

УДК 577.21:616-018]-092.9-091.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-5-14>

Динамические изменения целостности РНК, экспрессии генов и патоморфология тканей экспериментальных мышей в посмертном периоде

Буйко Е.Е., Перина Е.А., Васильченко Д.В., Цыденова И.А., Хмелевская Е.С.,
Уфандеев А.А., Кайдаш О.А., Иванов В.В., Вторушин С.В., Удут Е.В.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение закономерности морфологических изменений, величины целостности РНК и паттернов экспрессии генов тканей мышей, отобранных при аутопсии в контролируемых условиях.

Материалы и методы. Мышей линии Balb/c подвергали эвтаназии с последующей некропсией через 0, 3, 12, 24, 48, 72 ч. Первые 3 ч после эвтаназии мыши находились при комнатной температуре, а затем были перемещены в холодильник (4 °С). Общую РНК выделяли из образцов тканей почек, печени, головного мозга, целостность образцов РНК измеряли при помощи капиллярного электрофореза с расчетом значений RQN (RNA Quality Number). Уровень экспрессии генов домашнего хозяйства Actb, Epc1, Rps18 оценивали при помощи обратнo-транскриптной количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan. Гистологическое исследование выполнено по стандартной методике.

Результаты. Выделенная из тканей почек мышей РНК подвержена деградации в большей степени с увеличением посмертного интервала, чем РНК печени. При этом обнаружена отрицательная линейная зависимость между показателем RQN и длительностью посмертного интервала для образцов печени и почек животных. В то же время образцы РНК головного мозга не демонстрировали существенного изменения показателя RQN во всех временных точках. В тканях почек и печени мышей значительно снижается экспрессия генов *Epc1* и *Rps18*. Однако величина экспрессии генов *Epc1* и *Rps18* в головном мозге животных остается стабильной во всех временных точках и не демонстрирует значительного снижения через 72 ч после проведения эвтаназии. При гистологическом исследовании не обнаружено явных морфологических изменений, что не исключает наличия ультраструктурных патологических изменений.

Заключение. Величина целостности РНК (RQN) в аутопсийных тканях является важным предиктором качества образца для молекулярно-биологических исследований, включая анализ экспрессии генов.

Ключевые слова: посмертный интервал, аутопсия, целостность РНК, ПЦР, экспрессия генов

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-69-10035 «Новые подходы валидации результатов молекулярного профилирования патологических изменений тканей на основе данных молекулярного профилирования, полученных при исследовании биопсии и аутопсии».

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комиссией IACUC СибГМУ (заключение № 1 от 05.06.2023).

Для цитирования: Буйко Е.Е., Перина Е.А., Васильченко Д.В., Цыденова И.А., Хмелевская Е.С., Уфандеев А.А., Кайдаш О.А., Иванов В.В., Вторушин С.В., Удут Е.В. Динамические изменения целостности РНК,

✉ Буйко Евгений Евгеньевич, buykoevgen@yandex.ru

экспрессии генов и патоморфология тканей экспериментальных мышей в посмертном периоде. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):5–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-5-14>.

Dynamic changes in RNA integrity, gene expression, and tissue pathomorphology of experimental mice in the postmortem period

Buyko E.E., Perina E.A., Vasilchenko D.V., Tsydenova I.A., Khmelevskaya E.S., Ufandeev A.A., Kaidash O.A., Ivanov V.V., Vtorushin S.V., Udut E.V.

Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To examine the pattern of morphological changes, RNA quality number, and gene expression in mouse tissues sampled at autopsy under controlled experimental conditions.

Materials and methods. Balb/c mice were euthanized and subsequently subjected to necropsy at 0, 3, 12, 24, 48, and 72 hours of the postmortem period. During the first three hours following euthanasia, the mice were maintained at room temperature, after which they were transferred to a refrigerator (4 °C). Total RNA was extracted from tissue samples taken from the kidney, liver, and brain; the integrity of the RNA samples was assessed by capillary electrophoresis, and the RNA quality number (RQN) was calculated. The expression levels of *Actb*, *Epas1*, and *Rps18* housekeeping genes were evaluated by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) with original primers and probes using the TaqMan assay. The histologic examination was performed according to standard techniques.

Results. Degradation of RNA extracted from mouse kidney tissues appeared to be greater than that of RNA taken from the liver. In the meantime, a negative linear correlation was observed between RQN and the duration of the postmortem interval for liver and kidney samples. In contrast, no significant changes in the RQN score were observed for brain RNA samples at any of the time points. The expression of the *Epas1* and *Rps18* genes was significantly decreased in mouse kidney and liver tissues. However, the level of *Epas1* and *Rps18* gene expression in the brain remained stable at all time points and did not exhibit a significant decrease at 72 hours after euthanasia. No obvious morphological changes were detected by the histologic examination, which does not exclude the presence of ultrastructural pathological changes.

Conclusion. RQN in autopsy tissues serves as a crucial predictor of sample quality for molecular biology studies, including gene expression analysis.

Keywords: postmortem interval, autopsy, RNA integrity, PCR, gene expression

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Science Foundation project No. 23-69-10035 “New approaches to validating the results of molecular profiling of pathological tissue changes based on molecular profiling data obtained from biopsy and autopsy studies”.

For citation: Buyko E.E., Perina E.A., Vasilchenko D.V., Tsydenova I.A., Khmelevskaya E.S., Ufandeev A.A., Kaidash O.A., Ivanov V.V., Vtorushin S.V., Udut E.V. Dynamic changes in RNA integrity, gene expression, and tissue pathomorphology of experimental mice in the postmortem period. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):5–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-5-14>.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования посмертных тканей имеют основополагающее значение для судебной медицины и биологических исследований при изучении этиологии и

патогенеза многих заболеваний [1, 2], в особенности в области онкологии [3]. Биологические материалы, полученные в процессе аутопсии пациентов с онкологическими заболеваниями, представляют большой интерес в исследовательской работе, поскольку обе-

спечивают проведение адекватной оценки качества клинической диагностики и разработку оптимизированных терапевтических стратегий [4].

Основным подходом к идентификации патологических изменений, происходящих в организме на уровне тканей, является морфологическое исследование, представляющее собой интерпретацию структуры ткани по результатам микроскопического анализа, в том числе с использованием методов иммуногистохимии. В то же время внедрение в практику передовых методов оценки экспрессии белка и проведение трансляционных мультиомных исследований позволяют сформировать максимально комплексное понимание патогенетических процессов онкологических заболеваний, связанных с изменением молекулярного, метаболического и генетического ландшафтов [5].

Однако использование посмертных тканей неизменно подразумевает временную задержку, поскольку образцы не могут быть немедленно сохранены в условиях, которые предотвращают деградацию биологических молекул. Процессы аутолиза клеток и деградации тканей ставят под угрозу надежность данных об экспрессии генов и результаты мультиомных исследований [2].

Таким образом, временной интервал между смертью и сбором образцов является важным фактором точности и достоверности данных молекулярно-биологических исследований, и посмертная деградация РНК может рассматриваться в качестве одного из маркеров сохранности аутопсийной ткани [2].

Традиционно целостность РНК оценивалась качественно путем сравнения интенсивности полос 28S и 18S рибосомальной РНК (рРНК) при проведении электрофореза в агарозном геле. Относительно недавно были разработаны автоматизированные электрофоретические системы на основе микрофлюидных технологий, способные проводить количественную оценку качества РНК на основе анализа оцифрованных электрофореграмм [6]. Действительно, молекулы РНК в клетках крайне уязвимы к деградации, и измерение величины целостности РНК (RNA Quality Number, RQN) является стандартным методом оценки деградации РНК [7].

Представленные в литературе данные о влиянии целостности РНК на достоверность и надежность результатов молекулярно-биологических исследований аутопсийных тканей противоречивы [8–10]. В нескольких работах предприняты попытки исследования взаимосвязи сохранности РНК аутопсийной ткани мозга человека и результатов оценки экспрессии генов [11] или транскриптомного профилирования [7].

Однако существенным ограничением дизайна представленных исследований является отсутствие оценки влияния таких факторов, как величина посмертного интервала и стандартизация процедуры пробоподготовки образцов тканей. Поэтому важное практическое значение имеет исследование влияния этих факторов на динамические изменения целостности РНК в строго контролируемых условиях, что может быть обеспечено только с использованием животных моделей.

Целью настоящего исследования является изучение закономерности морфологических изменений, величины целостности РНК и паттернов экспрессии генов тканей мышей, отобранных при аутопсии в контролируемых условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 30 самках мышей линии Balb/c (возраст к началу исследования 7 нед), полученных из SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Использование животных в рамках настоящего исследования одобрено комиссией IACUC СибГМУ (заключение № 1 от 05.06.2023).

Животные всех групп были подвергнуты эвтаназии методом цервикальной дислокации после наркотизации газовым средством «Форан» (Aesica Queenborough Ltd., Великобритания).

Животные первой группы были подвергнуты некропсии непосредственно после проведения эвтаназии в качестве контроля ($n = 5$). Животных остальных экспериментальных групп вскрывали через 3, 12, 24, 48, 72 ч после эвтаназии ($n = 5$ для всех групп). При этом первые 3 ч после эвтаназии мыши находились при комнатной температуре, а затем были перемещены в холодильник (4 °C). Таким образом, были воссозданы условия, максимально приближенные к рутинному протоколу вскрытия пациентов, умерших в специализированных лечебных учреждениях [4].

Общую РНК выделяли из образцов тканей с помощью набора HiPure Total RNA Kit Magen (Guangzhou Magen Biotechnology, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали путем измерения оптической плотности при 260 и 280 нм при помощи Nanodrop 2000 UV-VIS (Thermo Scientific, США). Целостность образцов РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе Bio-Fragment Analyzer (Bioptic Inc., Китай).

Выделенная РНК была использована для синтеза кДНК с использованием набора обратной транскриптазы MMLV (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием

программы Vector NTI Advance 11.5, Oligo 7,5 и базы данных NCBI (Nucleotide Database) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). Уровень экспрессии генов *Epas1* (*Endothelial PAS Domain Protein 1*) и *Rps18* (*Ribosomal Protein S18*) оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RT- q PCR) по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия) (с оригинальными праймерами и зондами (*ACTB*: *F* 5' TGGCAACGAGCGGTTTC 3'; *R* 5' CATAGAGGTCTTTACGGATGTCA 3'; *Probe* FAM-5'-TGGCAACGAGCGGTTTC-3'- BHQ1; ампликон 134 п.о.; *EPAS1*: *F* 5' ATGTGTGAGCCAATCCAGC 3'; *R* 5' TCCAAGATTCTGTCGTACAG 3'; *Probe* FAM-5'-ATGTGTGAGCCAATCCAGC-3'- BHQ1; ампликон 116 п.о.; *Rps18*: *F* 5' CCGCCATGTCTCTAGTGATC 3'; *R* 5' GTGATGGCGAAGGCTATTT 3'; *Probe* FAM-5'- CCGCCATGTCTCTAGTGATC-3'- BHQ1; ампликон 97 п.о.). Полимеразная цепная реакция ставилась в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25 °C, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01%-й Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94 °C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °C, 10 с, и 2-й шаг 20 с – при температуре 60 °C. В качестве гена-рефери использован *Actb* (*actin beta*). Относительная экспрессия генов была оценена с помощью метода Pfaffl [12] и выражалась в условных единицах (усл. ед.). В качестве значений калибратора использовались усредненные значения, полученные из образцов РНК, выделенной из тканей мышей сразу после эвтанази.

Для проведения гистологического исследования образцы тканей мышей были помещены в 10%-й рН-нейтральный раствор формалина с последующей фиксацией материала в течение 24 ч. Гистологическая проводка материала осуществлялась по стандартной методике в автоматическом гистопроцессоре ASP 6025 (Leica Microsystems, Германия) с изготовлением парафиновых блоков. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм получали с парафиновых блоков при помощи санного микротомы HM 430 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Окрашивание микропрепаратов проводилось готовым раствором гематоксилина и эозина в аппарате Varistain™ Gemini (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Морфологическое исследование и фотографирование гистологических микропрепаратов образцов проводили с использованием прямого микроскопа

Eclipse Ni (Nikon, Япония) и цифровой камеры Nikon (Япония) с программой компьютерного анализа изображений NIS-Elements D 5.20.00 (Nikon, Япония). Морфологическое исследование включало оценку изменений в органах и тканях на предмет явлений аутолиза.

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Все результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Проверку на нормальность распределения значений проверяли с использованием критерия Шапиро – Уилка. Для проверки значимости различий между исследуемыми группами использовали дисперсионный анализ с поправкой на множественное сравнение Бенджамини – Хохберга. Взаимосвязь между признаками оценивали при помощи коэффициента корреляции Пирсона. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании была проведена оценка качества РНК, выделенной из почек, печени и головного мозга мышей в условиях, близких к тем, которые используются при аутопсии человека, а в качестве индикатора целостности РНК был использован показатель RQN (RNA Quality Number).

Установлено, что в тканях почек, печени и головного мозга мышей, отобранных непосредственно после проведения эвтаназии, величины RQN составляли $8,86 \pm 0,49$; $8,48 \pm 0,44$ и $8,36 \pm 0,61$ соответственно (рис. 1 *a, c, e*). При расчете величины RQN учитываются доли площадей пиков 18S и 28S на электрофореграмме по сравнению с общей площадью под кривой, долю крупных молекул по сравнению с мелкими и высоту пиков 18S и 28S, что позволяет получить исчерпывающую информацию о степени деградации молекул РНК [13]. Значения RQN располагаются в диапазоне от 1 до 10, где 10 соответствует максимальной целостности выделенной РНК. Полученные результаты указывают на высокую сохранность молекул РНК в отобранных образцах и согласуются с данными литературы [14].

Хранение мышей после эвтаназии при комнатной температуре в течение 3 ч не приводило к снижению величины целостности РНК во всех исследуемых органах (см. рис. 1, *a, c, e*). Целостность РНК, выделенной из почек мышей после дальнейшего хранения при температуре 4 °C в течение 12 ч, снижалась на 34,9% ($p < 0,0001$), печени – на 15,8% ($p = 0,0443$) (см. рис. 1, *a, c*). Дальнейшее увеличение посмертного интервала до 24, 48 и 72 ч при 4 °C

сопровождалось последовательным снижением величин целостности РНК для тканей обоих органов, значения RQN для которых в конечной точке составляли $4,00 \pm 0,86$ и $4,81 \pm 0,35$ соответственно.

Таким образом, выделенная из тканей почек мышей РНК была в большей степени подвержена деградации с увеличением сроков посмертного интервала. В то же время образцы РНК головного мозга не

демонстрировали существенного изменения показателя RQN во всех временных точках (см. рис. 1, e). Важно отметить, что величина отношения 260/280, характеризующая чистоту выделенной тотальной РНК, для всех образцов РНК находилась в диапазоне от 2,0 до 2,3 и не наблюдалось существенных изменений этого показателя сразу после эвтаназии животных и в разные сроки посмертного интервала.

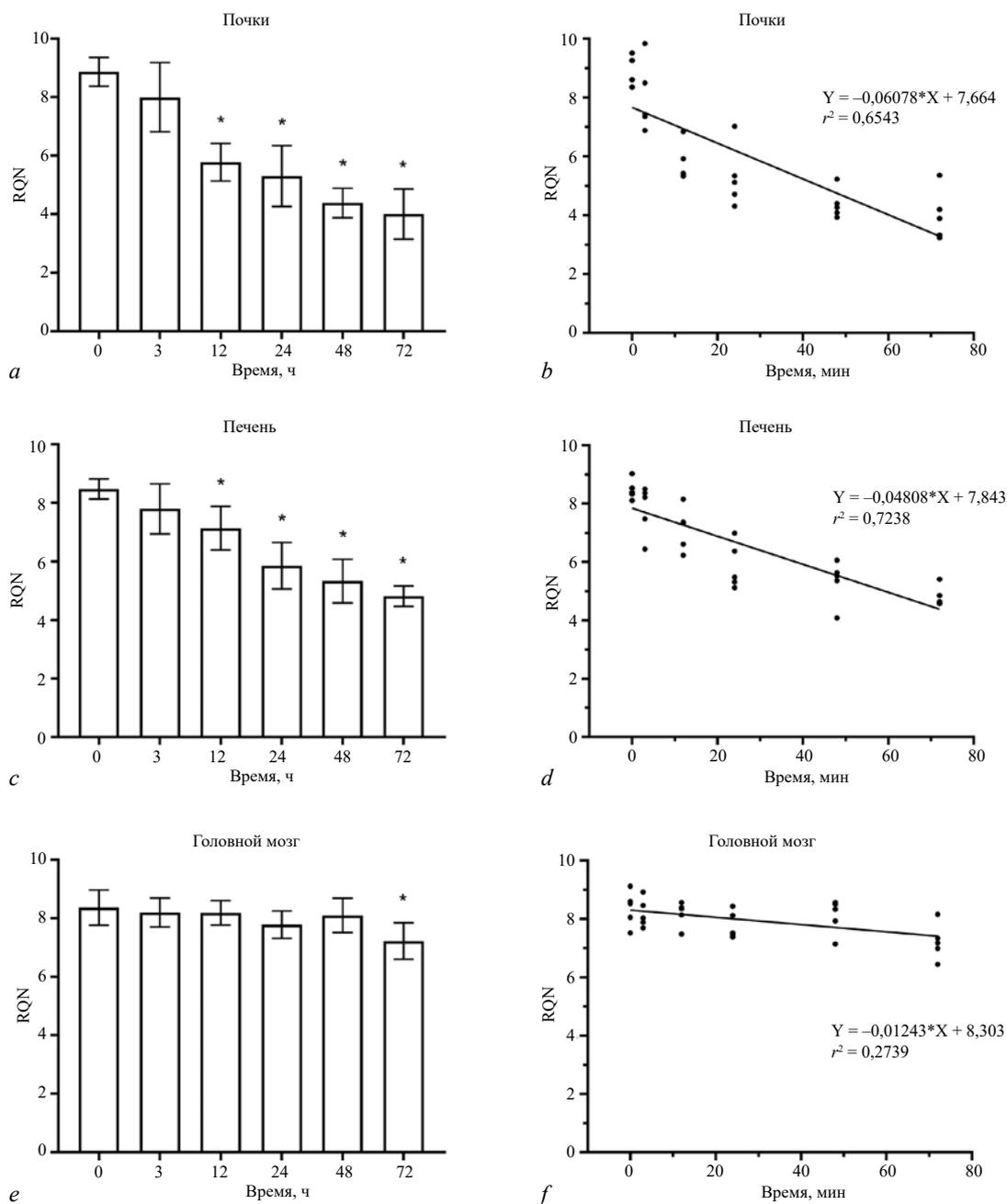


Рис. 1. Величина показателя целостности РНК RQN (RNA Quality Number) и ее зависимость от времени после эвтаназии в почках (a, b), печени (c, d) и головном мозге (e, f) мышей. Здесь и на рис. 2, 3 первые 3 ч после эвтаназии трупы мышей находились при комнатной температуре, затем были перемещены в холодильник (4 °С). Количество животных в каждой группе – 5. * различия статистически значимы ($p < 0,05$) с группой животных, подвергнутых некропсии сразу после эвтаназии (0 ч)

Обнаружена отрицательная линейная зависимость между показателем RQN и длительностью посмертного интервала для образцов печени и почек животных (см. рис. 1, *b, d*). В то же время такая зависимость для тканей головного мозга мышей не продемонстрирована (см. рис. 1, *f*). Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень деградации РНК зависит от типа ткани и величины посмертного интервала.

Известно, что целостность молекул РНК имеет важное значение при проведении экспериментов, направленных на оценку экспрессии генов [14]. Для оценки взаимосвязи сохранности РНК аутопсийной ткани мышей и результатов молекулярно-биологических исследований в отобранных образцах почек, печени и головного мозга методом РТ-ПЦР оценивалась экспрессия генов домашнего хозяйства – *Actb*, *Epas1* и *Rps18*. В качестве референтного гена был выбран *Actb* вследствие его высокой стабильности в посмертно отобранных тканях [15].

В результате проведенных экспериментов установлено, что в тканях почек мышей после хранения эвтаназированных животных в течение 12 ч (3 ч при комнатной температуре и 9 ч при 4 °С) значительно снижается экспрессия гена *Epas1*: с $1,5 \pm 0,4$ до $0,9 \pm 0,3$ усл. ед. ($p = 0,0167$). В печени экспрессия этого гена снижается только через 48 ч после эвтаназии ($1,4 \pm 0,4$ усл. ед. через 3 ч и $0,7 \pm 0,2$ усл. ед. через 48 ч соответственно, $p = 0,0141$). Увеличение времени посмертного интервала приводило к дальнейшему снижению уровня экспрессии гена *Epas1* в почках и печени (рис. 2, *a, c*).

Интересно, что ткани почек и печени демонстрируют незначительное увеличение экспрессии гена *Rps18* через 12 ч после эвтаназии мышей (на 15,4% в почках и на 30,0% в печени в сравнении с аутопсийным материалом, отобранным через 3 ч) (см. рис. 2, *b, d*). В дальнейшем экспрессия этого гена снижается и через 72 ч хранения тканей составляет в почках $0,6 \pm 0,1$ усл. ед. (через 3 ч $1,3 \pm 0,3$ усл. ед., $p = 0,0012$) и в печени $0,5 \pm 0,2$ усл. ед. (через 3 ч $1,0 \pm 0,3$ усл. ед., $p = 0,0454$).

В то же время величина экспрессии генов *Epas1* и *Rps18* в головном мозге животных остается стабильной во всех временных точках и не демонстрирует значительного снижения через 72 ч после проведения эвтаназии (см. рис. 1, *e, f*).

Таким образом, показанные динамические изменения паттернов экспрессии генов мышей согласуются с приведенными выше результатами оценки целостности РНК и зависят от исследуемого органа и длительности посмертного интервала.

Для характеристики посмертных изменений в образцах аутопсийного материала (почек, печени и головного мозга) мышей было проведено патоморфологическое и гистологическое исследование (рис. 3).

В образцах тканей, полученных от экспериментальных животных в различных временных точках (0, 3, 12, 24, 48 и 72 ч после эвтаназии мышей), гистоархитектоника органов была сохранена. В почках на всех сроках эксперимента корковое и мозговое вещество дифференцировалось отчетливо, каналы почек были без особенностей, явлений аутолиза на светооптическом уровне обнаружено не было. При исследовании образцов печени гистоструктура органа также была сохранена, в части препаратов имелись липидные включения в цитоплазме гепатоцитов и явления зернистой дистрофии. Явлений аутолиза во всех исследованных образцах не обнаружено. В головном мозге отмечался слабо выраженный перипеллюлярный отек, макро- и микроглия были сохранены, явлений аутолиза во всех исследованных образцах не обнаружено (см. рис. 3).

Таким образом, на микроскопическом уровне не было обнаружено явных морфологических изменений, таких как аутолиз и дегенеративные процессы, что не исключает наличия ультраструктурных патологических изменений [16].

ОБСУЖДЕНИЕ

Целостность молекул РНК имеет первостепенное значение при проведении экспериментов, направленных на оценку экспрессии генов выделенной РНК, особенно при проведении современных высокотехнологичных исследований с использованием микрочипов и мультиомиксных технологий [13, 17]. Действительно, одной из основных проблем, возникающих при работе с аутопсийными тканями, является выраженная разнородность образцов, поскольку факторы, определяющие молекулярные параметры, до и после смерти невозможно полностью контролировать [18, 19].

Понимание взаимосвязи изменений, наступающих в разные сроки посмертного интервала при работе с аутопсийными образцами, с качеством образцов и корректностью интерпретации результатов молекулярно-биологических исследований, включая целостность РНК и профиль экспрессии генов, имеет большое значение [20].

Поэтому в настоящем исследовании было проведено изучение закономерности морфологических изменений, величины целостности РНК и паттернов экспрессии генов тканей мышей, отобранных при аутопсии в контролируемых условиях.

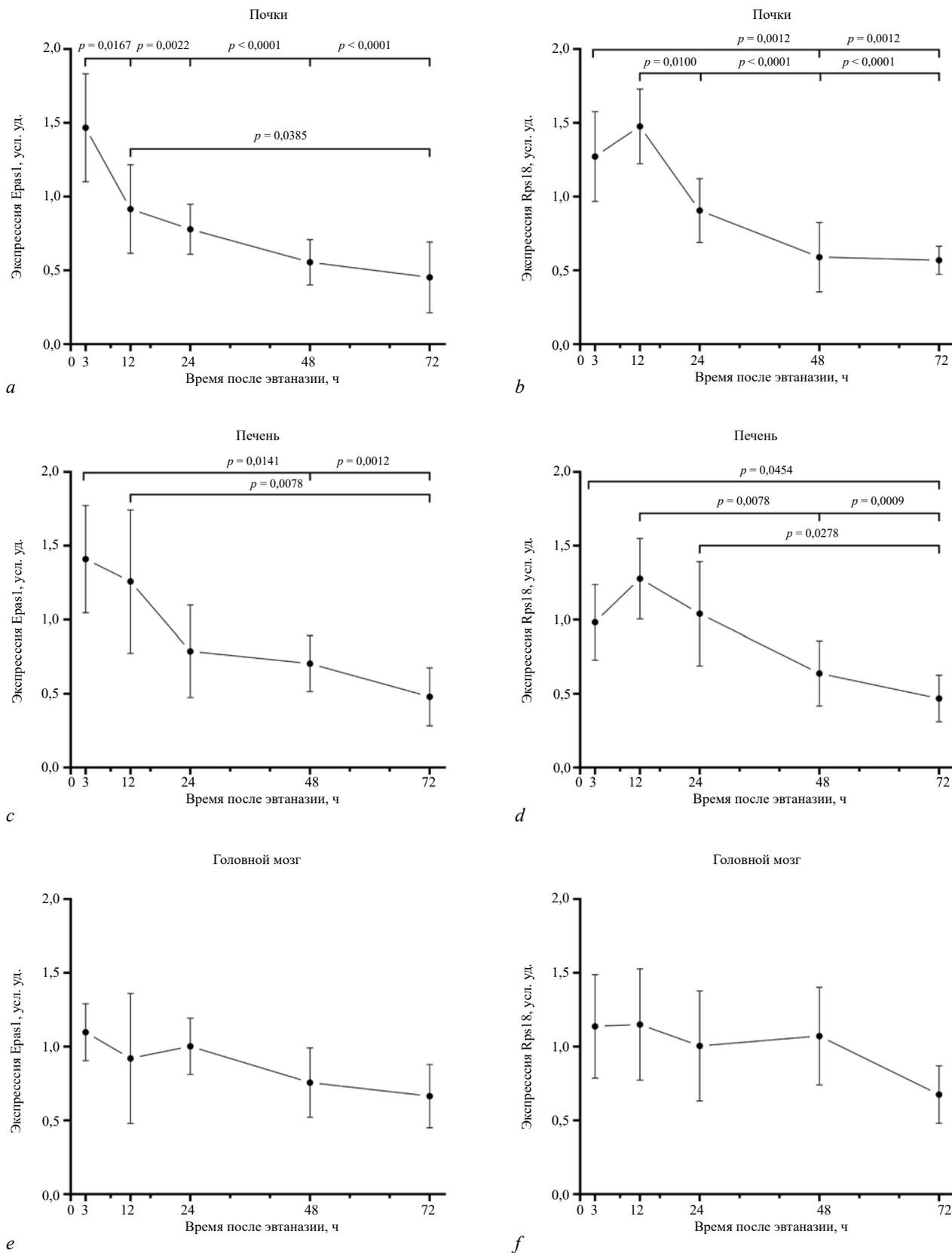


Рис. 2. Экспрессия генов *Epas1* и *Rps18* в почках, печени и головном мозге мышей в разные сроки после эвтаназии, оцененная относительно гена-рефери *Actb* (*actin beta*)

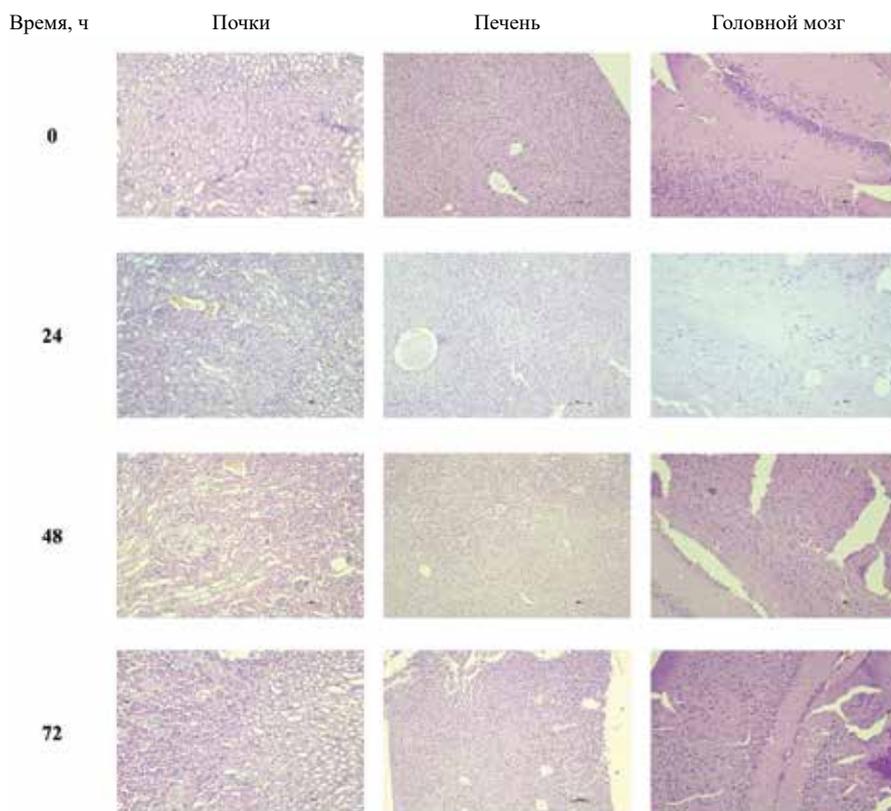


Рис. 3. Микроскопическая картина почек, печени и головного мозга мышей в разные сроки после эвтаназии. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 10$

Проведение анализа показало наличие тканеспецифичности потери целостности РНК в различные сроки посмертного интервала. При этом почки и печень демонстрируют отрицательную зависимость показателя целостности РНК (RQN) с увеличением времени перед забором образцов. Напротив, образцы тканей головного мозга в гораздо меньшей степени подвержены посмертным изменениям, выражающимся в снижении показателя RQN. Подобные результаты были получены ранее в экспериментах по изучению влияния посмертного интервала на качество изолированной тотальной РНК мозга мышей Valb/c [21].

Оценка целостности РНК имеет важное значение для получения надежных результатов об уровне экспрессии генов [22]. Значения числа целостности РНК располагаются в диапазоне от 1 до 10 [13], где значения RQN выше 8,0 указывают на высокую целостность образцов РНК, от 5,0 до 8,0 – на умеренно деградированные образцы, а ниже 5,0 – на наличие значительной деградации [23]. RQN, равный 5, часто используется в качестве критерия для включения биологических образцов в исследование, хотя в литературных источниках отсутствует консенсус на этот счет [23].

Ткани почек и печени мышей в конечной точке наблюдения (72 ч после проведения эвтаназии) продемонстрировали снижение значений RQN более чем на 50% до $4,0 \pm 0,86$ и $4,81 \pm 0,35$ соответственно, что согласуется со значительным уменьшением количества мРНК стабильно экспрессируемых генов *Eras1* и *Rps18*. Действительно, в отдельных работах показано, что целостность рибосомальной РНК, выражаемая в RQN, может использоваться как альтернативный показатель качества информационной РНК (мРНК) [9, 22].

В то же время результаты гистологического исследования с использованием рутинной окраски не отражают динамические процессы деградации тканей в посмертном периоде на молекулярном уровне. Для выявления закономерностей развития ультраструктурных изменений требуются исследования с применением методов электронной микроскопии [16].

Таким образом, величина целостности РНК (RQN) в аутопсийных тканях является важным предиктором качества образца для молекулярно-биологических исследований, включая анализ экспрессии генов. Проведение дальнейших исследований позволит выявить закономерности, описывающие взаимосвязь молекулярных профилей тканей, полу-

ченных от трупов и биопсийного материала, и стандартизировать протоколы обращения с аутопсийным материалом для получения информативных результатов в мультиомиксных исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что деградация РНК в динамике посмертного периода протекает тканеспецифично и в наибольшей степени выражена в почках и печени экспериментальных животных, в отличие головного мозга. В тканях почек и печени мышей значительно снижается экспрессия стабильно экспрессируемых генов *Epas1* и *Rps18*. Величина экспрессии генов *Epas1* и *Rps18* в головном мозге животных остается стабильной во всех временных точках и не демонстрирует значительного снижения через 72 ч после проведения эвтаназии.

Обнаруженные динамические изменения паттернов экспрессии генов мышей согласуются с результатами оценки целостности РНК и зависят от исследуемого органа и длительности посмертного интервала. Таким образом, величина целостности РНК (RQN) в аутопсийных тканях является важным предиктором качества образца для молекулярно-биологических исследований, включая анализ экспрессии генов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Mackenzie I.R., Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *Journal of Neurochemistry*. 2016;38:54–70. DOI: 10.1111/jnc.13588.
- Zhu Y., Wang L., Yin Y., Yang E. Systematic analysis of gene expression patterns associated with postmortem interval in human tissues. *Scientific Reports*. 2017;7(1):5435. DOI: 10.1038/s41598-017-05882-0.
- Strand C., Enell J., Hedenfalk I., Fernö M. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis – a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC Molecular Biology*. 2007;8:1–9. DOI: 10.1186/1471-2199-8-38.
- Kocsmár É., Schmid M., Cosenza-Contreras M., Kocsmár I., Föll M., Krey L. et al. Proteome alterations in human autopsy tissues in relation to time after death. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2023;80(5):117. DOI: 10.1007/s00018-023-04754-3.
- Cao L., Huang C., Zhou D.C., Hu Y., Lih T.M., Savage S.R. et al. Proteogenomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell*. 2021;184(19):5031–5052. DOI: 10.1016/j.cell.2021.08.023.
- Sidova M., Tomankova S., Abaffy P., Kubista M., Sindelka R. Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015;5:3–9. DOI: 10.1016/j.bdq.2015.08.002.
- Johnson E.S., Stenzel K.E., Lee S., Blalock E.M. Declining RNA integrity in control autopsy brain tissue is robustly and asymmetrically associated with selective neuronal mRNA signal loss. *BioRxiv*. 2021;2021. DOI: 10.1101/2021.09.07.459326.
- Fan J., Khani R., Sakamoto H., Zhong Y., Michae C., Pen D. et al. Quantification of nucleic acid quality in postmortem tissues from a cancer research autopsy program. *Oncotarget*. 2016;7(41):66906. DOI: 10.18632/oncotarget.11836.
- White K., Yang P., Li L., Farshori A., Medina A.E., Zielke H.R. Effect of postmortem interval and years in storage on RNA quality of tissue at a repository of the NIH NeuroBio-Bank. *Biopreservation and Biobanking*. 2018;16(2):148–157. DOI: 10.1089/bio.2017.0099.
- Van der Linden A., Blokker B.M., Kap M., Weustink A.C., Riegman P.H., Oosterhuis J.W. Post-mortem tissue biopsies obtained at minimally invasive autopsy: an RNA-quality analysis. *PLoS One*. 2014;9(12):e115675. DOI: 10.1371/journal.pone.0115675.
- Miyahara K., Hino M., Yu Z., Ono C., Nagaoka A., Hatano M. et al. The influence of tissue pH and RNA integrity number on gene expression of human postmortem brain. *Frontiers in Psychiatry*. 2023;14:1156524. DOI: 10.3389/fpsy.2023.1156524.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45–45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45/
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*. 2006;7:1–14. DOI: 10.1186/1471-2199-7-3.
- Thompson K.L., Pine P.S., Rosenzweig B.A., Turpaz Y., Retief J. Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. *BMC Biotechnology*. 2007;7:1–12. DOI: 10.1186/1472-6750-7-57.
- Weickert C.S., Sheedy D., Rothmond D.A., Dedova I., Fung S., Garrick T. et al. Selection of reference gene expression in a schizophrenia brain cohort. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2010;44(1):59–70. DOI: 10.3109/00048670903393662.
- Hostiuc S., Rusu M.C., Mănoiu V.S., Vrapciu A.D., Negoii I., Popescu M.V. Usefulness of ultrastructure studies for the estimation of the postmortem interval. A systematic review. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2017;58(2):377–384.
- Kvastad L., Carlberg K., Larsson L., Villacampa E.G., Stuckey A., Stenbeck L. et al. The spatial RNA integrity number assay for in situ evaluation of transcriptome quality. *Communications Biology*. 2021;4(1):57. DOI: 10.1038/s42003-020-01573-1.
- Vennemann M., Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: possibilities and limitations. *Forensic Science International*. 2010;203(1-3):71–75. DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.07.006.
- Stan A.D., Ghose S., Gao X.M., Roberts R.C., Lewis-Amezquita K., Hatanpaa K.J. et al. Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Research*. 2006;1123(1):1–11. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.09.025.
- Sobue S., Sakata K., Sekijima Y., Qiao S., Murate T., Ichihara M. Characterization of gene expression profiling of

- mouse tissues obtained during the postmortem interval. *Experimental and Molecular Pathology*. 2016;100(3):482–492. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.05.007.
21. Heimberger A.B., Crotty L.E., Archer G.E., McLendon R.E., Friedman A., Dranoff G. et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor homogenate induce immunity against syngeneic intracerebral glioma. *Journal of Neuroimmunology*. 2020;103(1):16–25. DOI: 10.1016/s0165-5728(99)00172-1.
22. Padhi B.K., Singh M., Rosales M., Pelletier G., Cakmak S. A PCR-based quantitative assay for the evaluation of mRNA integrity in rat samples. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2018;15:18–23. DOI: 10.1016/j.bdq.2018.02.001.
23. Fleige S., Pfaffl M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):126–139. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003.

Вклад авторов

Буйко Е.Е. – анализ литературы, получение и интерпретация экспериментальных данных, написание текста статьи. Перина Е.А. – определение динамических изменений целостности РНК, написание текста статьи. Васильченко Д.В. – проведение гистологического исследования. Цыденова И.А. – молекулярно-биологическое исследование. Хмелевская Е.С. – сбор биообразцов. Уфандеев А.А. – статистическая обработка данных. Кайдаш О.А. – организация сбора биообразцов для комплексной оценки параметров молекулярно-биологического исследования. Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна исследования, координация выполнения исследования, написание текста статьи, окончательное утверждение содержания для публикации рукописи. Вторушин С.В. – выполнение экспериментальной части исследования, анализ и интерпретация данных. Удут Е.В. – координация выполнения исследования, окончательное утверждение содержания для публикации рукописи.

Информация об авторах

Буйко Евгений Евгеньевич – мл. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, buykoevgen@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6714-1938>

Перина Екатерина Александровна – мл. науч. сотрудник, Центр доклинических исследований, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, catherineperina@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-4273-8228>

Васильченко Дмитрий Владимирович – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, vasilchenkodmitry1991@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-9780-0770>

Цыденова Ирина Александровна – лаборант, Центр доклинических исследований, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, tsydenova422@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2716-3075>

Хмелевская Екатерина Сергеевна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, Центр биологических исследований и биоинженерии, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, kat.hmelevsk@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-1776-4149>

Уфандеев Александр Анатольевич – мл. науч. сотрудник, Центр доклинических исследований, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, ufandeev@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3837-1179>

Кайдаш Ольга Александровна – ст. науч. сотрудник, Центр доклинических исследований, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, kaidash_2011@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8761-7537>

Иванов Владимир Владимирович – канд. биол. наук, доцент, руководитель Центра доклинических исследований, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, ivanovvv1953@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3326-729X>

Вторушин Сергей Владимирович – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск, vtorushin.sv@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

Удут Елена Владимировна – д-р мед. наук, профессор РАН, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией, СибГМУ, г. Томск, udut.ev@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6104-4782>

✉ Буйко Евгений Евгеньевич, buykoevgen@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.05.2024;
одобрена после рецензирования 19.08.2024;
принята к публикации 12.09.2024