

Молекулярно-генетическая диагностика процессов клеточной сенесценции

Зятков А.А.

Республика Беларусь, г. Гомель

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Введение. В современной медицине ведутся работы по раннему выявлению и предотвращению развития заболеваний, а сам процесс старение рассматривается отдельно, являясь фактором риска их развития. Задача биомаркера старения – достоверно показывать степень сенесценции организма. Решение данной задачи позволит получить новые знания о патогенезе социально-значимых заболеваний и разработать современные диагностические и профилактические подходы.

Цель исследования: изучить способы определения возрастных изменений тканей человека с использованием молекулярно-генетических маркеров, для сравнения календарного и биологического возраста, а также проанализировать связь предикторов сенесценции с инфекционным агентом.

Анализ качественных и количественных характеристик ампликонов локусов МТ-ТL1 (мтДНК) и НВG (ядНК)

На основе методики использования фрагментного анализа подобран тканеспецифический набор праймеров (таб.1) и условия проведения ПЦР для определения количества копий мтДНК в клетках (рис. 1).

Таблица 1 — Структура праймеров для определения количества копий мтДНК в клетках.

Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность
МТ-ТL1	MtF3212	CACCCAAGAACAGGGTTTGT
	MtR3319	TGGCCATGGGTATGTTGTTA
НВG	hbgF	GCTTCTGACACAACGTGTGTTCACTAGC
	hbgR	CACCAACTTCATCCACGTTCACC

Методику определения биологического возраста, основанную на фрагментном анализе целесообразно проводить как дополнительный анализ сенесценции тканей имеющих небольшую скорость обновления для прогнозирования возраст-ассоциированных заболеваний (рис.2).

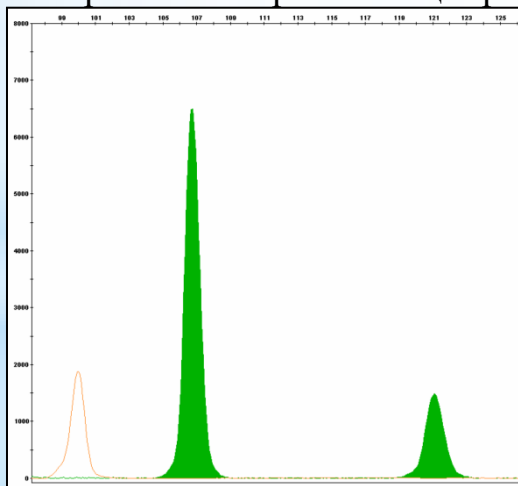


Рисунок 1 — Ампликоны образца, синтезированные с добавлением Pfu ДНК-полимеразы

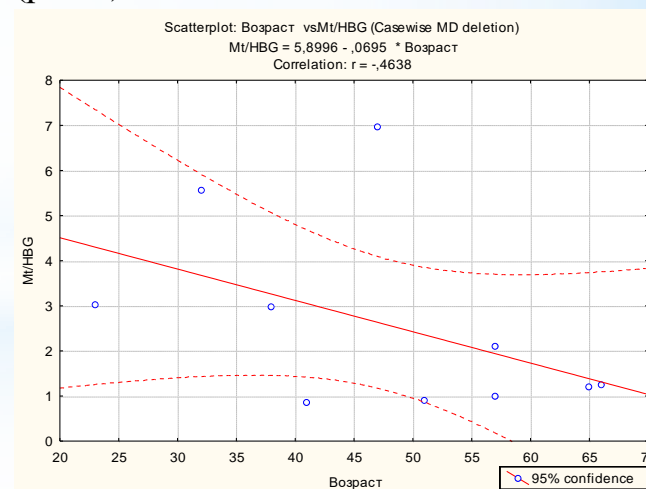


Рисунок 2 — Анализ соотношения количества мтДНК и ядНК, выделенной из биоптатов сосудов, к календарному возрасту

Оценка биологического возраста на основе количественного анализа митохондриальной ДНК с использованием ПЦР-РВ

Scatterplot: Возраст vs. разница C(Casewise MD deletion)
разница C = 7,3663 - ,0228 * Возраст
Correlation: r = -,2155

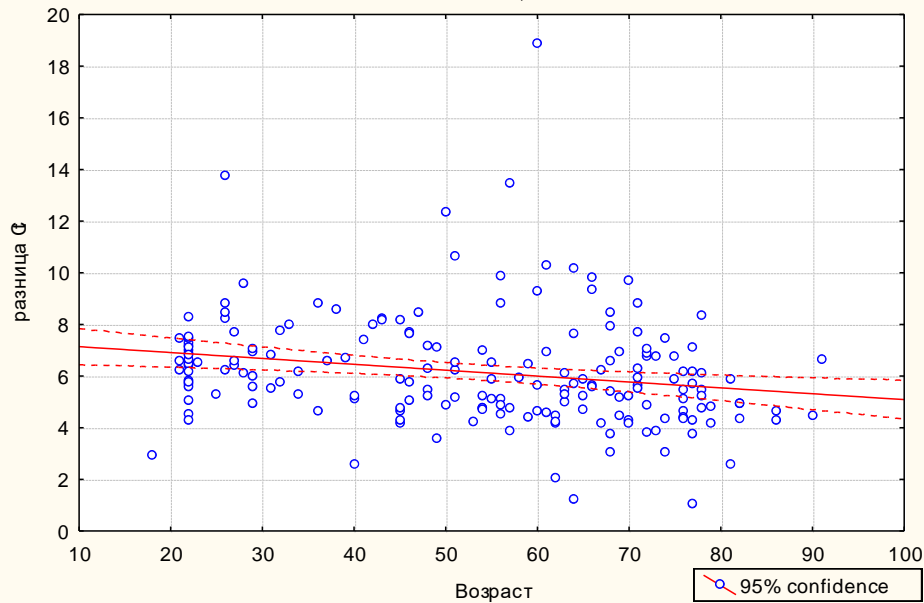


Рисунок 1 – Изучение распределения показателя ΔC_t (RPPH1-mtND1) в зависимости от календарного возраста

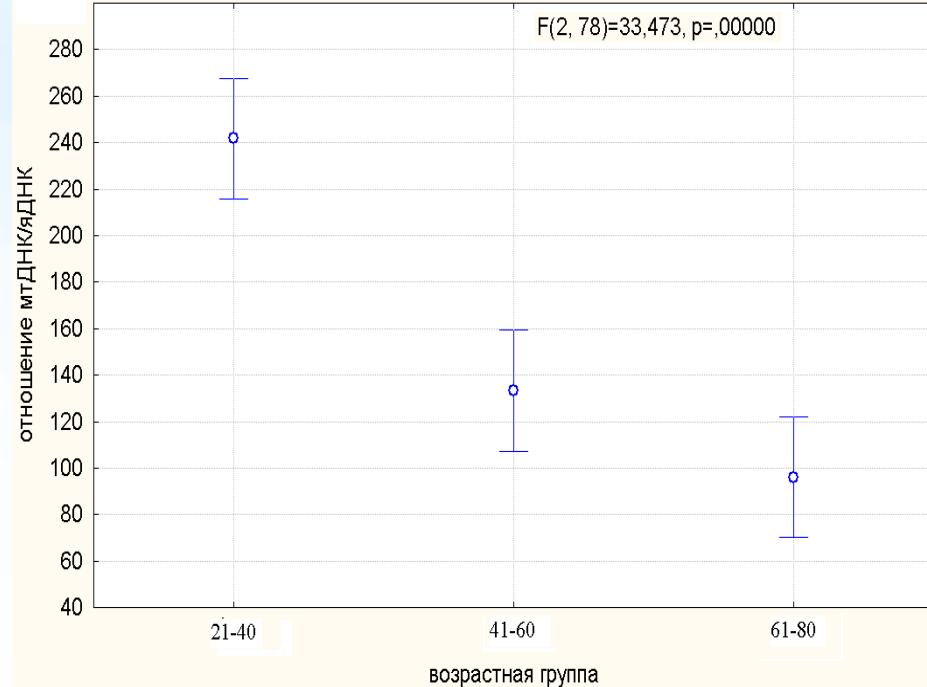


Рисунок 2 – Графическое представление различий между средними отношения мтДНК/ядНК возрастных групп пациентов

Различие средних величин отношения мтДНК/ядНК возрастных групп статистически значимо на уровне $p < 0,05$, сила влияния фактора возраста составляет 46% (рис. 1). Референтный диапазон величин отношения мтДНК/ядНК 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 (рис. 2).

Анализ циркулирующей мтДНК с уровнем Ил-6 в плазме крови больных коронавирусной инфекцией.

Для удаления клеток крови из плазмы, проводили «мягкое» центрифугирование. Количественное определение циркулирующей мтДНК выполняли на роторном амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM для проведения ПЦР в реальном времени. Определение концентрации ИЛ-6, (пг/мл) в плазме крови пациентов проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (РФ) и микропланшетного фотометра .

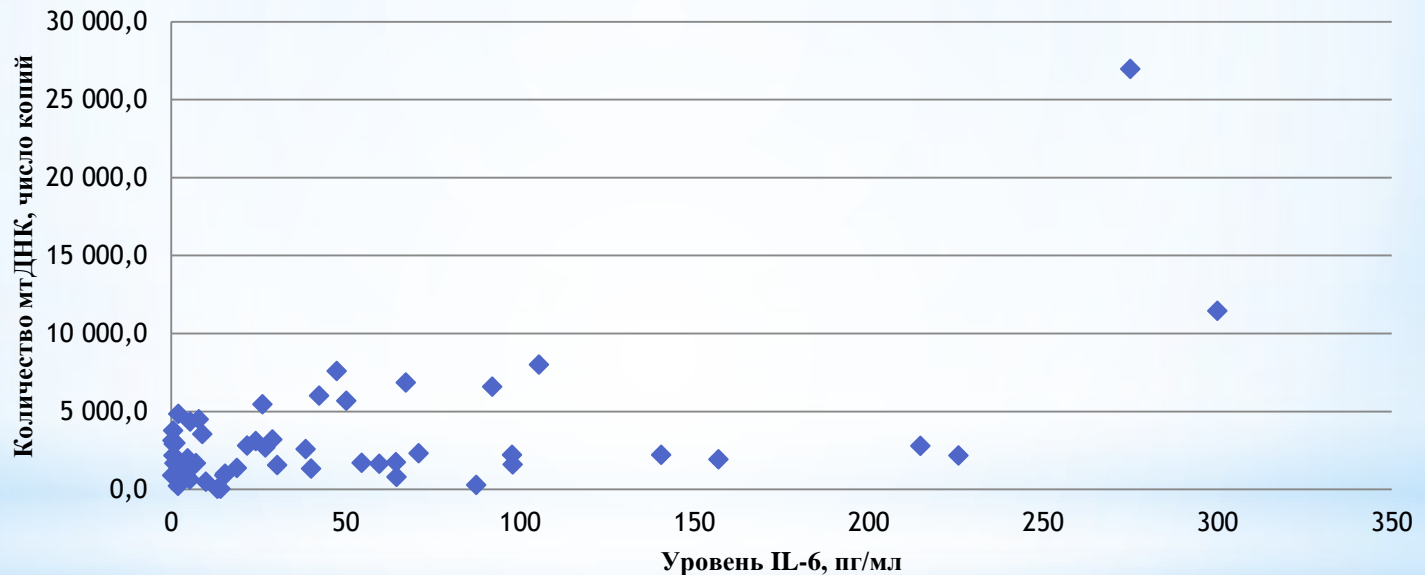


Рисунок 1 – Анализ циркулирующей мтДНК с уровнем Ил-6

Результаты и обсуждение. Количество циркулирующей мтДНК умеренно коррелирует ($r=0,58$) с другим маркером тяжести COVID-19 (ИЛ-6). Полученный показатель требует дальнейшего изучения, как дополнительный критерий прогнозирования течения заболевания COVID-19 (рис. 1).