомологичного участка с использованием бесплатного программного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold.

Параметры праймеров: оптимальный размер ПЦР продукта около 50-80 пар оснований (п.о.) длиной 15–25 оснований (гуанин (G), цитозин (C), аденин (A), тимин (T)). Дизайн олигонуклеотидов начали с последовательности IL_1 для гена IL-1 β . Для данной последовательности были выбраны специфические праймеры (таблица 1). Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона. Анализ наличия вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием встроенного алгоритма Vector NTI – Oligo Duplexes. Условия проведения анализа: +60 оС (таблица 2).

Таблица 1 – Последовательности выбранных специфических олигонуклеотидных праймеров для амплификации уникальных участков гена IL-1 β с использованием ПЦР в режиме реального времени

Ген	Олигонуклеотид	Последовательность	Длина, п.о.
IL_1_1	IL_1_1_F	GAGGCTGACAGACCCCAAAGAT	23
	IL_1_1_R	GCACGAGGCATTTTGTGTGTTCA	23
IL_1_2	IL_1_2_F	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	21
	IL_1_2_R	GTCGGAGATTCTAGCTGGAT	21

Таблица 2 – Результаты анализа термодинамических характеристик вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров варианта IL_1_1

Олигонуклеотид	Стабильные /Всего	ΔG , kcal/mol
Вероятные гомодимеры		
IL_1_1_F / IL_1_1_F	0/0	–
IL_1_1_R / IL_1_1_R	0/2	–
Вероятные гетеродимеры		
IL_1_1_F / IL_1_1_R	0/2	–

Примечание: ΔG – свободная энергия Гиббса.

Результат анализа показал, что в условиях проведения ПЦР в режиме реального времени вероятность образования стабильных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров отсутствует. Согласно алгоритмам mfold, во время протекания ПЦР в режиме реального времени все вероятные вторичные шпильчатые структуры будут нестабильны.

Анализ вероятности образования вторичных шпильчатых структур для ампликона, ограничиваемого альтернативным набором олигонуклеотидных праймеров IL_1_2, также показал наличие схожих конструкций. Дальнейший анализ предполагаемого ампликона с

использованием встроенного алгоритма Vector NTI показал наличие 26 (против 23 в случае IL_1_1) вероятных вторичных шпильчатых структур, однако в модельных условиях все они характеризовались низкой стабильностью и, как следствие, низкой вероятностью образования. Анализ вероятности образования стабильных гомо- и гетеродимеров ампликонов показал отсутствие стабильных структур.

Анализ наличия вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров (алгоритм Vector NTI) показал наличие большего числа гомодимеров обратного праймера, а также гетеродимеров (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты анализа термодинамических характеристик вероятных гомо- и гетеродимеров альтернативного набора олигонуклеотидных праймеров IL_1_2

Олигонуклеотид	Стабильные /Всего	ΔG , kcal/mol
Вероятные гомодимеры		
IL_1_2_F / IL_1_2_F	0/0	–
IL_1_2_R / IL_1_2_R	0/3	–
Вероятные гетеродимеры		
IL_1_2_F / IL_1_2_R	0/4	–

Результат анализа показал, что в условиях проведения ПЦР в режиме реального времени вероятность образования стабильных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров отсутствует. В отличие от набора IL_1_2 в случае IL_1_1 присутствует меньшее количество гомо- и

гетеродимеров, что позволяет выбрать набор IL_1_2 для последующей работы. Аналогичным образом были подобраны олигонуклеотидные праймеры для амплификации специфических участков генов провоспалительных цитокинов IL-6, IL-15, TNF- α (таблица 4).

Таблица 4 – Выбранные для экспериментальной работы последовательности олигонуклеотидных праймеров специфических участков исследуемых генов

Название олигонуклеотида	Количество, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
IL1 β -F	1	GAGGCTGACAGACCCCAAAAGAT
IL1 β -R	1	GCACGAGGCATTTTGTGTGTCA
IL-6-F	1	ATGCAATAACCACCCCT
IL-6-R	1	AGTGTCTTAACGCTCATAC
IL-15-F	1	CCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTT
IL-15-R	1	CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA
TNF α -F	1	GTGACAAGCCTGTAGCCCA
TNF α -R	1	ACTCGGCAAAGTCGAGATAG

Затем нами была проведена оценка специфичности выбранного набора олигонуклеотидных праймеров с использованием онлайн-приложения NCBI/Blast, в результате которой установлена 100% гомология геному человека и отсутствие гомологии с другими организмами.

Выбор референсного гена из числа housekeeping генов человека, таких как GAPDH, HGUS, β -актин, HPRT1 проводили исходя из

рассчитанных значений коэффициента вариации (CV) по формуле (2) [7]:

$$CV = \left| 1 - \frac{\text{рассчитанная концентрация ДНК}}{\text{известная концентрация ДНК}} \right| \times 100 \% \quad (2)$$

В связи с тем, что рассчитанные значения коэффициентов вариации для генов GAPDH, HGUS, β -актин, HPRT1 находились на уровне

12,5, 11,8, 13,1 12,7 % соответственно, достоверных различий для housekeeping генов человека выявлено не было, на данном этапе все исследуемые гены были включены в дальнейшую работу.

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля ПЦР в режиме реального времени использовали последовательности ДНК генов GAPDH, HGUS, β -actin и HPRT1 генома человека (таблица 5).

Таблица 5 – Выбранные для экспериментальной работы последовательности олигонуклеотидных праймеров специфических участков исследуемых генов

Название олигонуклеотида	Количество, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
GAPDH-F	1	ATCATCCCTGCCTCTACTGG
GAPDH-R	1	CCCTCCGACGCCTGCTTCAC
HGUS-F	1	CTCATTTGGAATTTTGCCGATT
HGUS-R	1	CCGAGTGAAGATCCCCCTTTTAA
β -actin-F	1	CGTACCACTGGCATCGTGAT
β -actin-R	1	GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG
HPRT1-F	1	CCTTGGTCAAGCAGTATAATC
HPRT1-R	1	GGGCATATCCTACAACAAC

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров был осуществлен анализ последовательностей предполагаемых ампликонов. В результате анализа с использованием алгоритма mfold установлено, что во время протекания ПЦР, а именно на стадии отжига/элонгации при +60 °С все вероятные вторичные шпильчатые структуры будут нестабильны. Анализ с использованием алгоритма Vector NTI показал наличие от 11 до 23 вероятных вторичных шпильчатых структур. Стабильных структур выявлено не было.

Результаты анализа олигонуклеотидных праймеров показали практически полное отсутствие негативных эффектов за счет гомо- и гетеродимеров. Анализ вероятности совместного протекания специфических мультиплексных реакций с наборами олигонуклеотидов таргетных генов и всех вариантов внутренних контролей показал отсутствие стабильных гетеродимеров в условиях протекания этапа отжига/элонгации ПЦР.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров при определении экспрессии генов провоспалительных цитокинов

IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , проводили моноплексную ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию для каждого гена проводили в 10 случайных образцах, пробы ставили в дублях.

Для проведения обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом использовали набор реагентов «Премикс ArtMix-RT ревертаза» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Состав реакционной смеси: 5 мкл реагента ArtMix-RT (5-кратная смесь), 0,5 мкл forward-праймера (в концентрации 50 мкМ), 0,5 мкл reverse-праймера (в концентрации 50 мкМ), 5 мкл выделенной РНК-матрицы, 14 мкл воды, обработанной диэтилпиروкарбонатом (DEPC); конечный объем — 25 мкл.

Температурный профиль амплификации: 52 °С – 45 мин; 95 °С – 2 мин; 95 °С – 10 с, 60 °С – 60 с (40 циклов); плавление 60–95 °С с использованием термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР в режиме реального времени (таблица 6), для всех исследуемых генов находились в пределах от 18,77 (для гена IL-1 β) до 31,17 (для гена IL-15).

Таблица 6 – Значения пороговых циклов для генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , полученные при выполнении моноплексной ПЦР

№ образца		Значения пороговых циклов (Ct) для генов			
		IL-1 β	IL-6	IL-15	TNF- α
1	1.1	18,77	20,29	21,18	22,41
	1.2	19,02	20,56	20,84	22,13

Окончание табл. 6

2	2.1	24,87	26,63	20,59	22,85
	2.2	25,11	26,48	20,33	23,09
3	3.1	24,49	26,54	27,20	22,54
	3.2	24,82	26,38	26,86	22,28
4	4.1	20,43	19,38	26,52	29,87
	4.2	20,18	19,77	26,76	30,16
5	5.1	24,62	28,11	19,61	20,24
	5.2	25,00	28,38	19,49	20,37
6	6.1	23,67	26,43	26,51	27,34
	6.2	24,05	26,87	27,03	27,69
7	7.1	25,92	26,60	28,74	27,29
	7.2	26,28	26,43	29,05	27,53
8	8.1	28,15	26,81	29,55	27,83
	8.2	28,29	27,16	29,94	28,14
9	9.1	23,48	22,65	20,65	19,42
	9.2	23,81	22,94	20,83	19,68
10	10.1	28,72	29,44	30,87	29,95
	10.2	29,06	29,83	31,17	30,24

Для оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов. На электрофореграмме присутствовали четкие полосы на уровне детекции специфических фрагментов ДНК во всех анализируемых образцах.

После проведения электрофореза из геля извлекли фрагменты ДНК с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия) для проведения секвенирования с целью анализа нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК для оценки аналитической специфичности разработанной методики.

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) [7].

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями анализируемых генов в поисковой онлайн-системе BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или

иной последовательности к определенному гену. Все анализируемые образцы имели 100% гомологию с зарегистрированными в базе данных последовательностями, что свидетельствовало о 100% специфичности разработанной методики.

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны два образца (№ 1, 4) для проведения оценки эффективности (Е) ПЦР для генов IL-1 β и IL-6, а также два образца (№ 5, 9) для генов IL-15 и TNF- α , так как значения пороговых циклов амплификации для указанных генов в данных образцах были самыми низкими.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов кДНК с целью построения стандартной кривой. Концентрацию кДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК для изучаемых генов.

Корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК в образце составила от 0,995 до 0,999. Полученные значения эффективности ПЦР (таблица 7) находились в пределах от 1,58 (для гена IL-15) до 1,75 (для гена TNF- α).

Таблица 7 – Значения пороговых циклов, эффективности ПЦР (E) и корреляции (R²) для генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α

Ген	№ образца	Значения пороговых циклов (Ct)						E	R ²
		100		10		1			
		100.1	100.2	10.1	10.2	1.1	1.1		
IL-1β	1	18,77	19,02	22,91	23,15	27,08	27,52	1,65	0,997
	4	20,43	20,18	24,62	24,47	28,86	28,73	1,66	0,997
IL-6	1	20,29	20,56	24,36	24,49	28,52	28,74	1,68	0,997
	4	19,38	19,77	23,55	23,81	27,74	27,93	1,70	0,998
IL-15	5	19,61	19,49	23,97	23,69	28,21	27,85	1,58	0,995
	9	20,65	20,83	24,82	25,13	29,00	29,37	1,61	0,996
TNF-α	5	20,24	20,37	24,83	24,95	29,08	29,27	1,71	0,998
	9	19,42	19,68	23,46	23,84	27,73	27,97	1,75	0,999

Количественное определение housekeeping генов проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию таргетных генов, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций.

В ходе оценки эффективности протекания реакции амплификации генов GAPDH, HGUS, β -actin и HPRT1 было установлено, что при использовании подобранных пар праймеров, состава амплификационной смеси и условий термоциклирования (аналогично таковым, использовавшимся для амплификации таргетных генов) рассчитанные значения эффективности протекания реакции составили 1,48 (для гена GAPDH), 1,69 (для гена HGUS), 1,72 (для гена β -actin) и 1,54 (для гена HPRT1). На основании данного параметра для изучения уровней нормализованной экспрессии генов провоспалительных цитокинов в качестве референсного нами был выбран ген β -actin. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена β -actin и исследуемых таргетных генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации таргетного и референсного гена (последовательно для каждой пары генов) в одной пробирке. В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР в режиме реального времени в одной пробирке одновременно амплифицировали один из исследуемых генов (IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α) и референсный ген β -actin. В пробирки для амплификации вносили: 5 мкл реагента ArtMix-RT (5-кратная смесь), 0,2 мкл таргетного forward-праймера (в концентрации 50 мкМ), 0,2 мкл таргетного reverse-праймера (в концентрации 50 мкМ), 0,2 мкл forward-праймера гена β -actin (в концентрации 50 мкМ), 0,2 мкл reverse-праймера гена β -actin (в концентрации 50 мкМ), 5 мкл выделенной РНК-

матрицы, 14,2 мкл воды, обработанной диэтилпи-рокарбонатом (DEPC); конечный объем – 25 мкл.

Для выбора оптимального режима амплификации для каждого из исследуемых генов при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (таблица 8) с учетом оптимальной температуры отжига праймеров и одновременной амплификации двух генов в одной пробирке.

Амплификацию проводили с использованием термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Наилучший результат амплификации для генов IL-1 β , IL-6, IL-15 и β -actin был достигнут при использовании режима 2, TNF- α и β -actin — режима 1. Значения пороговых циклов для таргетных генов находились в пределах от 21,29 до 33,18, для референсного гена β -actin — от 17,87 до 28,45.

Для апробации разработанного метода расчет УНЭ таргетных генов (таблица 9) осуществляли по формуле (2).

Таблица 8 – Программы амплификации для генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α

Режим №	Программа амплификации
1	Ревертирование: 52 °C — 30 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 15 с; плавление 60–95 °C
2	Ревертирование: 52 °C — 30 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 30 с; плавление 60–95 °C
3	Ревертирование: 52 °C — 30 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 60 с; плавление 60–95 °C
4	Ревертирование: 52 °C — 45 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 60 с; плавление 60–95 °C

Таблица 9 – Значения пороговых циклов и УНЭ для таргетных генов

Ген	Значения пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1		1		1		1		1	
IL-1β	23,19	25,77	27,02	23,84	27,89	25,145	26,38	28,33	25,69	23,87
β -actin	19,76	21,18	25,79	25,02	23,73	27,79	20,84	25,47	20,29	25,88
% УНЭ	9,28	4,15	42,63	226,58	5,59	623,33	2,15	13,77	2,37	402,78
IL-6	28,65	22,98	28,72	31,14	24,20	29,84	20,98	22,96	25,28	23,85
β -actin	21,74	19,38	21,03	20,54	18,15	27,76	23,78	18,87	21,01	26,42
% УНЭ	0,83	8,25	0,49	0,06	1,51	23,75	692,77	5,88	5,17	591,17
IL-15	25,22	27,52	21,85	33,18	25,00	25,95	29,74	29,56	24,40	31,23
β -actin	27,36	21,05	20,44	28,45	20,42	23,65	27,31	21,51	25,57	20,51
% УНЭ	440,38	1,13	37,69	3,77	4,17	20,31	18,60	0,38	223,75	0,06
TNF-α	32,23	31,83	23,09	25,17	31,17	23,56	30,01	21,20	23,76	28,91
β -actin	21,96	26,56	21,82	19,58	20,74	23,97	26,81	21,48	24,50	17,87
% УНЭ	0,08	2,58	41,47	2,08	0,07	132,76	10,87	121,06	166,48	0,05

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, позволил сделать вывод, что разработанный метод можно использовать для одновременной амплификации одного из таргетных генов (IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α) и референсного гена β -actin. Полученные с использованием

разработанного метода данные можно использовать для расчета процента УНЭ генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α . Рассчитанные значения процента УНЭ генов находились в пределах от 0,05 до 692,77 %.

Заключение. Подобранные нуклеотидные последовательности пар праймеров позволяют

проводить амплификацию генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , а также гена человека β -actin в парафинизированных образцах тканей плаценты при проведении ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в формате мультиплекса.

Анализ результатов, полученных в ходе разработки, оптимизации и клинической апробации, позволяет утверждать, что разработанный

метод, основанный на использовании специфических пар праймеров, состава реакционной смеси и условий термоциклирования, можно использовать для одновременной амплификации одного из таргетных генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α и референсного гена β -actin при определении УНЭ указанных генов в парафинизированных образцах тканей плаценты.

Список цитированных источников

1. Optimising sample collection for placental research / G. J. Burton [et al.] // Placenta. – 2014. – Vol. 35. – P. 9–22.
2. Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia / A. Abdulsid, K. Hanretty, F. Lyall // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (1). – e 54540.
3. Global gene expression changes induced in the human placenta during labor / K. J. Lee [et al.] // Placenta. – 2010. – Vol. 31. – P. 698–704.
4. CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use / P. Boeuf [et al.] // BMC Immunology. – 2005. – Vol. 6 (5). – P. 1–14.
5. Полуян, О. С. Усовершенствование метода определения уровней нормализованной экспрессии генов белков теплового шока Chlamydia trachomatis для оценки риска диссеминации возбудителя из урогенитального тракта / О. С. Полуян // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – № 3. – С. 333–342.
6. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных / А. Д. Наследов. – Санкт-Петербург : Питер, 2008. – 416 с.
7. Метод определения уровней экспрессии генов, обеспечивающих синтез коллагена и эластина. в пунктах кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи / С. А. Костюк [и др.] // Дерматовенерология. Косметология. – 2017. – № 2. – С. 179–187.

Molecular genetic method for determining the levels of pro-inflammatory cytokine genes normalized expression in paraffinized placenta tissue samples

Poluyan O. S., Kostiuk S. A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Pregnant women are at high risk due to cardiovascular, pulmonary, hormonal and immunological changes during gestation. Infection with SARS-CoV-2 increases the likelihood of complications and adverse pregnancy outcomes such as miscarriage, stillbirth, preterm birth, gestational diabetes, preeclampsia, fetal growth restriction and birth defects. A meta-analysis found that pregnant women have a significantly increased risk of severe COVID-19, characterized by a cytokine storm. In this article, the authors present a protocol for the development and clinical testing of a molecular genetic method for determining the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α normalized expression in paraffinized placental tissue samples, which will subsequently be used for direct research on placenta samples from patients with COVID-19 in order to assess their diagnostic significance for predicting the development of complications of pregnancy and childbirth.

Keywords: placenta, proinflammatory cytokines, PCR, normalized expression level, COVID-19.

Поступила 05.06.2024