

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ И СИРТУИНОВ В БИОМОДЕЛИРОВАНИИ ПРЕДЕЛЬНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК СПОРТСМЕНОВ

В.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова*, В.В. Слободенюк, Н.А. Ларюшина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Мини-пиги являются адекватной биомоделью для характеристики процессов работоспособности и выносливости, а также для проведения исследований в области спортивной медицины. Для проведения такого рода исследований нами предложены гены-мишени из семейств белков цитокинов и сиртуинов: *IL-6*, *HMGB1*, *TNF* (гены, отвечающие за синтез белков, относящихся к группе цитокинов) и *SIRT* (трансфераза из семейства белков-сиртуинов). Особый интерес для данного исследования представляет ген *SIRT1* как активатор митохондриальной активности при физической нагрузке. Созданы системы ПЦР в реальном времени, благодаря которым станет возможным проводить оценку влияния различных препаратов при доклинических исследованиях на лабораторных мини-пигах.

Ключевые слова: работоспособность, выносливость, мини-пиги, ПЦР-системы, цитокины, *SIRT*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А. Применение молекулярно-биологических методов оценки экспрессии цитокинов и сиртуинов в биомоделировании предельных физических нагрузок спортсменов. *Биомедицина*. 2021;17(3):10–16. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-10-16>

Поступила 25.04.2021

Принята после доработки 24.07.2021

Опубликована 10.09.2021

APPLICATION OF BIOMOLECULAR METHODS FOR ESTIMATING CYTOKINE AND SIRTUIN EXPRESSION IN BIOSIMULATION OF ULTIMATE PHYSICAL LOAD OF ATHLETES

Vladislav N. Karkischenko, Nataliya V. Petrova*, Vladimir V. Slobodenyuk,
Nadezhda A. Laryushina

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

Mini-pigs are an adequate biomodel for characterizing the processes of working capacity and endurance, as well as for conducting investigations in the field of sports medicine. For this kind of research, we propose gene targets from the families of cytokine and sirtuin proteins: *IL-6*, *HMGB1*, *TNF* (genes responsible for the synthesis of proteins belonging to the cytokine group) and *SIRT* (transferase from the family of sirtuin proteins). The *SIRT1* gene presents particular interest as an activator of mitochondrial activity during exercise. Real-time PCR systems were created, allowing assessment of the effect of various drugs on laboratory mini-pigs in preclinical studies.

Keywords: performance, endurance, mini-pigs, PCR systems, cytokines, *SIRT*

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

For citation: Karkischenko V.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A. Application of Biomolecular Methods for Estimating Cytokine and Sirtuin Expression in Biosimulation of Ultimate Physical Load of Athletes. *Journal Biomed.* 2021;17(3):10–16. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-10-16>

Submitted 25.04.2021

Revised 24.07.2021

Published 10.09.2021

Введение

Для проведения исследований по влиянию различных препаратов на работоспособность лабораторных животных требуются обученные особи, на которых возможно моделировать тренировочный процесс, для чего в лаборатории спортивной биомедицины НЦБМТ ФМБА России успешно используются мини-свиньи светлогорской популяции. При проведении исследований для оценки работоспособности и выносливости животные получают физическую нагрузку во время бега на тредбане [1, 3].

Ранее нами было проведено молекулярно-генетическое исследование, результаты которого свидетельствуют, что ген *NFE2L2*, кодирующий фактор транскрипции Nrf2, активно экспрессируется в ответ на оксидативный стресс в клетках организма животных. Нами показано, что ген *NFE2L2* может служить оценочным критерием при проведении исследований работоспособности и выносливости для индивидуального отбора по группам. На данный момент он рекомендован для проведения оценки влияния фармакологических препаратов на восстановительные свойства организма, при возможном выборе фармнутриентов и экстраполяции исследований на человека [1].

Возможность повлиять на экспрессию гена *NFE2L2* может усилить способность организма к адаптации в условиях кислородного голодания. Спортивная тренировка — самая оптимальная и естественная модель усиленной диссимиляции как причины

оксидативного стресса. Важным практическим результатом и показателем адаптации является повышение работоспособности. Уровень физической работоспособности весьма индивидуален и зависит от многих факторов: генетический полиморфизм, пол, возраст, состояние здоровья, двигательная активность и др. [1]. Для углубленного изучения и понимания этих процессов нами поставлена цель — поиск новых генов-мишеней и создание ПЦР-систем в реальном времени.

Был выделен ряд генов-мишеней, в различной степени влияющих на выносливость данной конкретной особи. Мишенями для молекулярных исследований являлись уровни экспрессии следующих генов: *IL-6*, *HMGB1*, *TNF* (гены, отвечающие за синтез белков, относящихся к группе цитокинов) и *SIRT* (трансфераза из семейства белков-сиртуинов) [2, 4–7].

Ген *IL-6* является провоспалительным цитокином, принимающим участие в воспалительной реакции, также является сильным эндогенным пирогеном (способен вызывать лихорадку при инфекционных и аутоимунных поражениях), а также участвует в созревании ряда иммунокомпетентных тканей, в т. ч. В-клеток. Нарушение регуляции в синтезе данного белка ассоциируется с такими заболеваниями, как миксома сердца, неалкогольная жировая болезнь печени, ревматоидный артрит, а также в клеточном массиве миеломы [7].

Ген *TNF* кодирует полифункциональный цитокин. Данный белок продуцируется

в основном клетками макрофагами, способен вызывать гибель линий опухолевых клеток. Ассоциируется с такими болезнями, как неалкогольная жировая болезнь печени, различные формы рака [7].

Ген *HMGB1* кодирует цитокин, принадлежащий суперсемейству High mobility Group-box. Участвует в организации и регуляции транскрипции ДНК. Обычно содержится в нуклеоплазме. Вне клетки он является индуктором ряда провоспалительных цитокинов. Его связывают с подавлением эпигенетических генов и рекомбинации рДНК, а также процессом старения и некоторыми возрастными патологиями [2, 7].

Наиболее полно отвечает нашим целям семейство белков-сиртуинов. *SIRT* — точные белки, которые, в т. ч., связаны с увеличением продолжительности жизни. Это семейство включает семь белков, кодируемых генами *SIRT1-7* [6, 7]. Сиртуины играют важную роль в ответе на стресс, регуляции циркадных ритмов, эпигенетической регуляции и имеют решающее значение для клеточного метаболизма (митохондриальный биогенез). Исследования показывают, что повышенная активность сиртуинов способствует продолжительности жизни у разных животных. Из семи других сиртуинов семейства *SIRT1* является наиболее изученным. При этом активация *SIRT1* приводит к положительным изменениям в организме: уменьшение ДНК повреждений, уменьшение окислительного стресса, снижение уровня воспаления. Активация *SIRT1* может приводить к улучшению клинической картины при диабете, сердечно-сосудистых заболеваниях, артрите, нейродегенеративных заболеваниях и некоторых видах рака и может замедлять старение [4–7].

Т. о., данный ген является индуктором митохондриальной активности, в т. ч. внутримышечного волокна, и способствует повышению выносливости. В соответствии с этим ген *SIRT1* является подходящим критерием для оценки физической активности

и восстановительного периода после нагрузки как у лабораторных животных, так и у человека.

Цель работы — создание и оптимизация ПЦР-систем в реальном времени для мониторинга уровня экспрессии интересующих нас генов-мишеней *IL-6*, *TNF*, *HMGB1*, *Sirt* для мини-пигов.

Задачи работы:

1. Оценка мини-пигов как предполагаемых подопытных животных в ряде экспериментов по оценке изменений уровней цитокинов и сиртуинов при повышенных нагрузках и в ответ на развитие оксидативного стресса.
2. Биоинформационный анализ литературных источников (с помощью базы NCBA) с целью поиска специфичных и наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей мишеней для создания рабочих праймеров и флуоресцентного зонда к генам *IL-6*, *TNF*, *HMGB1*, *Sirt* мини-пигов.
3. Оптимизация синтезированных праймеров с использованием в качестве биоматериала выделенной из цельной крови мини-пигов лейкоцитарной фракции.

Материалы и методы

Объект исследования

Для мини-пигов доступны различные оценочные методики, в т. ч. биохимические и физические показатели. При этом животные не достигают больших размеров (их вес колеблется в пределах 10–80 кг, в то время как полноразмерные животные весят 450–500 кг), однако сохраняют плодовитость (до 12-ти поросят за один опорос) своих сельскохозяйственных собратьев.

Сходство биохимических анатомо-физиологических процессов у мини-пигов и человека достаточно велико для проведения биохимических и гематологических исследований. При этом полученные данные будут иметь высокую прогностическую ценность.

Материалом для исследования служила цельная кровь мини-пиггов. В нашем исследовании забор крови осуществлялся у мини-свиней светлогорской популяции, как ранее применявшихся в подобного рода исследованиях. Забор материала осуществляли при помощи вакуумных пробирок BD Vacutainer Plus с крышкой BD Hemogard с K2ЭДТА на 10 мл.

Критерии создания праймеров для ПЦР-системы в реальном времени

Для решения данной задачи мы использовали следующие критерии подбора олигонуклеотидных последовательностей:

- процентная доля комплиментарных оснований G-C может составлять от 20 до 80% всей последовательности (актуально и для праймеров и для зонда);
- температура отжига работающих в паре праймеров не должна различаться более чем на 2°C, при этом температура отжига зонда должна быть на 5–10°C выше температуры отжига праймеров;
- четыре 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплиментарны самому парному праймеру и зонду;
- у зонда на 5' конце не должно быть G основания;
- длина олигонуклеотидной последовательности праймера составляет 20–30 нуклеотидов;
- длина ПЦР-продукта составляет 50–200 нуклеотидов;
- расстояние между флюорофором и гасителем не должно быть меньше 5–6 нуклеотидов;
- спектр поглощения гасителя должен перекрываться со спектром излучения флюорофора.

Зачастую при подборе праймеров можно использовать автоматические программы, позволяющие находить подходящие регионы, однако в большинстве случаев оптимальные пары требуют подбора вручную.

Исследования методом ПЦР в режиме реального времени

Оптимизация праймеров для генов *IL-6*, *TNF*, *HMGB1*, *Sirt* мини-пиггов проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и зонда (табл. 1).

Из исследуемого материала выделяли лейкоцитарную фракцию при помощи реагента «Фиколл-урографин» в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («ДНК-Технология», Россия). Далее из очищенного материала выделялась смесь РНК-ДНК с помощью набора для выделения «Рибо-сорб», согласно коммерческой инструкции («AmpliSens», Россия). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно инструкции «Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» («ИнтерЛабСервис», Россия). Количество исследуемых кДНК в образцах рассчитывали путем определения пороговых циклов ПЦР.

Оптимизацию праймеров для генов *IL-6*, *TNF*, *HMGB1*, *Sirt* мини-пиггов проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и зонда (табл. 1). Стадию амплификации кДНК *IL-6*, *TNF*, *HMGB1*, *Sirt*, на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США) в режиме реального времени проводили в 25 мкл смеси состава: ПЦР-буфер ($\times 10$): 700 мМТрис-HCl, pH 8,6 / 25°C, 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 мМ MgCl_2 , 0,2 мМ dNTPs, *Taq*-полимеразы. Амплификация проводилась по протоколу с градиентом: на стадии отжига температура в каждой лунке изменялась в диапазоне от 65°C до 55°C в ячейках (в вертикальных столбиках) с А по Н, оставаясь стабильной в горизонтальных рядах.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры и зонд ПЦР-системы

Table 1. Oligonucleotide primers and PCR probe

Исследуемая мишень	Олигонуклеотидные праймеры и зонд
<i>IL-6sus F</i>	5'-TCCAGACAAGCCACCACCC-3'
<i>IL-6sus R</i>	5'-CGTGGACGGCATCAATCTCA-3'
<i>IL-6sus ROX</i>	GTCACAGAACGAGTGGATGAAGAAC-BHQ2
<i>TNFsus F</i>	5'-TCTCCTTCTCCTGGTCGCA-3'
<i>TNFsus R</i>	5'-CGACGGGCTTATCTGAGGT-3'
<i>TNFsus ROX</i>	ACGCTCTTCTGCCTACTGCACCTTCG-BHQ2
<i>HMGB1sus F</i>	5'-TGAAGAGGATGAGGAGGAGG-3'
<i>HMGB1sus R</i>	5'-CCACCAGGACAGGGCTATCT-3'
<i>HMGB1sus ROX</i>	AGGATGAGGAGGAAGAAGAAGATGA-BHQ2
<i>Sirt sus F</i>	5'-TG GTTTGGAAGATGATGCTG-3'
<i>Sirt sus R</i>	5'-CCCTAATGCTGGTGGACAA-3'
<i>Sirt sus ROX</i>	GAAGTGACCAAGAGGCAGTTAATGA-BHQ2

Результаты и их обсуждение

Подбор оптимальных условий проведения амплификации представлен в табл. 2.

Исходя из времени «подъёма» детектируемой амплификации каждой из проб и выхода кривой на плато, представленных на рисунке, были определены оптимальные температуры отжига каждого из праймеров. Чем меньше цикл «подъёма», тем больше активность праймера в аналогичной пробе и, соответственно, более близкая к оптимальной температура.

Заключение

Светлогорские мини-свиньи проявляют себя как легко обучаемые животные и являются оптимальной моделью для проведения экспериментов, связанных с физическими нагрузками.

В результате биоинформационного анализа литературных данных были созданы специфические ПЦР-системы с флюоресцент-

ными зондами «в реальном времени» к генам *IL-6*, *TNF*, *HMGB1*, *SIRT*. Экспериментально подобраны оптимальные температуры отжига и концентрации ПЦР-смеси для каждого гена.

Показано, что выбранные гены-мишени могут быть применимы в качестве оценочного критерия молекулярно-генетических механизмов оксидативного стресса в клетках, а также могут являться специфическими показателями при проведении исследований работоспособности и выносливости для индивидуального отбора по группам. Рекомендованные ПЦР-системы готовы для проведения исследований влияния фармакологических препаратов на восстановительные свойства организма, при возможном выборе фармнутриентов и экстраполяции исследований на человека. Также выбранные гены-мишени могут быть использованы при моделировании ревматоидного артрита, сопровождающегося хро-

Таблица 2. Режимы проведения амплификации в реальном времени

Table 2. Conditions of real-time PCR

Режимы	Температура	Продолжительность	Количество циклов
Начальная денатурация	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	20 с	45
Отжиг	55–65°C	40 с	
Элонгация	72°C	30 с	

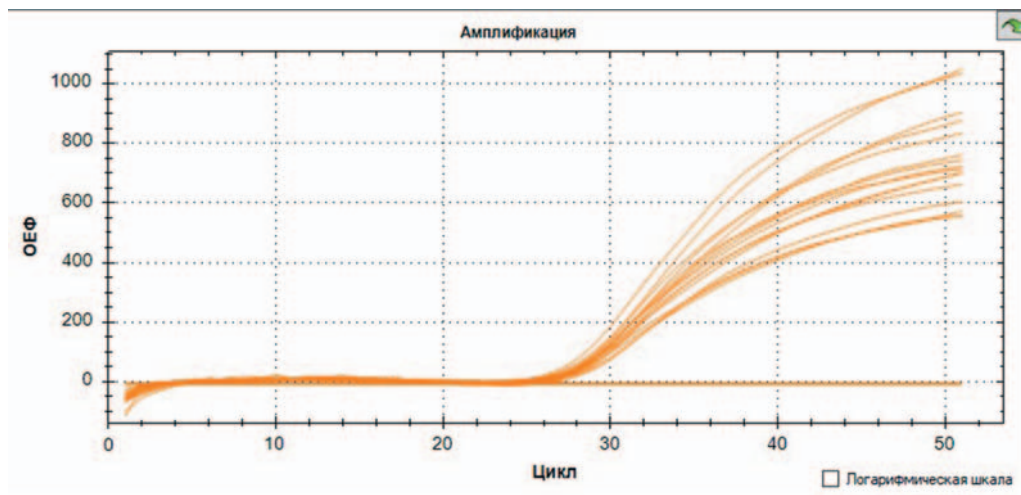


Рис. Логарифмическая кривая амплификации. По оси абсцисс откладываются относительные единицы флуоресценции, по оси ординат — циклы амплификации.

Fig. Logarithmic curve of amplification. Axis X presents relative fluorescent units and Axis Y presents number of amplification cycles.

ническим воспалительным аутоиммунным процессом, что позволит отслеживать ин-

тенсивность протекания заболевания и эффективность проводимой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Слободенюк В.В., Алимкина О.В., Кулакова М.И., Васильева И.А. Исследование и оценка молекулярно-генетических признаков экспрессии гена *NFE2L2* при адаптации к физическим нагрузкам у мини-пиггов. *Биомедицина*. 2020;16(1):42–52. [Karischenko V.N., Petrova N.V., Stankova N.V., Slobodenyuk V.V., Alimkina O.V., Kulakova M.I., Vasilyeva I.A. Issledovanie i ocenka molekulyarno-geneticheskikh priznakov ekspresii gena *NFE2L2* pri adaptatsii k fizicheskim nagruzkam u mini-pigov [Study and evaluation of molecular genetic signs of the *NFE2L2* gene expression during adaptation to physical loads in mini pigs]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(1):42–52. (In Russian)]. DOI:10.33647/2074-5982-16-1-42-55.
2. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Салль Т.С. Алармин1 (HMGB1) и возрастная патология. *Успехи физиологических наук*. 2017;48(4):40–55. [Kuznik B.I., Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Sall T.S. Alarmin1 (HMGB1) i voznrastnaya patologiya. Epigeneticheskie mekhanizmy regulyatsii [Alarmin1 (HMGB1) and Age-Related Pathologies. Epygenetic Regulatory Mechanisms]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Advances in Physiological Sciences]*. 2017;48(4):40–55. (In Russian)].
3. Рыбакова А.В., Ковалева М.А., Калатанова А.В., Ванатиев Г.В., Макарова М.Н. Карликовые свиньи как объект доклинических исследований. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;3:168–176. [Rybakova A.V., Kovaleva M.A., Kalatanova A.V., Vanatiev G.V., Makarova M.N. Karlikovye svin'i kak obyekt doklinicheskikh issledovaniy [Mini pigs as the object of pre-clinical studies]. *Mezhdunarodny Vestnik Veterinarii [International bulletin of Veterinary Medicine]*. 2016;3:168–176. (In Russian)].
4. Iside C., Scafuro M., Nebbioso A., Altucci L. SIRT1 Activation by natural phytochemicals: an overview. *frontiers in pharmacology*. 2020;11:1225. DOI:10.3389/fphar.2020.01225.
5. Pardo P.S., Boriek A.M. SIRT1 Regulation in ageing and obesity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020;188:111249. DOI:10.1016/j.mad.2020.111249.
6. Jeong H.W., Cho S.Y., Kim S., Shin E.S., Kim J.M., Song M.J., Park P.J., Sohn J.H., Park H., Seo D.-B., Kim W.G., Lee S.-J. Chitoooligosaccharide induces mitochondrial biogenesis and increases exercise endurance through the activation of sirt1 and AMPK in rats. *PLoS One*. 2012;7:e40073. DOI:10.1371/journal.pone.0040073.
7. <https://www.proteinatlas.org/>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Nataliya V. Petrova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Vladimir V. Slobodenyuk, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author