



<https://doi.org/10.24060/2076-3093-2020-10-2-108-114>

Экстракция некодирующих РНК из студенистого ядра межпозвоночного диска с последующим профилированием их экспрессии

Гареев Ильгиз Фанилевич — кафедра онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии ИДПО, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, orcid.org/0000-0002-4965-0835

Бейлерли Озал Арзуман оглы — кафедра онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии ИДПО, e-mail: obeyletli@mail.ru, orcid.org/0000-0002-6149-5460

Гуанг Янг — PhD, кафедра нейрохирургии, e-mail: yang-guang1227@163.com, orcid.org/0000-0002-7173-1914

Даминг Жанг — PhD, кафедра нейрохирургии, e-mail: dr_daming_zhang@163.com

И.Ф. Гареев¹, О.А. Бейлерли¹, Г. Янг^{2,3}, Д. Жанг^{2,3}

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

² Первый аффилированный госпиталь Харбинского медицинского университета, Китай, провинция Хэйлунцзян, Харбин

³ Институт мозга Харбинского медицинского университета, Китай, провинция Хэйлунцзян, Харбин

Контакты: Гареев Ильгиз Фанилевич, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru

Аннотация

Введение. Существует множество протоколов выделения тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК) и ее фракций, таких как микро-РНК и длинные некодирующие РНК (нкРНК), из различных клеточных линий и тканей, но получение высоких количественных и качественных показателей из определенных тканей, как в случае студенистого ядра, остается сложной задачей. Студенистое ядро входит в число тканей, которые бросают вызов обычным методам выделения тотальной РНК и ее фракций из-за низкого содержания клеток и высокого содержания таких биополимеров, как протеогликаны и гликопротеины, которые нарушают чистоту и выход. Отсутствие большинства воспроизводимых методов для выделения тотальной РНК и ее фракций непосредственно студенистого ядра затрудняет эффективное применение ПЦР-анализа в реальном времени для последующего изучения изменения профиля экспрессии микро-РНК и днРНК при дегенерации межпозвоночного диска. В данном исследовании использована способность коллагеназы II типа расщеплять соединительную ткань для улучшения выделения тотальной РНК и ее фракций из пульпозного ядра и применено сравнение с классическим методом выделения РНК.

Материалы и методы. Образцы студенистого ядра ($n = 8$) были получены в период с сентября 2017 по декабрь 2018 года от пациентов с диагнозом «межпозвоночная грыжа пояснично-крестцового отдела» во время операции. Половина образцов подвергалась классическому, другая половина — оригинальному способу выделения РНК.

Результаты и обсуждение. Метод ферментативного расщепления для извлечения тотальной РНК и ее фракций из студенистого ядра межпозвоночного диска позволил достичь идеальной целостности и практически высокой чистоты. Не было никакого загрязнения белка, полисахаридов или коллагена.

Заключение. Таким образом, представлен метод, который позволяет повысить количественные и качественные показатели выхода тотальной РНК и ее фракций из студенистого ядра межпозвоночного диска, позволяющих проводить дальнейшие исследования по профилированию экспрессии микро-РНК и днРНК с помощью ПЦР в реальном времени с получением удовлетворительных результатов среднего значения порогового цикла.

Ключевые слова: микро-РНК, длинные некодирующие РНК, студенистое ядро, генная экспрессия, полимеразная цепная реакция в реальном времени, коллагеназа II типа, межпозвоночные диски, РНК расщепление

Для цитирования: Гареев И.Ф., Бейлерли О.А., Гуанг Янг, Даминг Жанг. Экстракция некодирующих РНК из студенистого ядра межпозвоночного диска с последующим профилированием их экспрессии. Креативная хирургия и онкология. 2020;10(2):108–114. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2020-10-2-108-114>

Non-Coding RNA Extraction from Nucleus Pulposus of Intervertebral Discs with Subsequent Expression Profiling

Ilgiz F. Gareev¹, Ozal A. Beylerli¹, Guang Yang^{2,3}, Daming Zhang^{2,3}

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

² First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China

³ Brain Institute, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China

Contacts: Ilgiz F. Gareev, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru

Abstract

Background. With numerous extraction protocols for total RNA and RNA fractions, like microRNA (miRNA) and long non-coding RNA (lncRNA), available for various cell and tissue types, obtaining a high quantitative and qualitative yield from some special material, such as the nucleus pulposus, remains challenging. Nucleus pulposus is troublesome to manage in common RNA isolation protocols due to low cell content and high biopolymer concentrations, including proteoglycans and glycoproteins, which impair overall purity and yield. A major lack of reproducible methods for total and fraction RNA isolation directly from the nucleus pulposus impedes effective real-time PCR applications for downstream miRNA and lncRNA expression profiling in the course of intervertebral disc degeneration. In this study, we exploit the collagenase type II lytic properties to facilitate extraction of total and fraction RNA from the nucleus pulposus and compare results with the standard RNA isolation method.

Materials and methods. Nucleus pulposus samples ($n = 8$) were obtained from September 2017 to December 2018 from patients with herniated discs in the lumbosacral spine diagnosed during surgery. Equal portions of samples were processed with the standard and original RNA isolation protocols.

Results and discussion. The enzymatic lysis method for total and fraction RNA isolation from the nucleus pulposus of intervertebral discs demonstrated excellent integrity and high purity. No protein, polysaccharide or collagen contamination was detected.

Conclusion. The method reported allows an improved quantitative and qualitative total and fraction RNA yield from the nucleus pulposus of intervertebral discs. The method can be used in future research on miRNA and lncRNA expression profiling with real-time PCR by improving the average cycle threshold value.

Keywords: microRNA, long non-coding RNA, nucleus pulposus, gene expression, real-time polymerase chain reaction, type II collagenase, intervertebral discs, RNA cleavage

Forcitation: Gareev I.F., Beylerli O.A., Guang Yang, Daming Zhang. Non-Coding RNA Extraction from Nucleus Pulposus of Intervertebral Discs with Subsequent Expression Profiling. *Creative Surgery and Oncology*. 2020;10(2):108–114. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2020-10-2-108-114>

Ilgiz F. Gareev — Department of Oncology with courses of oncology and pathological anatomy for Advanced Professional Education, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, orcid.org/0000-0002-4965-0835
Ozal A. Beylerli — Department of Oncology with courses of oncology and pathological anatomy for Advanced Professional Education, e-mail: obeylerli@mail.ru, orcid.org/0000-0002-6149-5460
Guang Yang — PhD, Department of Neurosurgery, e-mail: yangguang1227@163.com, orcid.org/0000-0002-7173-1914
Daming Zhang — PhD, Department of Neurosurgery, e-mail: dr_daming_zhang@163.com

Введение

Некодирующие РНК (нкРНК) относятся к молекулам рибонуклеиновой кислоты (РНК), которые не кодируют белок. Они охватывают огромное количество классов РНК и выполняют широкий спектр биологических функций, таких как регулирование экспрессии генов, защита генома от экзогенной ДНК и управление синтезом ДНК [1]. Одними из таких классов нкРНК, которые широко изучены, являются микро-РНК и длинные некодирующие РНК (днкРНК). Микро-РНК являются эндогенными и некодирующими одноцепочечными РНК, состоящими из 18–22 нуклеотидов, которые ингибируют экспрессию генов, способствуя деградации их матричных РНК (мРНК)-мишеней или ингибированию трансляции [2]. Доказано, что микро-РНК играют существенную роль в различных биологических процессах, включая клеточный цикл, апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток, регулируя экспрессию около одной трети всех генов человека [3]. Длинные некодирующие РНК представляют собой группу некодирующих РНК длиной более 200 нуклеотидов. Из-за своей длины цепочки нуклеотидов длинных некодирующих РНК обладают уникальной способностью принимать множество сложных вторичных и третичных структур, позволяя им выполнять специфические функции, такие как катализ, метаболизм и дифференцировка клеток [4]. Длинные некодирующие РНК не могут кодировать белок, но могут модулировать экспрессию генов на эпигенетических (например, метилирование ДНК, модификация гистонов), транскрипционных (например, рекрутирование транскрипционных факторов) и посттранскрипционных (например, регуляция стабильности микро-РНК и мРНК) уровнях [5, 6]. Все большее число исследований продемонстрировало дерегуляцию или aberrantную экспрессию микро-РНК и длинных некодирующих РНК при различных видах заболеваний, включая опухолевые процессы, воспалительные, сердечно-сосудистые и заболевания опорно-двигательного аппарата [7–9]. Результаты некоторых исследований показали, что данные нкРНК играют

непосредственную роль в развитии дегенеративных процессов в межпозвоночном диске [10, 11].

Межпозвоночный диск имеет сложное строение. Он состоит из центрально расположенного студенистого ядра, окруженного фиброзным кольцом. Основные компоненты, присутствующие в нормальном студенистом ядре, — это коллагеновые волокна II типа, имеющие циркулярное расположение в богатом протеогликанами и гликопротеинами гидратированном матриксе (около 80 % воды от сухого веса) [12]. Клетки студенистого ядра (нотохордальные клетки) имеют длинные отростки, переплетающиеся между собой, формируя структуру, подобную синцитию. Фиброзное кольцо межпозвоночного диска состоит из фиброзного или волнистого хряща, отличающегося большой прочностью. Поддержание всей структурной целостности хрящевого матрикса зависит целиком от хондроцитов. И хотя их масса невелика, они синтезируют тем не менее все биополимеры, из которых состоит хрящевой матрикс: коллаген, эластин, протеогликаны, гликопротеины и т. д. [13]. Дегенерация межпозвоночного диска может начинаться с различных отделов, в том числе со студенистого ядра, и ассоциируется с изменением его структуры и механических свойств. Дегенеративные изменения в межпозвоночном диске представляют собой каскад реакций, который начинается с изменений в локальном клеточном микроокружении студенистого или пульпозного ядра и прогрессирует до нарушения их структуры и функции. Несмотря на то что вовлеченные механизмы не до конца понятны, хорошо установлено, что апоптоз и пролиферация клеток студенистого ядра, нарушение внеклеточного матрикса (ВМ) и воспалительная реакция играют критическую роль в развитии дегенеративных процессов межпозвоночного диска [14]. Примечательно, что некоторые микро-РНК и длинные некодирующие РНК воздействуют на эти патологические процессы [15–23] (табл. 1).

Существует множество протоколов выделения тотальной РНК и ее фракций, таких как микро-РНК и длинные некодирующие РНК, из различных клеточных ли-

Длинные некодирующие РНК/Микро-РНК	Мишень	Уровень экспрессии	Эффект	Лит.
miR-155	FADD, caspase-3	Снижена	Снижение апоптоза клеток студенистого ядра	15
miR-494	JunD	Повышена	Снижение апоптоза клеток студенистого ядра	16
miR-10b	HOXD10	Повышена	Снижение пролиферации клеток студенистого ядра	17
miR-27a	PI3K	Повышена	Снижение апоптоза клеток студенистого ядра	18
miR-377	ADAMTS-5	Повышена	Синтез металлопротеиназ. Увеличение дегенерации внеклеточного матрикса студенистого ядра	19
H19	miR-22 LEF1	Повышена	Синтез металлопротеиназ. Увеличение дегенерации внеклеточного матрикса студенистого ядра	20
linc-ADAMTS5	ADAMTS5	Снижена	Разрушение и снижение синтеза агрекана	21
RP11-296A18.3	miR-138 HIF1A	Повышена	Синтез металлопротеиназ. Увеличение дегенерации внеклеточного матрикса студенистого ядра	22
NEAT1	ERK/MAPK	Повышена	Синтез металлопротеиназ. Увеличение дегенерации внеклеточного матрикса студенистого ядра	23
HCG18	miR-146a TRAF6	Повышена	Увеличение апоптоза клеток студенистого ядра	24

Таблица 1. Микро-РНК и длинные некодирующие РНК, связанные с процессами дегенерации межпозвоночного диска
Table 1. MicroRNA and long non-coding RNA associated with intervertebral disc degeneration diseases

ний и тканей, но получение высоких количественных и качественных показателей из определенных тканей, как в случае студенистого ядра, остается сложной задачей. Студенистое ядро входит в число тканей, которые бросают вызов обычным методам экстракции общей РНК и ее фракций из-за низкого содержания клеток и высокого содержания биополимеров, таких как протеогликаны и гликопротеины, которые нарушают чистоту и выход общей РНК и ее фракций [24]. Кроме того, упругая и плотная структура хрящевого матрикса студенистого ядра межпозвоночного диска требует жестких условий гомогенизации, которые нарушают целостность РНК. Соответственно, получение тотальной РНК из студенистого ядра с количественными показателями более 500 нг/мкл и с соотношениями A260/280 и A260/230, равными 1,5–2,0 нм, как качественными показателями является тяжело реализуемой задачей.

Отсутствие большинства воспроизводимых методов для выделения тотальной РНК и ее фракций непосредственно из тканей межпозвоночного диска затрудняет эффективное применение полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР в реальном времени) для последующего изучения нкРНК в патогенезе дегенерации межпозвоночного диска. Коллагеназа II типа уникальна среди протеаз благодаря своей способности расщеплять коллагеновые фибриллы, встречающиеся во всех типах соединительной ткани, таких как кожа, кости, сухожилия, кровеносные сосуды [25]. В этом исследовании планировалось использовать способность коллагеназы II типа расщеплять соединительную ткань для улучшения выделения тотальной РНК и ее фракций из пульпозного ядра. После анализа результатов и сравнения с обычным методом измельчения тканей в жидком азоте в этом исследовании был обобщен разумный и эффективный метод выделения тотальной РНК и ее фракций с последующим профилированием экспрессии на платформе ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

Сбор образцов

Образцы студенистого ядра ($n = 8$) были получены в периоде с сентября 2017 по декабрь 2018 года от пациентов с диагнозом «межпозвоночная грыжа пояснично-крестцового отдела» во время операции. Образцы хранились при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Все пациенты дали письменное и устное информированное согласие на проведение исследовательской работы.

Для выделения тотальной РНК и ее фракций

TRIzol (100 мл) (Thermo Fisher Scientific, США), хлороформ, абсолютный этиловый спирт, стерильные наконечники для дозаторов, стерильные пробирки Эппендорфа 1,5 и 2 мл, охлаждаемая высокоскоростная бенчтоп-центрифуга (Thermo Fisher Scientific, США), микроцентрифуга, спектрофотометр NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, США), центрифужная пробирка 15 мл, игла одноразовая стерильная 0,7×40 мм (22G), хлорид натрия, ацетата натрия, 100 % изопропанол, коллагеназа II типа (3 мл, 0,2 %) (Thermo Scientific, США).

Для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roshe, Германия), стерильные наконечники для дозаторов, стерильные пробирки Эппендорфа 1,5 мл и 2 мл, пробирки для ОТ-ПЦР 0,2 мл, охлаждаемая высокоскоростная бенчтоп-центрифуга, 9700 ПЦР система (Applied Biosystems, США), праймеры (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roshe, Германия)), вода, обработанная диэтилпирикарбонатом (DEPC) (Invitrogen, США), фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) 2 мл (Invitrogen, США).

Для ПЦР в реальном времени

FastStart Universal SYBR Green Master (Rox, Германия), стерильные наконечники для дозаторов, стерильные пробирки Эппендорфа 1,5 и 2 мл, 8 ПЦР-пробирок в стрипе 0,2 мл с крышками-колпачками, 7500 FAST ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems, США), охлаждаемая высокоскоростная бенчтоп-центрифуга, праймеры (Invitrogen, США), вода, обработанная диэтилпирикарбонатом (DEPC) (Invitrogen), 96-луночный планшет для ПЦР в реальном времени.

Выделение тотальной РНК и ее фракций методом жидкого азота

100 мг ткани студенистого ядра ($n = 4$) помещали в ступку с предварительно охлажденной DEPC водой и добавляли жидкий азот для уплотнения образца. После улетучивания жидкого азота образец измельчали до порошкообразной массы с помощью пестика. В течение периода измельчения жидкий азот добавляли три или четыре раза, пока образец не был достаточно измельчен. Затем 100 мг измельченной ткани переносили непосредственно в пробирку Эппендорфа 1,5 или 2 мл, содержащую 1 мл TRIzol (Thermo Scientific, США), и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали при 12 000 g в течение 5 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ для осаждения непереваренной ткани. Очищенный супернатант переносили в новую пробирку и 10 раз пропускали через иглу 22G. Данный материал смешивали с 200 мкл хлороформа путем энергичного встряхивания в течение 30 с, оставляли стоять в течение 3 мин при комнатной температуре и затем центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После центрифугирования образец разделялся на 3 фазы: верхняя, или водная (бесцветная), средняя, или интерфаза, и органическая фаза. Водный слой переносили в новую пробирку Эппендорфа 2 мл и добавляли смесь концентрированного хлорида натрия и ацетата натрия для достижения конечных концентраций 1,2 и 0,8 M соответственно. Затем тотальную РНК и ее фракции осаждали добавлением 0,3 объема 100 % изопропанола с последующей 10 мин инкубацией при комнатной температуре. Центрифугирование при 12 000 g в течение 10 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ облегчало осаждение осадка РНК, которую дважды промывали 1 мл 75 % этанола, полученного разбавлением абсолютного этанола, и сушили в течение 5–10 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Тотальную РНК и ее фракции элюировали 20 мкл воды без РНКаз. После перемешивания (вручную) образец оставляли при 60 °С на 5 мин для ускорения растворения тотальной РНК и ее фракций в водном растворе. Дальнейшее хранение водного раствора РНК происходило при -80 °С.

Выделение тотальной РНК и ее фракций методом ферментативного расщепления

100 мг ткани студенистого ядра (n = 4) разрезали на кусочки и помещали в пробирки Эппендорфа. В каждую пробирку добавляли коллагеназу II типа (3 мл, 0,2%) (Thermo Scientific, США). Закрыв крышку, пробирки перемешивали (вручную) в течение 30 сек. Образец расщепляли при 37 °С в течение 4 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Добавляли фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) (2 мл) (Invitrogen, США), содержащий 10% фетальной бычьей сыворотки, перемешивали (вручную) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Супернатант осторожно удаляли, помещали в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугировали при 1200 g при комнатной температуре в течение 40 с. Надосадочную жидкость осторожно удаляли в дополнительную пробирку для центрифугирования на 15 мл, в которую добавляли 5 мл PBS. После перемешивания и центрифугирования при 1200 g

при комнатной температуре в течение 5 мин супернатант удалялся. TRIzol (1 мл) добавляли в центрифужную пробирку и перемешивали. Процедура проводилась на льду. Остальные этапы были идентичны стандартному способу выделения тотальной РНК и ее фракций методом использования жидкого азота, указанному выше.

Контроль качества тотальной РНК и ее фракций

С помощью спектрофотометра NanoDrop-2000 определяли количественные и качественные показатели тотальной РНК и ее фракций. Концентрация тотальной РНК и ее фракций измеряется в нг/мкл. Качественные же показатели определяются по спектру поглощения полученного раствора с тотальной РНК при трех длинах волн: 230, 260, 280 нм. Отношение поглощения при 260/280 (1,8–2,2) и отношение поглощения 260/230 (1,82–2,0) показано в таблице 2.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК)

Метод ОТ-ПЦР включает в себя обратную транскрипцию микро-РНК с помощью специфических праймеров по stem-loop системе (stem-loop RT primers) (Invitrogen, США) и днРНК с помощью олиго (dT)18 праймера (Roche, Германия) с использованием набора Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Германия). Праймеры для ОТ-ПЦР представлены в таблице 3.

ПЦР в реальном времени

Профилирование экспрессии микро-РНК и днРНК проводилось методом ПЦР в реальном времени с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green Master Mix (Roche, Германия). Для ПЦР в реальном времени использовались forward и reverse праймеры (Invitrogen, США). Для нормализации данных использовали контрольные гены для микро-РНК РНК U6 и ген GAPDH для днРНК. Для каждого образца подготавливали реакционную смесь общим объемом 20 мкл для ПЦР в реальном времени, добавляя 10 мкл смеси SYBR Green Master Mix от компании Roche (Германия), 2 мкл праймеров (1 мкл reverse + 1 мкл forward), 6 мкл DEPC воды (Invitrogen, США) и 2 мкл кДНК. В итоге на одну реакцию приходится 20 мкл готового раствора. Праймеры для ПЦР в реальном времени представлены в таблице 4. Условия ПЦР в реальном времени: после первоначальной денатурации при 95 °С в течение 10 мин реакции проводили в течение 40 циклов при 95 °С по 10 с и 60 °С по 60 с.

Результаты и обсуждение

В последнее время широко изучается роль микро-РНК и днРНК в патогенезе дегенерации межпозвоночного диска. Студенистое ядро богато коллагеном II типа и агреканом и содержит малое количество клеток. Следовательно, метод полного разрушения тканей пульпозного ядра межпозвоночного диска для достижения эффективного расщепления и повышения концентрации и выхода тотальной РНК и ее фракций, таких как микро-РНК и днРНК, очень важен.

С применением жидкого азота			
№ образца	нг/мкл	A260/280	A260/230
1	431	1,42	1,24
2	256,2	1,56	0,75
3	288,9	1,38	1,1
4	402,56	1,40	1,38
С применением фермента			
№ образца	нг/мкл	A260/280	A260/230
5	838	1,98	1,92
6	623	1,88	1,6
7	598,1	1,97	1,51
8	567,6	1,90	1,49

Таблица 2. Количественные и качественные показатели тотальной РНК
Table 2. Quantitative and qualitative properties of total RNA yield

Микро-РНК / Длинные некодирующие РНК / Контрольные гены	Последовательность праймеров (5'-3')
miR-155	CCTGTTGTCTCCAGCCACAAAAGAGCACAAATATTCAGGAGACAACAGGACCCCTA
miR-494	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGGTT
HCG18	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
NEAT1	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
U6	CGCTTACGCAATTTGCGTGTCA
GAPDH	TTT TTT TTT TTT TTT TTT

Условия ОТ-ПЦР: 25 °С — 10 мин, 55 °С — 30 мин, 85 °С — 5 мин (по протоколу набора).

Таблица 3. Последовательность праймеров для ОТ-ПЦР
Table 3. RT-PCR primer sequences

Классический метод измельчения тканей основан на применении жидкого азота. Однако результат в данной работе в отношении к среднему значению количественного показателя тотальной РНК и ее фракций на спектрофотометре NanoDrop-2000 показал, что лизис клеток не был завершен, а именно средний показатель $344,7 \pm 42,6$ нг/мкл, что меньше среднего количественного показателя тотальной РНК при лизисе клеток (500 нг/мкл).

При этом водный раствор тотальной РНК и ее фракции, выделенные методом измельчения в жидком азоте, содержал много примесей и его чистота была недостаточной. Средние качественные значения были $A260/280 1,63 \pm 0,09$ и $A260/230 1,12 \pm 1,1$. Таким образом, метод измельчения в жидком азоте не был адекватен для извлечения тотальной РНК и ее фракций из студенистого ядра межпозвоночных дисков.

Коллагеназа II типа уникальна среди протеаз благодаря своей способности расщеплять коллагеновые фибриллы, встречающиеся во всех типах соединительной ткани, таких как кожа, кости, сухожилия, кровеносные сосуды. Поэтому использование коллагеназы II типа для расщепления структур студенистого ядра межпозвоночного диска для получения высококачественной РНК имеет место быть. В данном случае результаты среднего качественного и количественного значения были равны $656,7 \pm 61,5$ со средним отношением $A260/30 1,44 \pm 0,04$. Хотя и показатель $A260/230$ был далек от идеала, его значения были лучше, чем в случае использования жидкого азота.

Другие результаты были связаны с профилированием экспрессии микро-РНК и днРНК с помощью ПЦР в реальном времени. При определении эффективности проведения работы на ПЦР в реальном времени можно использовать методику относительных количественных измерений путем определения пороговых циклов (Ct). Иными словами, проверкой изменения экспрессии микро-РНК и днРНК является показатель Ct (табл. 5). Уровни Ct обратно пропорциональны количеству нуклеиновой кислоты-мишени и эталонного гена для нормализации данных в образце, т. е. чем ниже уровень Ct, тем больше количество нуклеиновой кислоты-мишени и эталонного гена для нормализации данных в образце.

Заключение

Метод ферментативного расщепления для извлечения тотальной РНК и ее фракций из студенистого ядра межпозвоночного диска достиг идеальной целостности и практически высокой чистоты. Более того, не было никакого загрязнения белка, полисахаридов или коллагена. Поэтому метод расщепления ферментом коллагеназы II типа подходит для анализа, а положительные результаты профилирования экспрессии микро-РНК и днРНК являются доказательством для проведения новых исследований в изучении микро-РНК и днРНК

Микро-РНК / Длинные некодирующие РНК / Контрольные гены	Последовательность праймеров (5'-3')
miR-155	F: CGCCGTTAATGCTAATCGTGA R: CAGCCACAAAAGAGCACAAT
miR-494	F: AGCTGAAACATACACGGGA R: GTGCAGGGTCCGAGGT
HCG18	F: CTGCCTTCTAGGGGCTCACT R: ACATGCTCCACCAACTTTCA
NEAT1	F: GCTGGAGTCTTGGGCACGGC R: TCAACCGAGGCCGCTGTCTC
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R: CGCTTCCAGAAATTTGCGTGTCACT
GAPDH	F: GAACGGATTTGGCCGTATTG R: TCTCCACTTTGCCACTGCAA

Таблица 4. Последовательность праймеров для ПЦР в реальном времени
Table 4. Real-time PCR primer sequences

№ образца	С применением жидкого азота			
	miR-155/U6	miR-494/U6	HCG18/GAPDH	NEAT1/GAPDH
1	27,1/23,4	31,3/22,6	24/26,8	31,1/25,8
2	25,8/22	30,6/22,3	26,2/25,9	30,3/30
3	29,2/22,7	24,5/21,7	24,2/30,4	27,7/27,5
4	29/21,9	28,8/24,5	21,7/29,9	33,4/26,7
№ образца	С применением фермента			
	miR-155/U6	miR-494/U6	HCG18/GAPDH	NEAT1/GAPDH
5	22,5/19,7	27,8/19,2	23,8/21	29,5/19,6
6	22,5/20,6	27,6/20	23/21,4	30,1/24,7
7	26,4/19,1	21,3/19,6	19,8/22,6	21,1/23,5
8	23,9/18,9	25,7/21,4	20,5/21,8	25,6/24,9

Ct < 29 — сильные положительные реакции, указывающие на обильное содержание микро-РНК-мишени в образце.

Ct 30–37 представляют собой положительные реакции, указывающие на умеренные количества микро-РНК-мишени.

Ct 38 и более являются слабыми реакциями, указывающими минимальные количества микро-РНК-мишени, которые могут объясняться результатом инфекционного процесса или загрязненностью образца.

Средние значения порогового цикла (Ct) в процессе применения жидкого азота и коллагеназы II типа для miR-155, miR-494, HCG18 и NEAT1 показали: $27,78 \pm 0,80$ vs $23,83 \pm 0,91$ ($p \leq 0,05$); $28,75 \pm 1,50$ vs $25,60 \pm 1,50$ ($p \leq 0,05$); $24,00 \pm 0,90$ vs $21,53 \pm 1,09$ ($p \leq 0,05$); $30,63 \pm 1,20$ vs $26,58 \pm 2,07$ ($p \leq 0,05$).

Таблица 5. Средние значения порогового цикла (Ct) для микро-РНК, длинных некодирующих РНК и контрольных генов

Table 5. Average cycle thresholds (Ct) for miRNA, lncRNA and control genes

в патогенезе дегенерации межпозвоночного диска и заслуживают популяризации. Помимо микро-РНК и днРНК существуют другие классы нкРНК, такие как малая ядерная РНК, малая ядрышковая РНК и малая интерферирующая РНК. Способ может быть адаптирован для других типов нкРНК, связанных с исследованиями роли нкРНК в патогенезе дегенеративных процессов в межпозвоночном диске.

Информация о конфликте интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Информация о спонсорстве. Данная работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 7 февраля 2020 № УТ-43.

Список литературы / References

- 1 Li J, Liu C. Coding or noncoding, the converging concepts of RNAs. *Front Genet.* 2019;10:496. DOI: 10.3389/fgene.2019.00496
- 2 Lu T.X., Rothenberg M.E. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1202–7. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.034
- 3 Mohr A.M., Mott J.L. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis.* 2015;35(1):3–11. DOI: 10.1055/s-0034-1397344
- 4 Jathar S., Kumar V., Srivastava J., Tripathi V. Technological Developments in lncRNA Biology. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1008:283–323. DOI: 10.1007/978-981-10-5203-3_10
- 5 Begolli R., Sideris N., Giakountis A. LncRNAs as chromatin regulators in cancer: from molecular function to clinical potential. *Cancers (Basel).* 2019;11(10):E1524. DOI: 10.3390/cancers11101524
- 6 Marchese F.P., Huarte M. Long non-coding RNAs and chromatin modifiers: their place in the epigenetic code. *Epigenetics.* 2014;9(1):21–6. DOI: 10.4161/epi.27472
- 7 Li M., Duan L., Li Y., Liu B. Long noncoding RNA/circular noncoding RNA-miRNA-mRNA axes in cardiovascular diseases. *Life Sci.* 2019;233:116440. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.04.066
- 8 Harries L.W. RNA biology provides new therapeutic targets for human disease. *Front Genet.* 2019;10:205. DOI: 10.3389/fgene.2019.00205
- 9 Cao M.X., Tang Y.L., Zhang W.L., Tang Y.J., Liang X.H. Non-coding RNAs as Regulators of Lymphangiogenesis in Lymphatic Development, Inflammation, and Cancer Metastasis. *Front Oncol.* 2019;9:916. DOI: 10.3389/fonc.2019.00916
- 10 Li Z., Li X., Chen C., Li S., Shen J., Tse G., et al. Long non-coding RNAs in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif.* 2018;51(5):e12483. DOI: 10.1111/cpr.12483
- 11 Wang C., Wang W.J., Yan Y.G., Xiang Y.X., Zhang J., Tang Z.H., et al. MicroRNAs: new players in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta.* 2015;450:333–41. DOI: 10.1016/j.cca.2015.09.011
- 12 Bowles R.D., Setton L.A. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair. *Biomaterials.* 2017;129:54–67. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.013
- 13 Navone S.E., Marfia G., Giannoni A., Beretta M., Guarnaccia L., Gualtierotti R., et al. Inflammatory mediators and signalling pathways controlling intervertebral disc degeneration. *Histol Histopathol.* 2017;32(6):523–42. DOI: 10.14670/HH-11-846
- 14 Zhao R., Liu W., Xia T., Yang L. Disordered mechanical stress and tissue engineering therapies in intervertebral disc degeneration. *Polymers (Basel).* 2019;11(7):E1151. DOI: 10.3390/polym11071151
- 15 Wang H.Q., Yu X.D., Liu Z.H., Cheng X., Samartzis D., Jia L.T., et al. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3. *J Pathol.* 2011;225(2):232–42. DOI: 10.1002/path.2931
- 16 Wang T., Li P., Ma X., Tian P., Han C., Zang J., et al. MicroRNA-494 inhibition protects nucleus pulposus cells from TNF-alpha-induced apoptosis by targeting JunD. *Biochimie.* 2015;115:1–7. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.04.011
- 17 Yu X., Li Z., Shen J., Wu W.K., Liang J., Weng X., et al. MicroRNA-10b promotes nucleus pulposus cell proliferation through RhoC-Akt pathway by targeting HOXD10 in intervertebral disc degeneration. *PLoS One.* 2013;8(12):e83080. DOI: 10.1371/journal.pone.0083080
- 18 Liu G., Cao P., Chen H., Yuan W., Wang J., Tang X. MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K. *PLoS One.* 2013;8(9):e75251. DOI: 10.1371/journal.pone.0075251
- 19 Tsirimoniaki E., Fedonidis C., Pneumaticsos S.G., Tragas A.A., Michalopoulos I., Mangoura D. PKC epsilon signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells. *PLoS ONE.* 2013;8:e82045. DOI: 10.1371/journal.pone.0082045
- 20 Wang X., Zou M., Li J., Wang B., Zhang Q., Liu F., et al. LncRNA H19 targets miR-22 to modulate HO-induced deregulation in nucleus pulposus cell senescence, proliferation, and ECM synthesis through Wnt signaling. *J Cell Biochem.* 2018;119(6):4990–5002. DOI: 10.1002/jcb.26738
- 21 Wang K., Song Y., Liu W., Wu X., Zhang Y., Li S., et al. The noncoding RNA linc-ADAMTS5 cooperates with RREB1 to protect from intervertebral disc degeneration through inhibiting ADAMTS5 expression. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(10):965–79. DOI: 10.1042/CS20160918
- 22 Ruan Z., Ma H., Li J., Liu H., Jia H., Li F. The long non-coding RNA NEAT1 contributes to extracellular matrix degradation in degenerative human nucleus pulposus cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(7):595–600. DOI: 10.1177/1535370218760774
- 23 Xi Y., Jiang T., Wang W., Yu J., Wang Y., Wu X., et al. Long non-coding HCG18 promotes intervertebral disc degeneration by sponging miR-146a-5p and regulating TRAF6 expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):13234. DOI: 10.1038/s41598-017-13364-6.25
- 24 Le Bleu H.K., Kamal F.A., Kelly M., Ketz J.P., Zuscik M.J., Elbarbary R.A. Extraction of high-quality RNA from human articular cartilage. *Anal Biochem.* 2017;518:134–8. DOI: 10.1016/j.ab.2016.11.018
- 25 Patry J., Blanchette V. Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *Int Wound J.* 2017;14(6):1055–65. DOI: 10.1111/iwj.12760