

ГЕПАРИНАЗА УСТРАНЯЕТ ГЕПАРИН-АССОЦИИРОВАННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ТКАНЯХ ЛЕГКИХ

Вахрушев Н. С.¹, Шиленко Л. А.¹, Черваев А. А.¹, Карпов А. А.^{1,2},
Галагудза М. М.¹, Костарева А. А.¹, Калинина О. В.^{1,3}

Контактная информация:

Вахрушев Никита Сергеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: drabrikos@gmail.com

Статья поступила в редакцию
11.01.2024, принята к печати 25.03.2024.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»
имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-
Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. При изучении патологий часто используют гистологические и молекулярно-генетические методы исследования. Для предотвращения загрязнения элементами крови гистологических препаратов проводят перфузию микроциркуляторного русла раствором гепарина, что ведет к его накоплению в ткани образца. Известно, что гепарин является ингибитором полимеразной цепной реакции (ПЦР) за счет блокирования сайтов связывания ДНК-полимеразы с ДНК-мишенью. **Цель.** Изучить возможность предотвращения влияния нефракционированного гепарина (НФГ), используемого при перфузии органов, на результат оценки уровня экспрессии генов в образцах легких крыс методом ОТ-ПЦР за счет предварительной обработки гепариназой препаратов РНК. **Материалы и методы.** Перфузию сосудистого русла крыс проводили НФГ в концентрациях 50 МЕ/мл ($n = 3$) и 500 МЕ/мл ($n = 3$) либо раствором хлорида натрия ($n = 3$) в качестве контроля. Тотальную РНК выделяли из образцов левого легкого крыс, после чего обрабатывали гепариназой. Оценку уровня относительной экспрессии пяти генов: s18, HPRT, Actin β , GAPDH, Vim до и после обработки гепариназой препаратов выделенной РНК проводили на основе абсолютного значения порогового цикла (Ct), полученного методом ОТ-ПЦР. **Результаты.** Данные показали, что НФГ повышает уровень порогового цикла в ОТ-ПЦР. Обработка образцов гепариназой не оказывает воздействие на количество и качество РНК, при этом статистически значительно снижает уровень порогового цикла по сравнению с необработанными гепариназой образцами. **Заключение.** При планировании исследования необходимо учитывать искажения результатов генетического исследования, возникающие из-за перфузии органа раствором гепарина. Использование гепариназы эффективно устраняет гепарин-ассоциированное ингибирование ОТ-ПЦР, не влияя на качество и количество исходной РНК.

Ключевые слова: гепарин, ОТ-ПЦР, перфузия тканей, РНК.

Для цитирования: Вахрушев Н.С., Шиленко Л.А., Черваев А.А. и др. Гепариназа устраняет гепарин-ассоциированное ингибирование полимеразной цепной реакции в реальном времени при оценке экспрессии генов в тканях легких. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 55-64. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-55-64. EDN: CFKQDB

HEPARINASE ELIMINATES HEPARIN-ASSOCIATED INHIBITION OF THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION WHEN ASSESSING GENE EXPRESSION IN LUNG TISSUE

Nikita S. Vachrushev¹, Leonid A. Shilenko¹,
Al-Khalim A. Chervaev¹, Andrei A. Karpov^{1,2},
Michael M. Galagudza¹, Anna A. Kostareva¹, Olga V. Kalinina^{1,3}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Nikita S. Vachrushev,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: drabrikos@gmail.com

Received 11 January 2024; accepted
25 March 2024.

Abstract

Background. Histological and genetic methods are often used in the study of pathologies. To prevent contamination of histological preparations with blood, the microvasculature is perfused with a heparin, which leads to its accumulation in the tissue. Heparin is an inhibitor of the polymerase chain reaction (PCR). **Objective.** To study the possibility of preventing the influence of unfractionated heparin (UFH), used in perfusion, on the result of gene expression in rat lung samples using RT-PCR by pretreatment RNA with heparinase. **Design and methods.** Perfusion of the rats' vasculature was performed with UFH at concentrations of 50 IU/mL (n = 3) and 500 IU/mL (n = 3), or with a sodium chloride (n = 3) as a control. RNA was isolated from left lung samples and treated with heparinase. The relative expression of five genes (s18, HPRT, Actin β , GAPDH, Vim) before and after heparinase treatment of isolated RNA preparations was assessed based on the absolute value of the threshold cycle (Ct) obtained by RT-PCR. **Results.** UFH increases the threshold cycle level. Treatment of samples with heparinase does not affect the quantity and quality of RNA, but reduce the Ct compared to samples not treated with heparinase. **Conclusion.** While planning a study, it is necessary to consider alterations in the results of genetic research that arise due to organ perfusion with a heparin solution. The use of heparinase effectively eliminates heparin-associated RT-PCR inhibition.

Key words: heparin, RNA, RT-PCR, tissue perfusion.

For citation: Vachrushev NS, Shilenko LA, Chervaev AA, et al. Heparinase eliminates heparin-associated inhibition of the real-time polymerase chain reaction when assessing gene expression in lung tissue. Translational Medicine. 2024; 11(1): 55-64. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-55-64. EDN: CFKQDB

Список сокращений: НФГ — нефракционированный гепарин, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ОТ-ПЦР — ПЦР с обратной транскрипцией, Ct — пороговый цикл.

Введение

За последние десятилетия полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая амплифицировать определенный фрагмент ДНК, стала одним из основных инструментов в медико-биологических исследованиях. Изобретатель ПЦР Кэрри Мюллис сказал: «ПЦР позволяет вам выбрать фрагмент ДНК, который вас интересует, и иметь столько, сколько вы хотите» [1]. Полимеразная цепная реакция включает три этапа: денатурацию двойной спирали ДНК, присоединение (отжиг) специфических праймеров и элонгацию (синтез дочерней цепи ДНК), которая обеспечивается 3'-5' активностью фермента термостабильной ДНК-полимеразы. На эффективность ПЦР влияют многие факторы, в частности ингибирование ДНК-полимеразы за счет снижения ее активности или полного ее разрушения [2], что приводит к ошибкам в оценке абсолютного и относительного количества целевой матрицы. Гепарин, представляющий собой полисахарид семейства гликозамингликанов, широко используемый в клинической практике как антикоагулянтное средство прямого действия, является одним из ингибиторов ПЦР [3]. Молекулярный механизм ингибирования ПЦР гепарином точно не установлен. Показано, что он влияет на процесс элонгации в цикле ПЦР, а также на процесс обратной транскрипции, при котором происходит синтез кДНК на матрице РНК [4]. Предположительно, гепарин за счет отрицательного заряда, обусловленного наличием сульфатных и карбоксильных групп, взаимодействует с положительно заряженными молекулами магния, образующими комплекс с ДНК-полимеразой, тем самым снижая или полностью блокируя функционирование ДНК-полимеразы [5]. Была показана линейная зависимость между концентрацией гепарина и степенью ингибирования ПЦР, что подтверждает наличие конкуренции гепарина с ионами магния за субстрат [6].

Достоверно установлено, что присутствие гепарина в пробирках для взятия образцов периферической крови [7] или в образцах периферической крови пациентов, которым системно вводили гепарин [8], ингибирует ПЦР. Более того, системное введение гепарина оказывает негативное влияние на результат ПЦР, проводимой на ДНК/РНК, выделенной не только из образцов крови или плазмы, но и из различных органов.

Х. Н. Ваи и соавторы (2000 г.) [9], изучая экспрессию цитокинов при трансплантации легких у крыс, обнаружили, что системное введение гепарина ингибирует ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и снижает экспрессию гена *Actinβ* в образцах легких при исследовании продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. Гепарин сохраняется в образцах при выделении нуклеиновых кислот даже методом фенол-хлороформной экстракции, более того, ни повторная преципитация этанолом, ни сдвиг pH не могут этого предотвратить [10]. Рядом авторов было предложено для устранения или снижения ингибирования ПЦР гепарином использовать ДНК-полимеразы, устойчивые к гепарину [11], или предварительно обработать образцы ферментом *heparinase I* (гепариназа) [12]. Гепариназа является эндо-β-D-глюкуронидазой, которая разрушает гликозидные связи между уроновой кислотой и ацетил-глюкозаминном, составляющими основную структуру молекулы гепарина. Гидролиз гликозидных связей гепарина приводит к образованию более коротких фрагментов, которые теряют способность к ингибированию ПЦР. Кроме того, в протокол пробоподготовки материала для гистологического исследования часто входит использование раствора гепарина для предотвращения загрязнения препарата эритроцитами и сгустками тромбов. Если сосудистые структуры являются важной составной частью исследования, перфузия гепарином обеспечивает свободное прохождение растворов фиксаторов и других обрабатывающих веществ по сосудам и капиллярам, что дает более точные данные о микроциркуляции [13]. Ярким примером этого служит подготовка ткани легкого для гистологического анализа при изучении различных форм легочной гипертензии [14, 15].

Цель данной работы — проанализировать влияние нефракционированного гепарина, используемого при перфузии малого круга кровообращения крыс, на результат оценки уровня экспрессии генов *s18*, *HPRT*, *Actinβ*, *GAPDH*, *Vim* в образцах легких крыс методом ОТ-ПЦР.

Материал и методы исследования

Животные

В работе использованы 9 крыс-самцов породы Wistar конвенциональной категории массой 224 ± 30 г. Все животные содержались в стандартных условиях, имели доступ к полнорационному гранулированному корму и воде *ad libitum*. Эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального

института здоровья, 8-е изд., 2011 г.). Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Минздрава России (протокол № Rats-05.2022-5 от 23.05.2022).

Раствор гепарина

В эксперименте для отмывки сосудистого русла легких использовался нефракционированный гепарин (НФГ) в двух концентрациях: низкой (50 МЕ/мл) и высокой (500 МЕ/мл). Указанные растворы были получены из коммерческого реагента НФГ 5000 МЕ/мл (B Braun, Германия) путем добавления соответствующего объема 0,9 % раствора хлорида натрия (NaCl).

Протокол эксперимента

Были сформированы следующие группы:

Контроль (n = 3) — перфузию сосудистого русла легких проводили 10 мл 0,9 % раствора NaCl;

НФГ 50 (n = 3) — перфузию сосудистого русла легких проводили 10 мл раствора НФГ в концентрации 50 МЕ/мл;

НФГ 500 (n = 3) — перфузию сосудистого русла легких проводили 10 мл раствора НФГ в концентрации 500 МЕ/мл.

В ходе проведения эксперимента животным в качестве наркоза внутримышечно вводили Золетил 100 (Virbac, Франция) и Ксилазин 2 % (Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды). Крысы размещались на подогреваемом столике (TCAT-2LV controller, Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, США) в положении на спине и получали искусственную вентиляцию легких через интубацию трахеи с помощью аппарата искусственной вентиляции легких SAR — 830/AP (CWE Inc., США). После вскрытия грудной клет-

ки нижнюю полую вену пересекали на уровне диафрагмы со стороны грудной клетки с одновременной пункцией правого желудочка (ПЖ) кубитальным катетером Vasofix Certo 20G (B Braun, Германия), через который перфузировали сосудистое русло раствором гепарина в разных концентрациях или 0,9 % раствором NaCl. После завершения процедуры отмывки сосудистого русла легких выполняли эвтаназию животного с помощью введения в левый желудочек сердца 10 % хлорида калия с последующим изъятием левого легкого для молекулярно-генетического анализа. Извлеченное левое легкое фрагментировали и мгновенно замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при –80 °С.

Выделение тотальной РНК

К замороженным образцам ткани легкого добавляли Extract RNA reagent (Evrogen), после чего образцы подвергали гомогенизации на аппарате TissueLyzer (QIAGEN) в течение 5 минут при частоте 50 Гц. Далее выделение РНК проводили согласно инструкции производителя. После отмывки 70 % спиртом подсушенный осадок растворяли в 20 мкл воды. Количество и чистоту выделенной РНК оценивали с использованием NanoDrop 3300 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Качество РНК оценивали на основании электрофореза в агарозном геле.

Обработка гепариназой

Обработку гепариназой препаратов РНК, выделенной из образцов легких крыс, проводили, используя протокол, описанный Кондратовым и соавторами [16]. Предварительно концентрацию РНК во всех образцах нормировали MQ водой до 1000 нг/мкл. Далее 7,5 мкл образца РНК в концентрации 1000 нг/мкл смешивали с 7,5 мкл

Таблица 1. Последовательность праймеров

Table 1. Primer sequences

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
Vim	TGCCAACCGGAACAACGAT	ACTGCACCTGTCTCCGGTA
HPRT	GTCCCAGCGTCGTGATTAGT	CTTGCCGCTGTCTTTTAGGC
Prs18	CGCCATGTCCCTAGTGATCC	ACTTCCCATCCTTCACGTCC
Actinβ	CCCGCGAGTACAACCTTCTT	AACACAGCCTGGATGGCTAC
GAPDH	CGGTGTGAACGGATTTGGC	TTGAGGTCAATGAAGGGGTCG

рабочего раствора гепариназы (0,084 МЕ/мкл Heparinase I (Sigma-Aldrich), 0,5 МЕ/мкл Rnase Inhibitor (Thermo Fisher), 10 ммоль/л Tris HCl pH 7,5, 2 ммоль/л CaCl₂, 25 ммоль/л NaCl), инкубировали в течение 3 часов при 25 °С, охлаждали и хранили при –80 °С. Качество целостности обработанной гепариназой РНК оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле на основании фрагментов РНК, соответствующих S18 и S28.

Оценка относительной экспрессии генов

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных олигонуклеотидных праймеров Random (dN)10-primer (Evrogen) и фермента MMLV RT kit (Evrogen). Экспрессию генов оценивали на основе значения Ct для каждого гена: s18, HPRT, Actin β , GAPDH, Vim. ПЦР в режиме реального времени осуществляли со специфическими праймерами для каждого гена (табл. 1) и набором реагентов SybrGreen Low ROX (Evrogen) на приборе Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System при следующих условиях: 10 мин. при 95 °С, 15 сек. при 95 °С и 1 мин. при 60 °С.

Статистический анализ

Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения R 4.2.2. Факторы, влияющие на уровень порогового цикла (Ct), определяли на основании трехфакторного дисперсионного анализа с фиксированием случайного эффекта для каждого образца. Для оценки статистически достоверной разницы между группами использовали Т-критерий Стьюдента с поправкой Бонферони. Данные представляли в виде медианы (Me) с указанием межквартильного интервала (25–75 %).

Результаты

Количество выделенной РНК статистически значимо не отличалось между группами независимо от концентрации гепарина, используемого при перфузии сосудов легких крыс (рис. 1). Спектральный анализ, выполненный с использованием NanoDrop 3300 SpectroPhotometer, свидетельствовал об отсутствии примесей во всех образцах выделенной РНК. Независимо от концентрации гепарина, используемого для перфузии легких, и обработки гепариназой во всех образцах легких

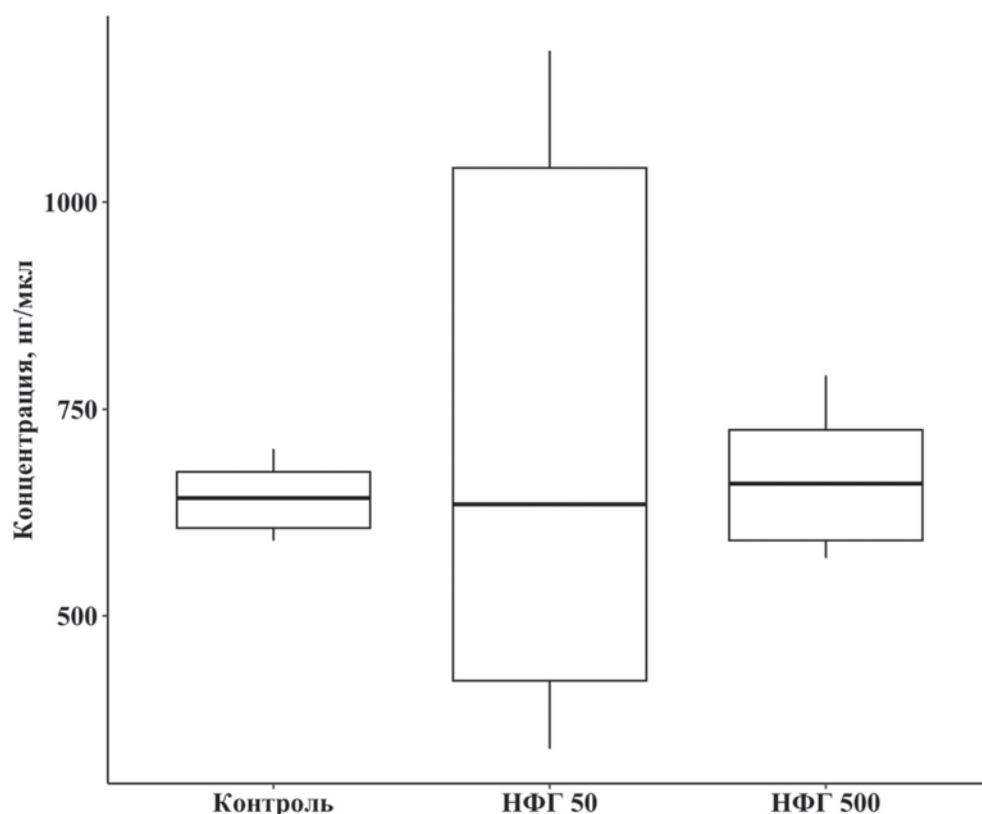


Рис. 1. Концентрация РНК, выделенной из образцов легких крыс после перфузии изотоническим раствором хлорида натрия (контроль), 1 % (НФГ 50) или 10 % (НФГ 500) раствором гепарина

Figure 1. Concentration of RNA isolated from rat lung samples after perfusion with isotonic sodium chloride solution (control), 1 % (UFH 50) or 10 % (UFH 500) heparin solution

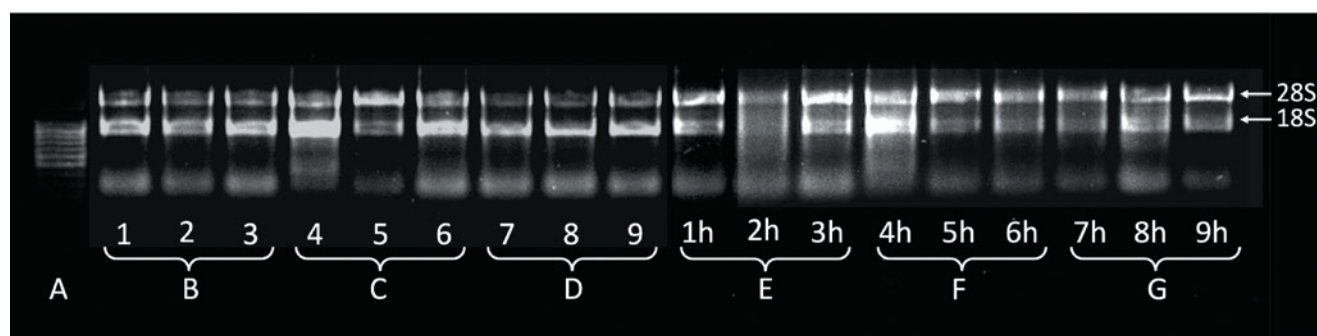


Рис. 2. Электрофореграмма образцов РНК, выделенных из ткани легких крыс, в агарозном геле

Верхние бэнды соответствуют 28S РНК (4,5 кб), нижние бэнды соответствуют 18S РНК (1,9 кб). А — молекулярный маркер. В и Е — легкие перфузировались изотоническим раствором хлорида натрия. С и F — легкие перфузировались 1 % раствором гепарина. D и G — легкие перфузировались 10 % раствором гепарина. В, С, D — группы, необработанные гепариназой. Е, F, G — группы, обработанные гепариназой. Номера образцов до обработки гепариназой: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и после: 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h.

Figure 2. Electropherogram of RNA samples isolated from rat lung tissue in agarose gel

The upper bands correspond to 28S RNA (4.5 kb), the lower bands correspond to 18S RNA (1.9 kb). A — molecular marker. B and E — the lungs were perfused with isotonic sodium chloride solution. C and F — lungs were perfused with 1% heparin solution. D and G — the lungs were perfused with 10 % heparin solution. B, C, D — groups not treated with heparinase. E, F, G — groups treated with heparinase. Sample numbers before treatment with heparinase: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and after: 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h.

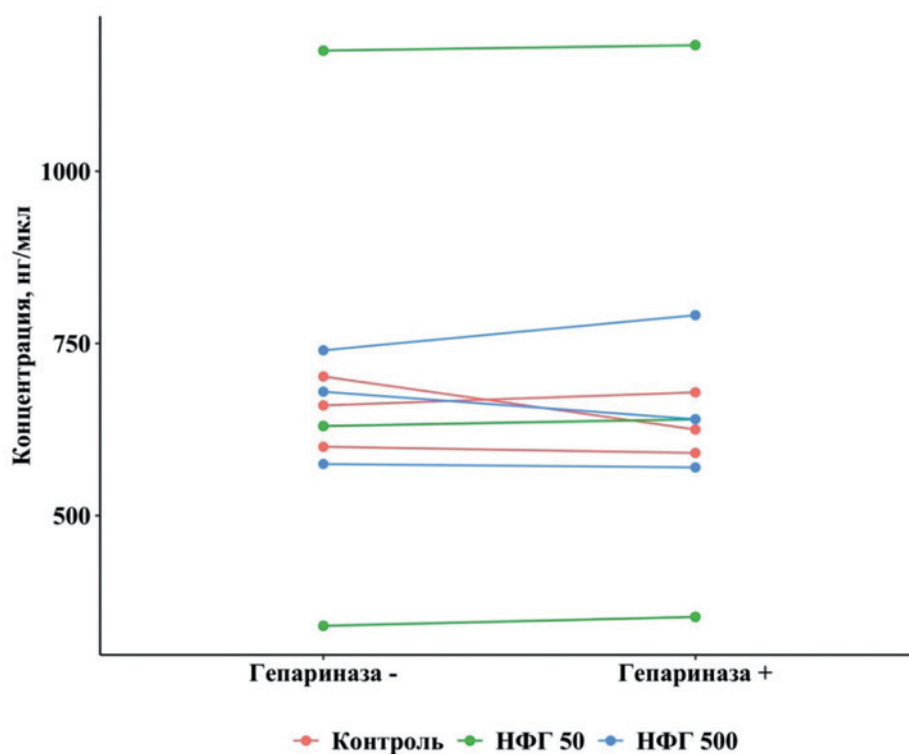


Рис. 3. Концентрация РНК нг/мкл в зависимости от обработки препаратов гепариназой

Figure 3. RNA concentration ng/μl depending on the treatment with heparinase

крыс присутствовали два пула РНК, по электрофореграмме соответствующих 28S и 18S рибосомальной РНК (рис. 2). Обработка гепариназой статистически значимо не влияла на концентрацию РНК в образцах легких крыс во всех исследуемых группах (рис. 3).

Обработка гепариназой образцов выделенной РНК статистически значимо влияла на уровень порогового цикла в обеих экспериментальных группах, в которых перфузию сосудов легких проводили 1 % или 10 % раствором гепарина (рис. 4С и 4В). В то же время разницы между уровнем Ct в зависимости от обработки гепариназой РНК, выделенной из образцов контрольной группы, в которой перфузию легких проводили изотоническим раствором хлорида натрия, не наблюдалось (рис. 4А).

Анализ значений порогового цикла ОТ-ПЦР показал, что изменение уровня Ct из-за ингибирующего воздействия гепарина на ОТ-ПЦР отлича-

лось для каждого исследуемого гена (рис. 5). Для двух, s18 (p-value = 0,031) и HPRT (p-value = 0,034), из пяти анализируемых генов установлена статистически значимая разница изменения уровня Ct в зависимости от обработки гепариназой препаратов РНК, выделенной из образцов легких крыс после перфузии 10 % раствором гепарина. В образцах легких крыс после перфузии 1 % раствором гепарина отмечена тенденция на снижение уровня Ct для тех же генов s18 (p-value = 0,139) и HPRT (p-value = 0,324) в зависимости от обработки гепариназой препаратов РНК, однако статистически значимой разницы не обнаружено.

Полученные результаты позволили выявить статистически значимые факторы, влияющие на уровень порогового цикла ОТ-ПЦР: обработка гепариназой (p-value < 0,0000), экспрессия определенного гена (p-value < 0,0000), а также обработка гепариназой в зависимости от концентрации гепарина при перфузии легких (p-value < 0,0000). Ис-

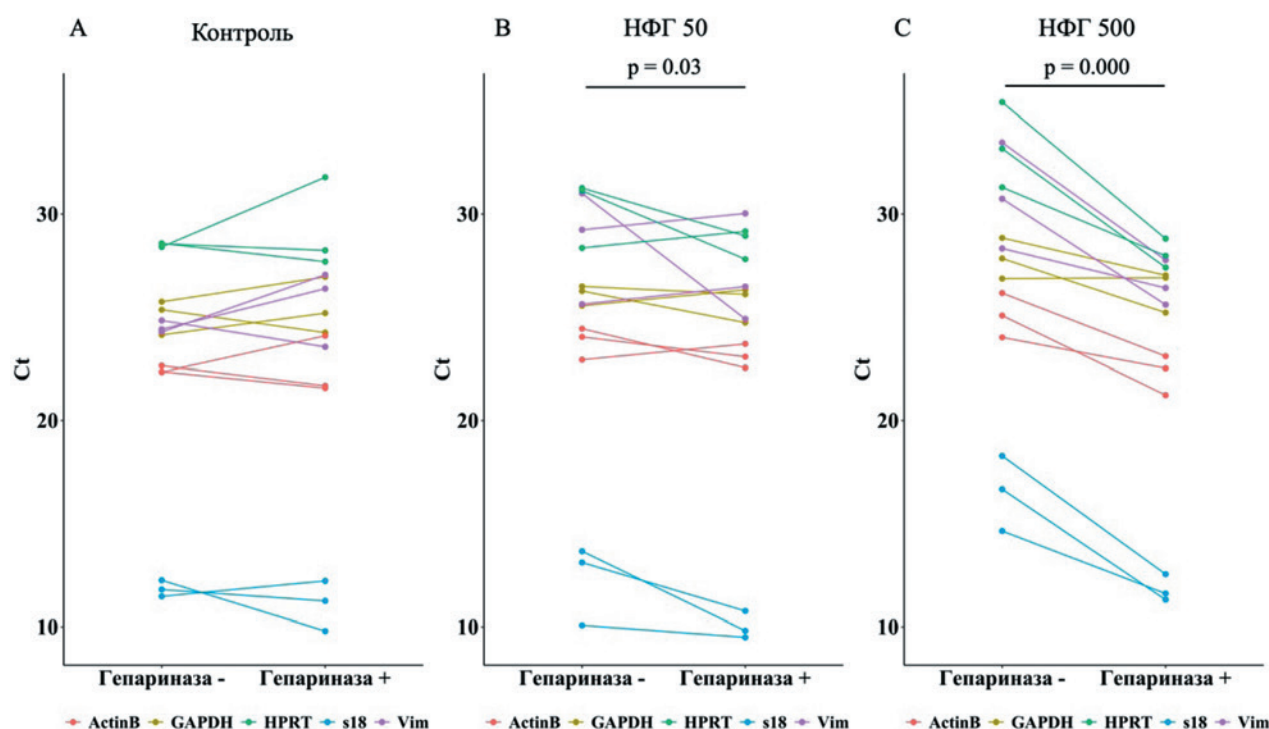


Рис. 4. Изменение абсолютного значения пороговых циклов ОТ-ПЦР в каждой исследуемой группе в зависимости от раствора, использованного для перфузии легких крыс, и последующей обработки гепариназой препаратов выделенной РНК. А — перфузия легких изотоническим раствором хлорида натрия (контроль), В — перфузия легких 1 % раствором гепарина (НФГ50), С — перфузия легких 10 % раствором гепарина (НФГ500).

Figure 4. Change in the absolute value of RT-PCR threshold cycles in each study group depending on the solution used for perfusion of rat lungs and subsequent treatment of isolated RNA with heparinase. А — perfusion of the lungs with isotonic sodium chloride solution (control), В — perfusion of the lungs with 1 % heparin solution (UFH50), С — perfusion of the lungs with 10 % heparin solution (UFH500).

пользование гепарина для перфузии легких приводило к увеличению уровня порогового цикла.

Обсуждение

В настоящее время в биомедицинских исследованиях одновременно используется множество способов анализа изучаемых явлений. Комплексный подход, включающий в себя молекулярно-генетический анализ методом ПЦР, функциональное тестирование, гистологическое исследование и т. д., нередко встречается в рамках одного исследования. При планировании исследований важно учитывать возможное негативное влияние раствора гепарина, используемого в клинических целях или при заборе биологических образцов, на получение

достоверных результатов молекулярно-генетическими методами, в частности ОТ-ПЦР. Так, перфузия трансплантата раствором гепарина широко используется при трансплантации легких [17], что должно быть учтено при последующих молекулярно-генетических исследованиях. Интраназальные инъекции раствора гепарина, в качестве терапевтического агента, применяют при различных инфекционных заболеваниях, что может влиять на выявление генома возбудителя методом ПЦР [18].

Несмотря на то, что уже давно известно об ингибирующем эффекте гепарина на результаты ПЦР, до сих пор постоянно продолжают разрабатываться новые способы его деградации в биологических образцах [19]. Следует отметить, что

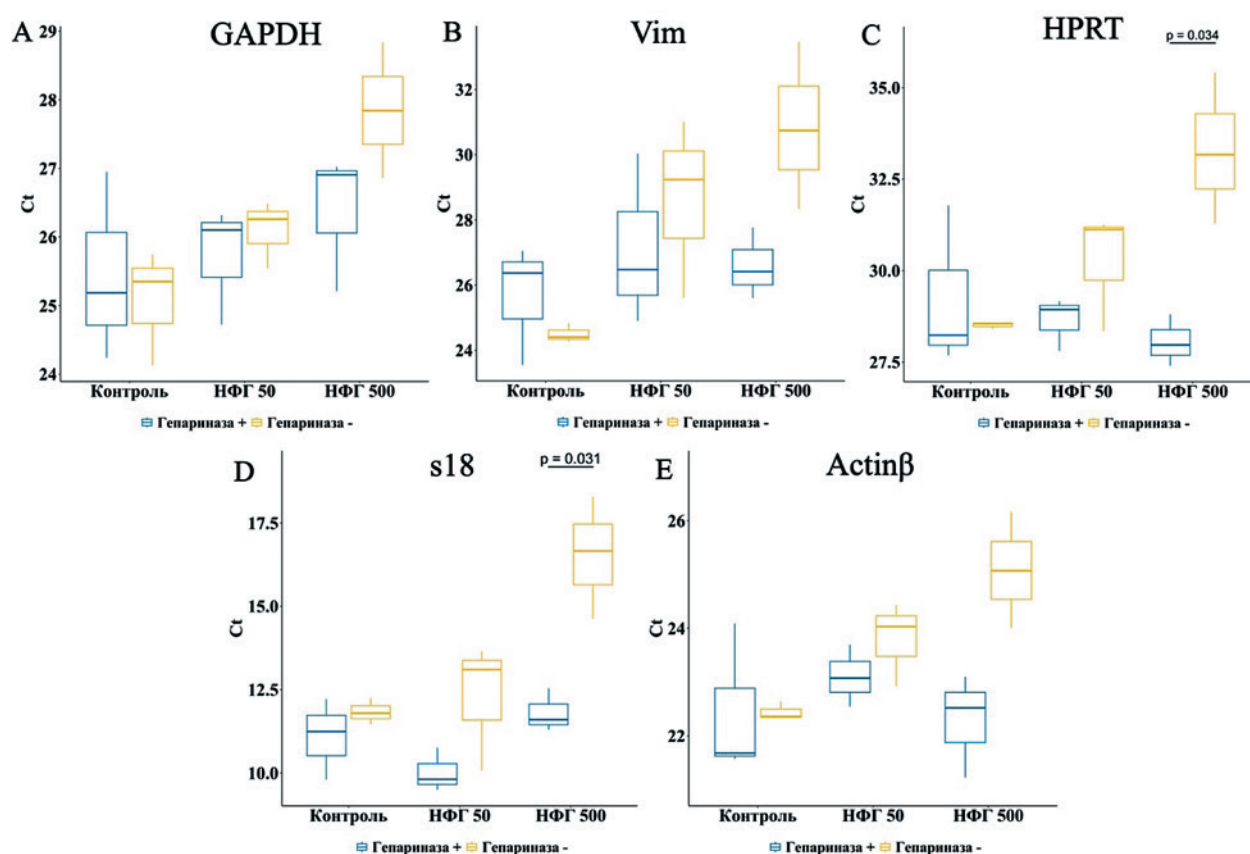


Рис. 5. Изменение абсолютного значения порогового цикла ОТ-ПЦР для каждого анализируемого гена GAPDH (A), Vim (B), HPRT (C), s18 (D), Actinβ (E) в зависимости от раствора, использованного для перфузии легких крыс, и последующей обработки гепариназой препаратов выделенной РНК. Контроль — перфузия легких изотоническим раствором хлорида натрия, НФГ50 — перфузия легких 1 % раствором гепарина, НФГ500 — перфузия легких 10 % раствором гепарина.

Figure 5. Change in the absolute value of the RT-PCR threshold cycle for each analyzed gene GAPDH (A), Vim (B), HPRT (C), s18 (D), Actinβ (E) depending on the solution used for perfusion of rat lungs and subsequent treatment of isolated RNA with heparinase. Control — perfusion of the lungs with isotonic sodium chloride solution, UFH50 — perfusion of the lungs with 1 % heparin solution, UFH 500 — perfusion of the lungs with 10 % heparin solution.

помимо гепарина есть целый ряд соединений, которые искажают результаты ПЦР, в частности гемоглобин, иммуноглобулин G и лактоферрин [20], что указывает на важность преаналитического этапа исследования, необходимость оценки потенциального ингибирующего эффекта соединений на результаты молекулярно-генетического анализа и способов их устранения.

В данной работе мы продемонстрировали, что перфузия тканей раствором гепарина для очистки сосудистого русла от форменных элементов крови, являющаяся необходимым этапом подготовки образцов к гистологическому исследованию, негативно влияет на результаты последующего молекулярно-генетического исследования методом ОТ-ПЦР. При этом обработка гепариной препаратов выделенной РНК позволяет предотвратить ингибирующий эффект гепарина на результаты ОТ-ПЦР. Мы показали, что обработка образцов РНК раствором гепарины в течение трех часов не повреждает РНК и не влияет на ее качество и количество. Это согласуется с наблюдениями других авторов, исследовавших влияние гепарины на целостность как общей РНК, так и микроРНК [9, 16].

Снижение порогового цикла при обработке гепариной препаратов РНК в обеих экспериментальных группах НФГ500 и НФГ50 было статистически значимо по сравнению с исходными препаратами РНК, соответственно. Полученные результаты свидетельствовали о дозозависимом ингибировании ОТ-ПЦР гепарином.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка гепариной препаратов выделенной РНК перед проведением молекулярно-генетических исследований, основанных на методе ПЦР, устраняет ингибирующий эффект гепарина, который необходимо учитывать независимо от способа его контакта с биообразцом: системное введение в организм, перфузия раствором гепарина микроциркуляторного русла на этапе гистологического исследования или хранение биообразца в контейнерах, содержащих гепарин.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10122, <https://rscf.ru/project/23-75-10122> / The research was

carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-75-10122, <https://rscf.ru/project/23-75-10122>

Список литературы / References

1. Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am.* 1990; 262(4):56–65. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56.
2. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012; 113(5):1014–26. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
3. Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST. Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals.* 2016; 9(3):38. DOI: 10.3390/ph9030038.
4. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, et al. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal.* 1999; 13(3):133–40. DOI: 10.1002/(sici)1098-2825(1999)13:3<133::aid-jcla8>3.0.co;2-0.
5. Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *The Lancet.* 1994; 343(8911):1509–10. DOI: 10.1016/s0140-6736(94)92622-0.
6. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(2):485–93. DOI: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001.
7. Vaughan-Shaw PG, Walker M, Ooi L, et al. A simple method to overcome the inhibitory effect of heparin on DNA amplification. *Cell Oncol.* 2015; 38(6):493–5. DOI: 10.1007/s13402-015-0250-8.
8. Coelho-Lima J, Mohammed A, Cormack S, et al. Overcoming Heparin-Associated RT-qPCR Inhibition and Normalization Issues for microRNA Quantification in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Thromb Haemost.* 2018; 118(07):1257–69. DOI: 10.1055/s-0038-1660437.
9. Bai X hui, Fischer S, Keshavjee S, et al. Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transpl Int.* 2000; 13(2):146–50. DOI: 10.1007/s001470050306.
10. Jung R, Lübcke C, Wagener C, et al. Reversal of RT-PCR Inhibition Observed in Heparinized Clinical Specimens. *BioTechniques.* 1997; 23(1):24–8. DOI: 10.2144/97231bm03.
11. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, et al. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(5):e40–e40. DOI: 10.1093/nar/gkn1055.
12. Izreli S, Pfeleiderer C, Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(21):6051–6051. DOI: 10.1093/nar/19.21.6051.

13. Davenport ML, Sherrill TP, Blackwell TS, et al. Perfusion and Inflation of the Mouse Lung for Tumor Histology. *J Vis Exp*. 2020; (162):10.3791/60605. DOI: 10.3791/60605.

14. Steffes LC, Kumar ME. Chronic Daily House Dust Mite Exposure in Mice is an Effective Model to Quantify the Effect of Pharmacologic Agents on Discrete Stages of Artery Remodeling in Pulmonary Hypertension. *Bio Protoc*. 2022; 12(1):e4273. DOI: 10.21769/BioProtoc.4273.

15. Karpov AA, Vachrushev NS, Shilenko LA, et al. Sympathetic Denervation and Pharmacological Stimulation of Parasympathetic Nervous System Prevent Pulmonary Vascular Bed Remodeling in Rat Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2023; 10(2):40. DOI: 10.3390/jcdd10020040.

16. Kondratov K, Kurapeev D, Popov M, et al. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol Detect Quantif*. 2016; 8:9–14. DOI: 10.1016/j.bdq.2016.03.001.

17. Gao P, Li C, Ning Y, et al. Improvement of surgical techniques for orthotopic single lung transplantation in rats. *Ann Transl Med*. 2022; 10(12):673. DOI: 10.21037/atm-22-2018.

18. Lee LYY, Suryadinata R, McCafferty C, et al. Heparin Inhibits SARS-CoV-2 Replication in Human Nasal Epithelial Cells. *Viruses*. 2022 24; 14(12):2620. DOI: 10.3390/v14122620.

19. Alinezhad P, Staji H, Sani RN. Comparison of three methods including temperature, H₂O₂/ascorbic acid/sonication, and nitrous acid treatments for overcoming the inhibitory effect of heparin on DNA amplification in realtime-PCR. *Int J Biol Macromol*. 2022; 209:1298–1306. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.113.

20. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*. 2020; 412(9):2009–2023. DOI: 10.1007/s00216-020-02490-2

Информация об авторах:

Вахрушев Никита Сергеевич, аспирант кафедры клеточной биологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шиленко Леонид Алексеевич, ординатор 1 года кафедры факультетской терапии с клиникой, лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Черваев Аль-Халим Амирович, ординатор 1 года кафедры нейрохирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Карпов Андрей Александрович, к.м.н., заведующий НИЛ патологии малого круга кровообращения, доцент кафедры патологии Института медицинского образо-

вания ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник отдела «Технологии сильного искусственного интеллекта в физиологии и медицине» СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., профессор и член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины, заведующий кафедрой патологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, д.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Калинина Ольга Викторовна, д.б.н., профессор кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Nikita S. Vachrushev, PhD student of the Department of Cellular Biology, Almazov National Medical Research Centre;

Leonid A. Shilenko, first-year resident of the Department of Faculty Therapy with a clinic, Laboratory Assistant of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre;

Al-Khalim A. Chervaev, first-year resident of the Department of Neurosurgery, Almazov National Medical Research Centre;

Andrei A. Karpov, PhD, Head of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Associate Professor of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher of the Department of “Strong Artificial Intelligence Technologies in Physiology and Medicine”, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”;

Michael M. Galagudza, MD, DSc, Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director of Institute of Experimental Medicine, Head of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, DSc in Medicine, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Olga V. Kalinina, DSc in Biology, Professor of the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.