

глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) (Criscuolo et al., 2009, Heidinger et al., 2014). С помощью программы Primer-BLAST нами был проведен дизайн праймеров (прямой – CATCAAATGGGCGGATGCAG, обратный – GCACCAGCAATCCTTTTCCC), специфичных к нуклеотидной последовательности гена *GAPDH*, полученной из базы данных NCBI (NM_204305.1).

Для каждой ПЦР-реакции использовали 25 мкл смеси, содержащей 2 мкл ДНК (5нг/мкл), по 1 мкл прямого и обратного праймеров концентрацией 10 мкмоль, 10 мкл 2,5х реакционной смеси с интеркалирующим красителем EVA Green (Синтол, Россия) и 11 мкл деионизированной воды. Количественную ПЦР проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) по следующей программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 мин., затем 30 циклов, включающих денатурацию при 95 °С – 15 сек., отжиг при 58.5°С – 25 сек. и элонгацию при 72 °С – 40 сек. Сигнал свечения регистрировали в фазу элонгации, и с помощью программного обеспечения Rotor-Gene 6000 Series Software 1.8 проводили первичную обработку полученных данных, а именно, определение значений порогового цикла (*Ct*) для ПЦР-продуктов теломерных участков и гена *GAPDH*. Также была определена эффективность ПЦР, используя серию разведений ДНК. Относительный размер теломерных участков определяли по формуле $1+E^{(\Delta Ct)}$, где $\Delta Ct = Ct_{\text{теломер}} - Ct_{GAPDH}$, а *E* – это эффективность реакции. Результаты статистически обрабатывали с помощью программного пакета RStudio. Нормальность распределения определяли, используя критерий Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности различий между группами применяли критерий Манна-Уитни.

В результате нами были получены следующие количественные соотношения ампликонов теломерных областей к ампликонам однокопийного региона (*GAPDH*): для 76 суточных птиц этот показатель составил 4.75 ± 2.35 , для 330 суточных – 2.37 ± 1.47 и для 458 суточных 2.20 ± 1.63 . Следовательно, наибольшая длина теломерных участков наблюдается у наиболее молодой возрастной группы (76 суток), а меньшая – у более возрастных птиц (330 и 458 суток), что согласуется с результатами, полученными на других видах животных и птиц (Criscuolo et al., 2009; Schoeftner, Blasco, 2010). Большой разброс полученных показателей относительной длины теломерных участков хромосом внутри каждой группы можно объяснить индивидуальной изменчивостью (O'Callaghan, Fenechet, 2011; Mather et al. 2011). Таким образом, полученные предварительные результаты, подтвердили информативность методики для дальнейших исследований.

Используя данную методику, было проведено исследование фоновых значений относительной длины теломерных участков у 30 особей в каждой группе: контрольной (I), и трех опытных (II, III и IV). Контрольная группа получает стандартный рацион, в рацион

опытных вводятся препараты пробиотических штаммов II группа - пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, III группа - пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 и IV группа – пробиотический препарат на основе *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895). Были получены следующие количественные соотношения ПЦР-продуктов теломерных областей к ПЦР-продуктам гена *GAPDH*: I группа – 5.41 ± 2.24 , II группа – 2.51 ± 0.59 , III группа – 3.58 ± 0.95 , IV группа – 2.24 ± 0.30 (Рис.1). Таким образом, наибольшая относительная длина теломерных участков обнаружена у птиц контрольной группы (I), более низкие значения показателя отмечены для II и III групп, и наименьший размер теломер хромосом выявлен у IV группы. Несмотря на высокие значения стандартного отклонения, статистическая оценка результатов показала, что численные соотношения в группах соответствуют нормальному распределению. Достоверность различий показателей между группами была статистически проанализирована с помощью двухвыборочного критерия Стьюдента. В результате, обнаружено достоверное уменьшение относительной длины теломер во II (2.2 раза), III (1.5 раза) и IV (2.4 раза) группах по сравнению с контролем (I группа). Во II группе значение показателя достоверно выше (в 1.12 раза), чем в IV группе. А длина теломерных участков у птиц III группы в 1.4 и 1.6 раза больше чем у птиц II и IV групп, соответственно.

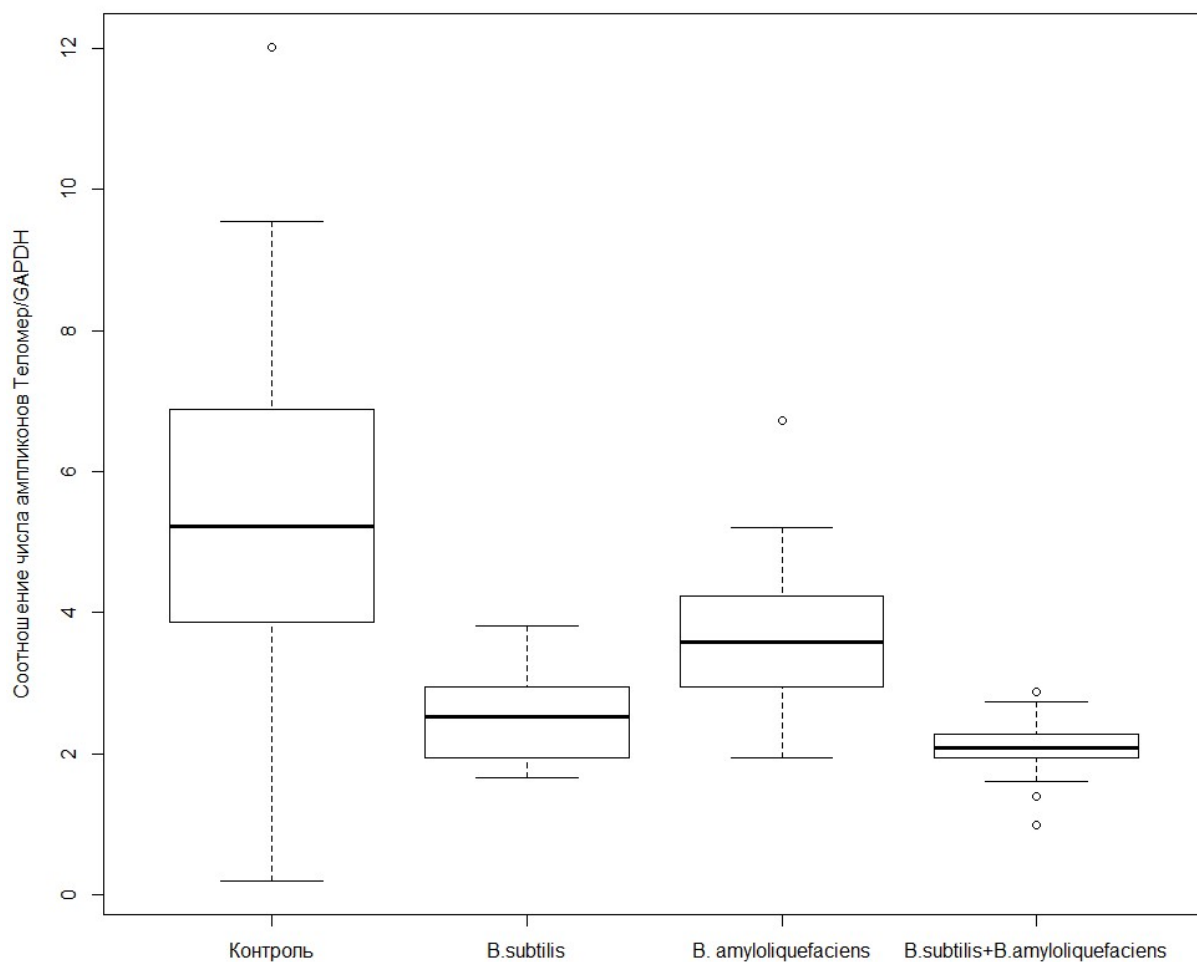


Рис. 1. Относительная длина теломерных участков хромосом в исследованных группах.

Оценка стабильности митохондриальной ДНК.

Другим генетическим показателем окислительного статуса является уровень повреждения митохондриальной ДНК (Sedelnikova et al., 2010). Повышенная генерация активных форм кислорода приводит к окислительным повреждениям ДНК, содержание которых можно оценить количественно, например, методом количественного ПЦР. Принцип метода заключается в относительной количественной оценке длинных (более 5 т.п.н.) ПЦР-продуктов (Santos et al., 2002). Наличие окислительных повреждений в ДНК может ингибировать полимеразную цепную реакцию. При этом, с увеличением размера амплифицируемого участка ДНК, возрастает вероятность регистрации окислительных повреждений на данном участке и, соответственно, разрешающая способность метода. В качестве внутреннего стандарта используют количество коротких (до 300 п.н.) ПЦР-продуктов.

Первоначальным этапом реализации данной задачи был подбор условий проведения ПЦР. В связи с тем, что результаты ПЦР длинных фрагментов могут зависеть от типа ДНК полимеразы, ПЦР апробировали с использованием двух наборов реактивов: Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) и LongAMP Taq PCR Kit (New England Biolabs, Великобритания). ПЦР проводили согласно инструкциям производителей с использованием 10 нг ДНК, 0.2 мкмоль прямого и обратного праймеров, специфичных к последовательности митохондриальной ДНК курицы, из базы данных NCBI (NC_001323.1). С помощью программы Primer-BLAST нами был проведен дизайн праймеров: один прямой – ACCTTAGCCATCATCCCCCT и три обратных CAGTGATTAGGGAGGAGCCTTG (ПЦР-продукт 271 п.н.), GTGCGTGGATGGCTTGT TTT (ПЦР-продукт 5061 п.н.) и GGGTTGGGTTGTCGACTGAA (ПЦР-продукт 10070 п.н.).

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе: для набора LongAMP Taq PCR Kit - начальная денатурация при 94 °С в течение 30 сек., затем 30 циклов, включающих денатурацию при 94 °С – 15 сек., отжиг при 59°С – 20 сек. и элонгацию при 65 °С – 8.5 мин и один цикл финальной элонгации при 65°С – 15 мин; для набора Encyclo Plus PCR kit - начальная денатурация при 94 °С в течение 3 мин., затем 30 циклов, включающих денатурацию при 94 °С – 15 сек., отжиг при 61-63°С – 20 сек. и элонгацию при 72 °С – 8.5 мин и один цикл финальной элонгации при 72°С – 15 мин.

В результате использования набора реактивов LongAMP Taq PCR Kit были получены 3 ампликона различной длины: 271, 5061 и 10070 пар нуклеотидов, соответственно. В результате ПЦР с применением набора Encyclo Plus PCR kit детектировали только 2 ампликона: 271 и 5061 пар нуклеотидов (Рис. 2). Амплифицировать специфичный фрагмент размером 10070 пар нуклеотидов при различных режимах ПЦР (температура отжига праймеров, концентрация праймеров и ДНК) нам не удалось, поэтому, в дальнейшем мы использовали только набор реактивов LongAMP Taq PCR Kit.

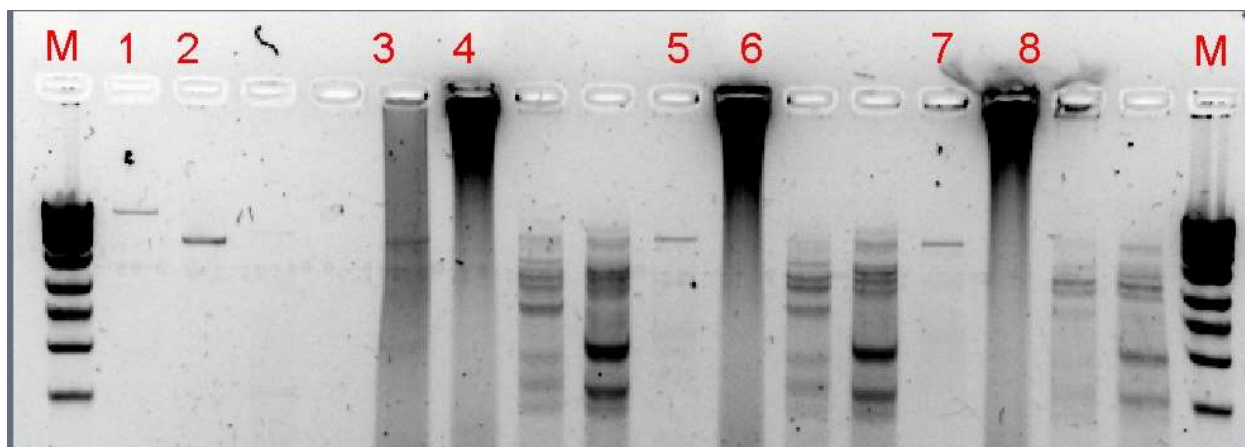


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов митохондриальной ДНК.

М – маркер длинн (1 – 10 т.п.н.); 1,2 – ПЦР-продукты, полученные с использованием LongAmp полимеразы (1 - Ампликон 10070 п.н., 2 – Ампликон 5061 п.н.); 3-8 - ПЦР-продукты, полученные с использованием Encyclo полимеразы, с различной температурой отжига праймеров : 61 С° - 3,4; 62 С° - 5,6; 63 С° - 7,8.

Для определения информативности методики мы использовали перекись водорода в качестве индуктора активных форм кислорода *in vitro*. С этой целью была получена смесь ДНК из различных образцов, выровненная до конечной концентрации 20 нг/мкл. Эта смесь ДНК была разделена на две алиquotы контрольную и опытную в трех повторностях каждая. К 30 мкл опытных образцов добавляли равный объем свежеприготовленного раствора перекиси в концентрации 100 мкМ, а к контрольным растворам ДНК - равный объем деионизированной воды. После 5 минутной инкубации при комнатной температуры ДНК очищали на силикатных колонках (Евроген, Россия). Затем измеряли концентрацию очищенной ДНК и для дальнейшего анализа ее стандартизовали до концентрации 5 нг/мкл. После проведения ПЦР количество ампликонов оценивали флуориметрически.

В результате различия между количеством коротких (271 п.н.) ампликонов, полученных из контрольной и подвергшейся воздействию перекиси ДНК, не превышала 10 %, а количество длинных (5061, 10070 п.н.) ампликонов в контрольных образцах было в 4.8 и 11 раз больше, чем в опытных. При пересчете этих значений на 1 тысячу пар оснований, в среднем, воздействие перекиси водорода привело к возникновению одного (0.95 ± 0.3 в ПЦР-продукте размером 5061 п.н. и 1.09 ± 0.3 в ПЦР-продукте размером 10070 п.н.) повреждения. Таким образом, данная методика достаточно информативна для определения количества повреждений митохондриальной ДНК, вызываемых активными формами кислорода.

В условиях *in vivo* происходит репарация окислительных повреждений ДНК. Однако при старении организма система репарации ДНК работает менее эффективно, в

связи с этим, наблюдается повышенное число повреждений ДНК (Sedelnikova et al., 2010). В первую очередь увеличивается число повреждений митохондриальной ДНК, из-за ее пространственной близости к основному источнику внутриклеточных активных форм кислорода – дыхательной цепи (Lin et al, 2011). Поэтому было проведено предварительное исследование влияния возраста птиц на уровень стабильности митохондриальной ДНК.

В качестве материала для реализации данной задачи использовали полученную ранее ДНК (концентрация 5 нг/мкл) птиц трех возрастных групп (76, 330 и 458 суток). Используя метод количественной ПЦР, нами были количественно определены короткие (271 п.н.) и длинные (10070 п.н.) ПЦР-продукты. Для каждой ПЦР реакции использовали одинаковое количество ДНК (10 нг). Следует отметить, что метод флуориметрической оценки содержания ДНК в растворе позволяет измерить только концентрацию общей ДНК - ядерной и митохондриальной. Поэтому для каждого образца число коротких ПЦР-продуктов использовали в качестве внутреннего стандарта копийности мтДНК, связи с чем, первичные значения концентраций длинных ампликонов нормализовали по числу коротких фрагментов с учетом эффективности реакций.

В результате были получены следующие нормализованные концентрации длинных ПЦР-продуктов: 76 суток – 51.3 ± 13.9 нг/мкл, 330 суток – 20.4 ± 2.8 нг/мкл и 458 суток – 22.7 ± 4.8 . Следовательно, наименьшее количество повреждений мтДНК выявлено у птиц возрастом 76 суток, а наибольшее - возрастом 330 суток. Следует подчеркнуть, что достоверные отличия между значениями показателя для группы 76 суточных птиц и группами 330 и 458 суточных птиц достоверны. А статистически значимые различия в количестве повреждений мтДНК у 330 и 458 суточных птиц не обнаружены. Таким образом, методика определения стабильности ДНК с помощью количественной ПЦР достаточно информативна для определения возрастных изменений показателя, однако с ограничением на поздних стадиях онтогенеза.

Используя апробированную нами методику, было проведено исследование фоновых значений стабильности митохондриальной ДНК у 20 особей в каждой группе (I, II, III и IV). Получены следующие нормализованные концентрации длинных ПЦР-продуктов: I группа – 24.5 ± 10.5 нг/мкл, II группа – 19.6 ± 4.9 нг/мкл, III группа – 25.9 ± 11.0 нг/мкл, IV группа – 22.9 ± 7.5 нг/мкл. Следовательно, наибольшая стабильность мтДНК выявлена у птиц III группы, а наименьшая у птиц II группы. При этом достоверные отличия обнаружены между I и II группами, а также II и III группами.

Список литературы

1. Cawthon R. M. Telomere measurement by quantitative PCR // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30. – № 10.
2. Criscuolo F., Bize P., Nasir L., Metcalfe N. B., Foote C. G., Griffiths K., Gault E. A., Monaghan P. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres // *Journal of Avian Biology*. – 2009. – Vol. 40 – pp. 342-347.
3. Gil M. E., Coetzer T. L. Real-Time Quantitative PCR of Telomere Length // *Molecular Biotechnology*. – 2004 – Vol. 27. – pp. 169-172.
4. Heidinger B. J., Blount J. D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N. B., Monaghan P., Telomere length in early life predicts lifespan // *PNAS*. – 2012. – Vol. 109. – № 5. – pp. 1743–1748
5. Houben J. M. J., Moonen H. J. J., van Schooten F. J, Hageman G. J. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2008. – Vol. 44. – pp. 235–246.
6. Lin J., Epel E., Blackburn E. Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging // *Mutation Research*. – 2012. – Vol. 730. – pp. 85-89.
7. Lin H., Xu H., Liang F.-Q., Liang H., Gupta P., Havey A. N., Boulton M. E., Godley B. F. Mitochondrial DNA Damage and Repair in RPE Associated with Aging and Age-Related Macular Degeneration. // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2011. – Vol. 52. – № 6. – pp. 3521-3529.
8. Mather K. A., Jorm A. F., Parslow R. A., Christensen H. Is Telomere Length a Biomarker of Aging? A Review // *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. – 2011. – Vol. 66 – № 2. – pp. 202–213.
9. O’Callaghan N. J., Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length // *Biological Procedures Online*. – 2011. - V. 13.
10. O’Callaghan N. J., Dhillon V. S., Thomas P., Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length // *Biotechniques*. – 2008. – Vol. 44. – № 6. – pp 807-809.
11. Paul L. Diet, nutrition and telomere length // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2011. – Vol. 22. – pp. 895–901
12. Santos J. H., Mandavilli B. S., Van Houten B. Measuring Oxidative mtDNA Damage and Repair Using Quantitative PCR // *Methods in Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 197. – pp. 159-176.
13. Schoeftner S., Blasco M. A. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2010. – Vol. 21. – № 2. – pp. 186–193.
14. Sedelnikova O. A., Redon C. E., Dickey J. S., Nakamura A. J., Georgakilas A. G., Bonner W. M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. – 2010. – Vol. 704. - pp. 152-159.

Исполнители:

Д.б.н., профессор А.В. Усатов

М.С. Макаренко