

Н.В. Силивончик, А.Ю. Данилин, магистранты
Научный руководитель – **В.Т. Чещевик**, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

За последнее десятилетие область знания о роли митохондриальных дисфункций в развитии патологических состояний человека претерпевает бурный рост. Будучи центральными органеллами эукариотической клетки, ответственными за производство энергии, митохондрии также участвуют в регуляции апоптоза, кальциевого обмена, врожденного иммунитета и синтеза фосфолипидов, что делает их особо важными для всех типов клеток и определяет уязвимость энергоемких клеток к митохондриальной дисфункции [1].

Изменчивость митохондриальной ДНК (мтДНК) играет ключевую роль в развитии митохондриальной дисфункции. Высокая предрасположенность мтДНК к мутации связана с рядом заболеваний, в частности нейродегенеративных, заболеваний сердечно-сосудистой системы и т.п [2].

Анализ функционального состояния форменных элементов крови в качестве биомаркера митохондриально-ассоциированных заболеваний органов и тканей является перспективным направлением в разработке новых подходов в диагностике и скрининге развития патологических состояний.

Тромбоциты содержат 1–3 митохондрий на клетку, каждая из которых содержит несколько копий собственного кольцевого митохондриального генома размером 16,6 кб, который может активно транскрибироваться в тромбоцитах [3]. Несмотря на незначительное содержание митохондрий в клетках, общее количество тромбоцитов крови превышает содержание других форменных элементов, и, кроме того, в данных клетках отсутствует влияние ядерной ДНК вследствие отсутствия клеточного ядра. Мутации в генах мтДНК, как наследуемые, так и приобретенные, могут изменять клеточный метаболизм. Мутации мтДНК могут вызывать аномальное образование активных форм кислорода, нарушая целостность митохондрий и их биогенез. Однонуклеотидные полиморфизмы мтДНК могут влиять на сложные взаимодействия между митохондриями и ядром клетки, а также на эффективность процесса окислительного фосфорилирования. Генетическая вариативность, влияющая на количественные и функциональные характеристики тромбоцитов, представляет собой значимый фактор, способный модулировать предрасположенность к сердечно-сосудистым и воспалительным заболеваниям. Особенно важным это становится в контексте комбинированного воздействия внешней среды, старения и сопутствующих патологий. Даже нейтральные на первый взгляд полиморфизмы могут изменять временные рамки манифестации или усугублять клиническое течение, что делает их изучение крайне актуальным в рамках современной митохондриологии [4; 5].

Таким образом, поскольку от качества и количества полученных препаратов мтДНК зависит успех дальнейших манипуляций, таких как ПЦР, обратная транскрипция, клонирование, секвенирование и других методов, то выделение мтДНК является важнейшей составляющей в молекулярно-генетическом исследовании митохондриального генома тромбоцитов.

В связи с вышеизложенным целью данного исследования явилось разработка методики для получения чистого препарата мтДНК тромбоцитов человека.

Для получения тромбоцитов использовалась цельная человеческая кровь объемом 10 мл с использованием в качестве антикоагулянта 3,8% цитрата натрия. Получение обогащенной тромбо-

цитами плазмы осуществляли в течение 20 мин при 100 g. Данную плазму можно заморозить при -20 °С с учетом того, что после разморозки часть тромбоцитов подвергается лизису. Осаждение тромбоцитов из полученной плазмы проводили в течение 15 минут при 5000 g. После осаждения тромбоцитов из свежей плазмы вызывали гемолиз эритроцитов добавлением к осадку тромбоцитов 1 мл дистиллированной воды, его ресуспензированием, после чего добавляли 0,6 М NaCl для остановки гемолиза (если используется замороженная плазма, то проведением гемолиза можно пренебречь, так как в процессе замораживания-оттаивания практически все эритроциты разрушаются) [6]. После проводили осаждение в течение 30 секунд при 14500 g. Затем проводили 3-х кратную промывку стерильным физиологическим раствором путем ресуспензирования осадка тромбоцитов и его центрифугированием 30 секунд при 14500 g.

Лизис тромбоцитов с сопутствующим лизисом их митохондрий проводили с использованием модифицированного лизирующего буфера Кавасаки следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ Tris HCl, pH 8,3, 2,5 мМ MgCl₂, 1 % Тритон X-100 [7]. К осадку тромбоцитов добавляли 96 мкл лизирующего буфера и ресуспензировали обратным пипетированием. Затем добавляли 4 мкл раствора протеиназы К в концентрации 10 мг/мл. Лизис осуществляли в термостате при 60 °С в течение 3 ч.

По завершению инкубирования к лизату добавляли 100 мкл 6М NaCl, интенсивно перемешивали. После добавляли 200 мкл раствора хлороформ:изоамилового спирта (24:1), деликатно перемешивали инвертированием в течение 2-х минут и центрифугировали 15 минут при 4 °С и 15000 об/мин.

Супернатант в объеме 150–160 мкл переносили в чистые пробирки и добавляли 600 мкл 96 % этанола, охлажденного до -20 °С, и интенсивно перемешивали. После перемешивания в растворе визуализировали мелкодисперсные белесые частицы, напоминающие взвесь или «пыль», что свидетельствует о начале процесса осаждения митохондриальной ДНК. Появление таких агрегатов указывает на достаточную концентрацию солей и этанола, необходимых для эффективной преципитации ДНК. Пробирки помещали в морозильную камеру при температуре -20 °С на 15–25 минут с целью усиления концентрирования ДНК. Увеличение времени осаждения может привести к копреципитации молекул РНК, поэтому для получения чистого препарата ДНК стоит ограничиться предложенным временным интервалом.

После инкубации пробирок в морозильной камере, проводили центрифугирование при 4 °С при 15000 g в течение 10 минут. Осадок ДНК промывали 3 раза 200 мкл 70% этанола. После сушки в течение 10 мин при 37 °С осадок ресуспензировали в 15 мкл ТЕ-буфера.

Количественный анализ ДНК и определение степени ее очистки проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 в ультрафиолетовом диапазоне.

Из исходного объема 1450 мкл обогащенной плазмы, в трёх независимых повторностях, удалось получить препарат мтДНК со средней концентрацией 46,08 нг/мкл. Показатель чистоты по соотношению оптических плотностей 260/280 в среднем составил 1,92, что говорит о хорошем уровне очистки от белков и позволяет использовать такие образцы в дальнейшем для молекулярно-биологических исследований.

Полученные данные показывают, что предложенный протокол можно использовать для стабильного выделения митохондриальной ДНК из плазмы крови.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (договор № 65 от 05.05.2021) в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» (Рег. № НИР 20241017).

Список использованных источников

1. Chan, D. C. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease / D. C. Chan // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2020. – Vol. 15, № 1. – P. 235–259.
2. Zapico, S. C. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences / S. C. Zapico, D. H. Ubelaker // *Aging and Disease*. – 2013. – Vol. 4, № 6. – P. 364–380.
3. Macaulay, I. C. Platelet genomics and proteomics in human health and disease / I. C. Macaulay [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2005. – Vol. 115, № 12. – P. 3370–3377.
4. Nugent, D. Platelet genomics: the role of platelet size and number in health and disease / D. Nugent, T. Kunicki // *Platelets*. – 2016. – Vol. 28, № 1. – P. 27–33.
5. Castañeda, V. The MitoAging Project: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mitochondrial genes and their association to longevity / V. Castañeda [et al.] // *Mitochondrion*. – 2022. – Vol. 66. – P. 13–26.

6. Biagini, G. Mitochondrial DNA in platelets from aged subjects / G. Biagini [et al.] // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 1998. – Vol. 101. – P. 269–275.

7. Sandy, M. S. PCR Analysis of Platelet mtDNA: Lack of Specific Changes in Parkinson's Disease / M. S. Sandy [et al.] // *Movement Disorders*. – 1993. – Vol. 8, № 1. – P. 74–82.