

УДК 577.21:577.2.04:616-097]618.3-06:578.825.11

DOI: 10.36604/1998-5029-2025-98-109-116

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

О.О.Некрасова, Д.А.Гассан, А.В.Конев, К.А.Конева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ. Введение. Определение однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов иммунной системы с последующим анализом ассоциативных взаимосвязей с отдельными симптомами, синдромами и заболеваниями является одним из важных направлений в области медицинской генетики. **Цель.** Разработать ПЦР тест-системы для генотипирования некоторых ОНП генов врожденного иммунитета и воспалительного ответа (*TLR1*, *TLR4*, *MBL2*, *PEL11*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG*). **Материалы и методы.** Для отбора полиморфизмов использовались открытые базы данных PubMed, HapMap и RegulomeDB, а также программа для ЭВМ собственной разработки. Дизайн праймеров и зондов для анализа плавления ампликонов в высоком разрешении (HRM) и асимметричной (LATE) ПЦР с анализом плавления зондов типа «молекулярные маяки» осуществлялся в программном пакете Vector NTI 11.0. Материал для генотипирования – ДНК, выделенная из периферической крови 48 матерей с хроническими герпес-вирусными инфекциями и пуповинной крови их новорожденных детей. **Результаты.** Были отобраны двадцать ОНП таргетных генов, подобраны олигонуклеотидные последовательности и условия ПЦР для их генотипирования. **Заключение.** Разработанные ПЦР тест-системы позволяют генотипировать некоторые ОНП генов *TLR1*, *TLR4*, *MBL2*, *PEL11*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG* с целью дальнейшего поиска ассоциативных взаимосвязей с течением и исходами беременностей у женщин с хроническими герпес-вирусными инфекциями, а также наличием патологий развития их новорожденных детей.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, иммунитет, цитокины, полимеразная цепная реакция, HRM-анализ, LATE-PCR.

DEVELOPMENT OF PCR-BASED TEST SYSTEMS FOR GENOTYPING OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN INNATE IMMUNITY AND INFLAMMATORY RESPONSE GENES

O.O.Nekrasova, D.A.Gassan, A.V.Konev, K.A.Koneva

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

SUMMARY. Introduction. Identifying single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in immune-related genes and examining their associations with specific symptoms, syndromes, and diseases is one of the important directions in medical genetics. **Aim.** To develop PCR-based assays for genotyping of selected SNPs in innate immunity and inflammatory response genes (*TLR1*, *TLR4*, *MBL2*, *PEL11*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG*). **Materials and methods.** SNP selection was based on public databases (PubMed, HapMap, RegulomeDB) and custom-developed software. Primers and probes for high-resolution melting (HRM) analysis of amplicons and for asymmetric Linear-After-The-Exponential (LATE) PCR coupled with molecular beacon probe melting analysis were designed in Vector NTI 11.0. Genomic DNA for genotyping

Контактная информация

Олеся Олеговна Некрасова, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория механизмов вирус-ассоциированных патологий развития, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Olesya O. Nekrasova, PhD (Med.), Senior Staff Scientist, Laboratory of Mechanisms of Virus-Associated Developmental Pathologies, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Для цитирования:

Некрасова О.О., Гассан Д.А., Конев А.В., Конева К.А. Разработка ПЦР тест-систем для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов в генах врожденного иммунитета и воспалительного ответа // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2025. Вып.98. С. 109–116. DOI: 10.36604/1998-5029-2025-98-109-116

For citation:

Nekrasova O.O., Gassan D.A., Konev A.V., Koneva K.A. Development of PCR-based test systems for genotyping of single nucleotide polymorphisms in innate immunity and inflammatory response genes. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2025; (98):109–116 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2025-98-109-116

was isolated from peripheral blood of 48 mothers with chronic herpesvirus infections and from umbilical cord blood of their newborns. **Results.** Twenty SNPs across the target genes were selected. Oligonucleotide sequences and PCR conditions for genotyping were established. **Conclusions.** The developed test systems enable genotyping of selected SNPs in *TLR1*, *TLR4*, *MBL2*, *PEL11*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, and *IFNG* genes, thereby facilitating further association studies with the course and outcomes of pregnancy in women with chronic herpesvirus infections and with developmental abnormalities in their newborns.

Key words: single nucleotide polymorphism, immunity, cytokines, polymerase chain reaction, HRM analysis, LATE-PCR.

Определению вклада наследственности в развитие тех или иных фено- и эндотипических особенностей организма человека в настоящее время уделяется достаточно пристальное внимание. В медицине изучение генетических вариантов имеет как фундаментальное значение, обусловленное эволюцией понимания роли молекулярно-генетических механизмов в развитии заболеваний, так и прикладной аспект, благодаря возможности использовать знания об индивидуальных генетических особенностях для персонализированного прогнозирования и коррекции патологических состояний.

Большой интерес представляет собой исследование генов, влияющих на работу иммунитета, особенно в рамках системы мать-плод. В частности, существуют исследования об ассоциации некоторых однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) и экспрессии генов цитокинов и их рецепторов на течение и исходы беременностей у женщин с хроническими герпес-вирусными инфекциями [1-3]. Наиболее перспективными считаем изучение следующих генов врожденного иммунитета и воспалительного ответа: *TLR* (толл-подобный рецептор) 1, *TLR4*, *MBL2* (маннозо-связывающий лектин), *PEL11* (белок Е3-убиквитинлигаза Pellino1), *IL1B* (интерлейкин-1 β), *IL6* (интерлейкин-6), *IL10* (интерлейкин-10), *TNF* (фактор некроза опухоли), *IFNG* (интерферон γ).

На сегодняшний день основными методами определения ОНП являются секвенирование и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в различных вариациях. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. HRM-анализ (High Resolution Melting – анализ плавления с высоким разрешением) представляет собой простой, доступный и эффективный метод генотипирования ОНП, в основе которого лежит детекция температуры плавления двухцепочечной матрицы ДНК, синтезированной в ходе ПЦР, в присутствии насыщающего интеркалирующего флуоресцентного красителя. В связи с тем, что комплементарные нуклеотиды в последовательности ампликона имеют разную энергию сцепления друг с другом за счет различного числа водородных связей, в процессе градиентного повышения температуры денатурация цепей ДНК будет происходить с некоторыми отличиями в зависимости от их нуклеотидного состава, а именно – наличия или отсутствия нуклеотидных замен. Известно, что пара аденин-тимин образуют между собой две водородные связи, а гуанин-цитозин – три. Поэтому пара гуанин-цитозин является более тугоплавкой и на её

разрыв требуется больше энергии, а значит, необходима более высокая температура. Специальные программы для HRM-анализа позволяют изучать небольшие различия в динамике плавления между ампликонами и проводить кластеризацию образцов согласно форме полученных кривых плавления, в частном случае, отражающих конкретный генотип. При этом меньший размер ампликона позволяет лучше визуализировать различия между генотипами на графиках [4, 5].

Тем не менее, метод HRM-анализа нельзя считать универсальным – в некоторых случаях одиночная нуклеотидная замена вызывает лишь минимальный сдвиг температуры плавления ампликона, недостаточный для надежного различения гомозиготных генотипов. В таких случаях целесообразно использовать альтернативные способы генотипирования, одним из которых является асимметричная LATE (Linear-After-The-Exponential) ПЦР с флуоресцентными зондами. Этот метод обладает высокой точностью за счет того, что в реакции плавления участвует короткий олигонуклеотид, комплементарный фрагменту ампликона с ОНП [6, 7].

Целью настоящей работы являлась разработка ПЦР тест-систем для генотипирования некоторых ОНП генов врожденного иммунитета и воспалительного ответа – *TLR1*, *TLR4*, *MBL2*, *PEL11*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG*.

Материалы и методы исследования

Отбор полиморфных вариантов с частотой минорного аллеля $\geq 0,05$ в европейской популяции осуществлялся на основании сведений из поисковой системы по биомедицинским исследованиям (базы данных PubMed и NapMap), включающей информацию о неравновесии по сцеплению отдельных вариаций, а также с учетом прогнозирования функциональной значимости сайтов *in silico* базы RegulomeDB. Для быстроты и удобства поиска предполагаемых полиморфизмов – кандидатов таргетных генов, была использована программа для ЭВМ, разработанная нами с использованием фреймворков для работы с открытыми веб-ресурсами и сервисами обработки данных [8]. Компьютерный дизайн и подбор праймеров и зондов производился в программном пакете Vector NTI 11.0 (Invitrogen, Switzerland). Специфичность отжига праймеров проверяли *in silico* с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST. Дизайн всех праймеров осуществлялся на основании стандартных критериев: 1) размер праймеров от 18 до 30 нуклеотидов; 2) температура плавления

ления праймеров оптимальная для стадии отжига и приблизительно одинаковая для прямого (FWD) и обратного (REV) праймера; 3) GC состав последовательностей в пределах 40-70%; 4) отсутствие вторичных структур и димеров; 5) специфичность (праймеры должны отжигаться только на целевую матрицу); 6) размер ампликона для последующего HRM-анализа не более 150 пар нуклеотидов; 7) отсутствие других часто встречающихся полиморфизмов в зоне амплификации. Материалом для генотипирования послужила ДНК, выделенная согласно протоколу производителя для набора «ДНК-Экстрен-1» («Синтол», Россия) из лейкоцитов периферической крови 48 матерей с хроническими герпес-вирусными инфекциями и пуповинной крови их новорожденных детей. Амплификацию проводили на аппарате CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Смесь ПЦР («Синтол», Россия) для HRM-анализа ОНП включала: ДНК-матрицу – 100 нг, 1х ПЦР-буфер с EvaGreen, $MgCl_2$ – 2,5 mM, dNTP – 0,25 mM, праймеры – по 0,2 mM прямого и обратного, Hot Start Taq-полимеразу, ингибированную антителами – 1 ЕД, воду – до 10 мкл. Смесь для LATE-PCR содержала те же компоненты за исключением следующих особенностей: лимитирующий праймер в концентрации 0,02 мкМ, избыточный праймер – 0,5 мкМ, зонд – 0,5 мкМ. Детекция генотипов была произведена путем анализа графиков, отражающих зависимость изменения уровня флуоресценции от температуры ($-dF/dT$). Для интерпретации результатов HRM-анализа использовали программное обеспечение Precision Melt Analysis (Bio-Rad, США). Полученные в результате исследования данные о частотах генотипов были проверены на соответствие с популяционными данными в открытых источниках, а также на предмет соответствия равновесию Харди-Вайнберга с использованием критерия хи-квадрат. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга считали значимым при $p < 0,05$. Подсчеты частот генотипов были представлены в виде процентов.

Результаты исследования и их обсуждение

На основании информации об аллельных частотах ОНП, полученной с помощью разработанной нами программы для ЭВМ, а также сведений из открытых баз данных, были отобраны двадцать наиболее перспективных ОНП генов *TLR1*, *TLR4*, *MBL2*, *PEL11*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG*. Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов для генотипирования указанных ОНП представлены в таблице 1.

На основании данных об олигонуклеотидных последовательностях, полученных при дизайне праймеров, расчетных данных о температуре плавления праймеров, размерах ампликона, HRM-анализ включал в себя режим амплификации: 1 цикл – предварительная денатурация 96°C/1,5 мин; 40 циклов – денатурация 96°C/5 сек, отжиг T_a °C (температура, специфическая для каждого ОНП, представлена в таблице 2)/12 сек; 1 цикл – финальная элонгация – 72°C/1 мин; скорость нагревания и охлаждения – 3°C/сек; и режим плавления: 1 цикл – предварительная денатурация 96°C/1 мин; 1 цикл – предварительная гибридизация 70°C/1 мин; нагрев от 70 до 95°C с шагом 0,2°C каждые 5 сек.

LATE-ПЦР так же включала в себя два режима: амплификация: 1 цикл – предварительная денатурация 96°C/1,5 мин; 25 циклов – денатурация 96°C/2 сек, отжиг T_a 1°C /15 сек; 45 циклов – денатурация 96°C/2 сек, отжиг T_a 2°C /15 сек; 1 цикл – финальная элонгация при 72°C/1 мин; скорость нагревания и охлаждения – 3°C в сек; и режим плавления: 1 цикл – предварительная денатурация 96°C/1 мин; 1 цикл – предварительная гибридизация 40°C/1 мин; нагрев от 40 до 70°C с шагом 1°C каждые 10 сек (табл. 2).

В результате анализа графиков кривых плавления было выявлено четкое объединение их в кластеры. Пики кривых плавления соответствовали отдельным аллельным вариантам гена. В качестве примера, на рисунке 1 представлены результаты HRM-анализа одного из ОНП, а на рисунке 2 – результаты анализа плавления зонда после LATE-ПЦР.

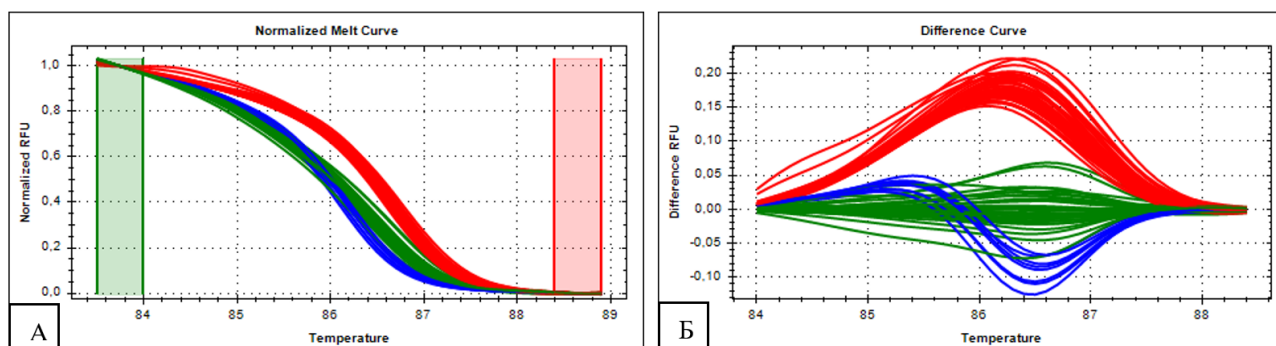


Рис. 1. Графики кривых плавления, полученные в ходе HRM-анализа ОНП *TLR1* rs5743618. А – Кривые плавления, отражающие изменение нормализованной интенсивности флуоресценции (RFU) в зависимости от температуры. Б – График, отражающий изменение разности флуоресцентного сигнала для каждого образца относительно усредненной нормализованной кривой референсного кластера (ΔRFU) в зависимости от температуры. Кривые красного цвета соответствуют генотипу CC, синего – AA, зеленого – AC.

Таблица 1

Характеристика ОНП полиморфизмов генов врожденного иммунитета и воспалительного ответа

Ген	ОНП rsID	Регион гена	Последовательность олигонуклеотидов
TLR1	rs5743551	Промотор	FWD 5'- GGGGATGAGTCTGTGGGGAAAAA -3' REV 5'- AAGTGGGCAGGGCAGTAAGG -3'
	rs5743618	Экзон (миссенс)	FWD 5'- CTGTGACTGTGACCTCCCT -3' REV 5'- GAATCGTGCCCACTATATGAAATAAATG -3'
	rs3923647	Экзон (миссенс)	FWD 5'- TTGATTATTCTGGCACTTCCTTG -3' REV 5'- GAACGGGCTAATTTTGGATGG -3'
	rs5743610	Экзон (синонимичный)	FWD 5'- ATCTTCCATTTTGCCATTATCTTCA -3' REV 5'- GATTGTTGTTTTCTGGGATAGGT -3'
TLR4	rs4986790	Экзон (миссенс)	FWD 5'- TTCCGATTAGCATACTTAGACTACTACCTC -3' REV 5'- TCTTTTACCCTTTCAATAGTCACACTCAC -3'
	rs1927914	Промотор	FWD 5'- TGCTTGGAGGATATTACAGTAGAAC -3' REV 5'- CTCAAAGTATTGTATTGGGATTAAATGAAC -3'
	rs7037117	3'-нетранслируемый регион	FWD 5'- GTTCCTTGATCTTGTGTCTCC -3' REV 5'- AAAAGAGGCTAGAAGAAGATAGAAAA -3'
MBL2	rs11003125	Интрон	FWD-L 5'- GCCAGAAAGTAGAGAGGTATTTAGCAC -3' REV-X 5'- CCTTAGTCACCAACCCAG -3' MB 5'- FAM- CGCGTAAGCCTGTCTAAAACACACGCG -BHQ1-3'
	rs7096206	Интрон	FWD-L 5'-CGAAGAGGACATGGAGAGAAAGAGGAAG-3' REV-X 5'- GTTGCTGCTGGAAGACTA -3' MB 5'-FAM- GCACGCCACCGAAAGCATGTGCG -BHQ1-3'
	rs1800450	Экзон (миссенс)	FWD 5'- TGTGAGGATGCCCCAAAAGAC -3' REV 5'- CAGAGACAGAACAGCCCCAA -3'
PEL1I	rs10496105	3'-нетранслируемый регион	FWD 5'- AGGGTTGAATGACAATAGTG -3' REV 5'- CATCTGCCAACCAACATT -3'
IL1B	rs1143627	Промотор	FWD 5'- AGCCTCCTACTTCTGCTTTTG -3' REV 5'- GTATCTGCCAGTTTCTCCCTC -3'
IL6	rs1800795	Промотор	FWD-L 5'- GAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCT -3' REV-X 5'- GATAAATCTTTGTTGGAGGGTGA -3' MB 5'-FAM- CGACCGCTAGTTGTGTCTTGCCATCGGTCG -BHQ1-3'
	rs2069837	Интрон	FWD 5'- TTGTCAAAATTGCTGTTATTAAGTATCTAC -3' REV 5'- TCCTTATCTCCAAAAACCTTCCT -3'
IL10	rs1800896	Промотор	FWD 5'- CACACACAAATCCAAGACAACACTAC -3' REV 5'- CCTTACTTTCCTCTTACCTATCCCTACT -3'
	rs3024498	3'-нетранслируемый регион	FWD 5'- TAATTTATCTTGTCTCTGGGCTTGGGG -3' REV 5'- TGGTTGGGGAATGAGGTTAGGG -3'
	rs1554286	Интрон	FWD 5'- CCCCCAAGCTGAGAACCAAG -3' REV 5'- CTGTGTCTGTGGATGTGAGTG -3'
TNF	rs1800610	Интрон	FWD 5'- CCTTCATCCACTCTCCAC -3' REV 5'- CCATCTTCTCTCTCTCTCTC -3'
IFNG	rs2069718	Интрон	FWD 5'- GCCATAGTGTTCCTCAAGATTAG -3' REV 5'- ATTGAACACTTGCATCTCCTC -3'
	rs1861493	Интрон	FWD 5'- GTGTTCTCCTCCCAACTCAG -3' REV 5'- TTTTGGAGCAAAGAAGGTCATC -3'

Примечание: rsID – идентификационный номер в базе NCBI; FWD – forward, прямой праймер; REV – reverse, обратный праймер; MB – molecular beacon, зонд типа «молекулярный маяк»; L – лимитирующий праймер; X – избыточный праймер; 5'-FAM – флуоресцентный краситель Fluorescein Amidite; BHQ1-3' – «тушитель» флуоресценции с 3' конца Black Hole Quencher 1.

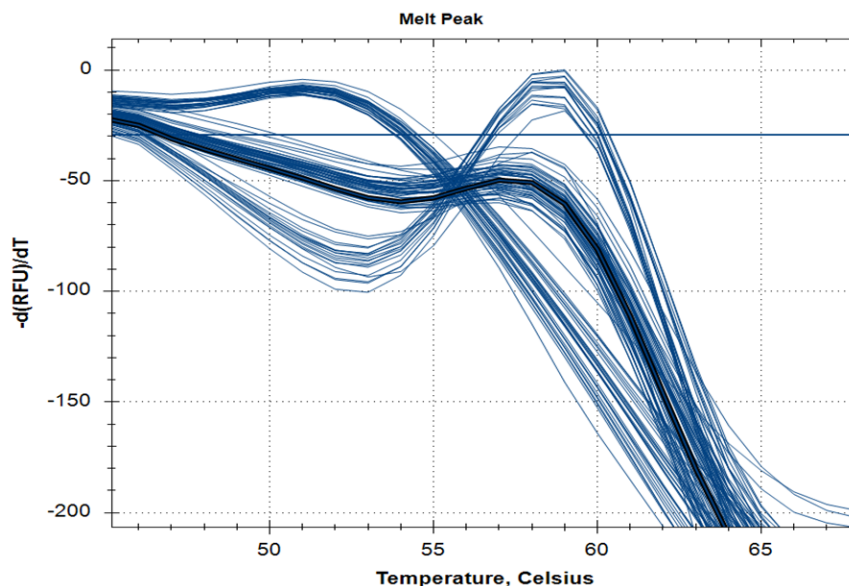


Рис. 2. График кривых плавления, отражающих зависимость изменения уровня флуоресценции от температуры ($-dF/dT$), полученных в ходе анализа плавления зондов после LATE-ПЦР ОНП *IL6* rs1800795. Кривая с пиком плавления 51,5°C соответствует генотипу CC, с пиком 58,5°C – генотипу GG, кривая без выраженных пиков – генотипу CG.

Таблица 2
Температура отжига праймеров для
генотипирования ОНП генов врожденного
иммунитета и воспалительного ответа

Ген	ОНП rsID	Ta, °C
<i>TLR1</i>	rs5743551	64
	rs5743618	61
	rs3923647	60
	rs5743610	60
<i>TLR4</i>	rs4986790	63
	rs1927914	60
	rs7037117	59
<i>MBL2</i>	rs11003125	Ta1 – 63; Ta2 – 58
	rs7096206	Ta1 – 63; Ta2 – 58
	rs1800450	60
<i>PELI1</i>	rs10496105	56
<i>IL1B</i>	rs1143627	60
<i>IL6</i>	rs1800795	Ta1 – 63; Ta2 – 60
	rs2069837	60
<i>IL10</i>	rs1800896	62
	rs3024498	64
	rs1554286	60
<i>TNF</i>	rs1800610	58
<i>IFNG</i>	rs2069718	59
	rs1861493	60

В результате статистической обработки полученных данных было обнаружено, что практически все частоты исследованных ОНП соответствовали ожидаемым и находились в равновесии Харди-Вайнберга, кроме *MBL2* rs7096206 у новорожденных детей, что, вероятнее всего, связано с небольшой выборкой обследуемых (табл. 3).

Нужно отметить, что, несмотря на простоту и относительно дешевизну, для генотипирования ОНП методом HRM-анализа необходим амплификатор с поддержкой режима HRM и соответствующим программным обеспечением. При этом по сравнению с HRM, LATE-ПЦР с анализом плавления зондов типа «молекулярные маяки» является более дорогостоящим, так как помимо праймеров требуется синтез дополнительных модифицированных олигонуклеотидных последовательностей (зондов), сцепленных с флуоресцентным красителем с 5' конца (например, Fluorescein Amidite, FAM) и «тушителем» флуоресценции с 3' конца (Black Hole Quencher 1, BHQ1). Кроме того, как говорилось ранее, методика LATE-ПЦР представляет собой разновидность так называемой асимметричной ПЦР и требует более тщательного подбора условий реакции, при этом сама амплификация требует больше времени, так как проходит в два этапа: синтез двухцепочечного продукта, а затем, после израсходования лимитирующего праймера, – полимеризация одноцепочечных фрагментов с избыточного праймера. В связи с этим HRM-анализ является приоритетным с точки зрения финансовых затрат и экономии времени.

Таблица 3

Частоты генотипов ОНП генов врожденного иммунитета и воспалительного ответа

Ген	ОНП rsID	Референсные частоты генотипов из НарМар (CEU), %	Полученные частоты генотипов среди матерей, %	Полученные частоты генотипов среди детей, %	Равновесие Харди-Вайнберга, р(матери)/р(дети)
<i>TLR1</i>	rs5743551	CC – 5,1; CT – 31,3; TT – 63,3	CC – 4,3; CT – 38,3; TT – 57,4	CC – 8,3; CT – 25; TT – 66,7	0,9/0,25
	rs5743618	AA – 6,1; AC – 33,3; CC – 60,6	AA – 10,4; AC – 41,7; CC – 47,9	AA – 8,3; AC – 33,3; CC – 58,3	0,98/0,74
	rs3923647	AA – 0; AT – 2,0; TT – 98,0	AA – 0; AT – 4,2; TT – 95,8	AA – 0; AT – 4,3; TT – 95,7	0,99/0,99
	rs5743610	GG – 98,0; AG – 2,0; AA – 0	GG – 95,8; AG – 4,2; AA – 0	GG – 95,8; AG – 4,2; AA – 0	0,99/0,99
<i>TLR4</i>	rs4986790	AA – 92,9; AG – 6,1; GG – 1,0	AA – 78,7; AG – 21,3; GG – 0	AA – 74,5; AG – 22,9; GG – 2,1	0,72/0,99
	rs1927914	AA – 44,4; AG – 42,4; GG – 13,1	AA – 50,0; AG – 46,8; GG – 4,2	AA – 45,8; AG – 35,4; GG – 18,8	0,54/0,26
	rs7037117	AA – 58,6; AG – 33,3; GG – 8,1	AA – 58,3; AG – 39,6; GG – 2,1	AA – 50,0; AG – 39,6; GG – 10,4	0,55/0,91
<i>MBL2</i>	rs11003125	CC – 15,5; CG – 46,1; GG – 38,4	CC – 10,4; CG – 56,3; GG – 33,3	CC – 22,9; CG – 37,5; GG – 39,6	0,43/0,29
	rs7096206	CC – 58,6; CG – 38,4; GG – 3,0	CC – 52,1; CG – 35,4; GG – 12,5	CC – 60,4; CG – 22,9; GG – 16,7	0,54/0,01
	rs1800450	CC – 72,7; CT – 25,3; TT – 2,0	CC – 59,6; CT – 40,4; TT – 0	CC – 60,0; CT – 40,0; TT – 0	0,22/0,25
<i>PEL11</i>	rs10496105	GG – 76,8; AG – 22,2; AA – 1,0	GG – 83,0; AG – 14,9; AA – 2,1	GG – 81,2; AG – 18,8; AA – 0	0,63/0,77
<i>IL1B</i>	rs1143627	GG – 12,1; AG – 46,5; AA – 41,4	GG – 16,7; AG – 35,4; AA – 47,9	GG – 12,5; AG – 47,9; AA – 39,6	0,33/0,97
<i>IL6</i>	rs1800795	CC – 30,3; CG – 42,4; GG – 27,3	CC – 29,1; CG – 54,2; GG – 16,7	CC – 33,3; CG – 43,8; GG – 22,9	0,79/0,73
	rs2069837	AA – 85,9; AG – 13,1; GG – 1,0	AA – 83,3; AG – 16,7; GG – 0	AA – 79,2; AG – 20,8; GG – 0	0,82/0,72
<i>IL10</i>	rs1800896	TT – 22,2; CT – 51,5; CC – 26,3	TT – 27,1; CT – 54,2; CC – 18,7	TT – 36,9; CT – 48,9; CC – 14,9	0,82/0,99
	rs3024498	TT – 52,2; CT – 41,0; CC – 6,1	TT – 62,5; CT – 31,4; CC – 6,2	TT – 60,4; CT – 31,3; CC – 8,3	0,84/0,62
	rs1554286	AA – 2,0; AG – 29,3; GG – 68,7	AA – 6,2; AG – 25,0; GG – 68,8	AA – 0; AG – 20,8; GG – 79,2	0,46/0,72
<i>TNF</i>	rs1800610	AA – 0; AG – 10,1; GG – 89,9	AA – 0; AG – 33,3; GG – 66,7	AA – 0; AG – 34,0; GG – 66,0	0,38/0,37
<i>IFNG</i>	rs2069718	AA – 14,1; AG – 55,6; GG – 30,3	AA – 21,3; AG – 53,2; GG – 25,5	AA – 22,9; AG – 47,9; GG – 29,2	0,9/0,97
	rs1861493	GG – 7,1; AG – 51,5; AA – 41,4	GG – 14,6; AG – 52,1; AA – 33,3	GG – 16,7; AG – 45,8; AA – 37,5	0,86/0,96

Заключение

Нами разработаны ПЦР тест-системы и подобраны условия реакций для генотипирования некоторых ОНП генов врожденного иммунитета и воспалительного ответа *TLR1, TLR4, MBL2, PELI1, IL1B, IL6, IL10, TNF, IFNG* с целью дальнейшего поиска ассоциативных взаимосвязей с течением и исходами беременностей у женщин с хроническими герпес-вирусными инфекциями, а также наличием патологий развития их новорожденных детей. Благодаря своей простоте и достаточной точности HRM-анализ предпочтителен для генотипирования большинства изученных ОНП.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Источники финансирования

Исследование выполнено в рамках программы фундаментальных исследований Министерства науки и высшего образования РФ (FGWF-2024-0003)

Funding Sources

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the Program for Basic Research (FGWF-2024-0003)

ЛИТЕРАТУРА

1. Rice M., Nicol A., Nuovo G.J. The differential expression of toll like receptors and RIG-1 in the placenta of neonates with in utero infections // *Ann. Diagn. Pathol.* 2023. Vol.62. Article number:152080. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152080>
2. Yockey L.J., Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development // *Immunity.* 2018. Vol.49, Iss.3. P.397–412. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.017>
3. Jedlińska-Pijanowska D., Kasztelewicz B., Czech-Kowalska J., Jaworski M., Charusta-Sienkiewicz K., Dobrzańska A. Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL1, IL12, IL28 and TLR4 and symptoms of congenital cytomegalovirus infection // *PLoS One.* 2020. Vol.15, Iss5. Article number:e0233096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233096>
4. Erali M., Voelkerding K.V., Wittwer C.T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine // *Exp. Mol. Pathol.* 2008. Vol. 85, Iss.1. P.50–88. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.012>
5. Wittwer C.T., Hemmert A.C., Kent J.O., Rejali N.A. DNA melting analysis // *Mol. Aspects Med.* 2024. Vol.97. Article number:101268. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101268>
6. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wangh L.J. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol.101, Iss.7. P.1933–1938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305476101>
7. Sanchez J.A., Abramowitz J.D., Salk J.J., Reis A.H.Jr, Rice J.E., Pierce K.E., Wangh L.J. Two-temperature LATE-PCR endpoint genotyping // *BMC Biotechnol.* 2006. Vol.6. Article number:44. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-44>
8. Программа автоматизированного извлечения и анализа структурированных данных с веб-ресурсов нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК легких: пат. 2024684061 RU / авторы и заявители А.В. Конев, Д.Е. Наумов, Д.А. Гассан, К.А. Дробяскина, Я.Г. Горчакова, И.Ю. Сугайло, О.О. Котова; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; заявл. 25.09.2024; опубл. 14.10.2024. EDN: WWGYZY.

REFERENCES

1. Rice M., Nicol A., Nuovo G.J. The differential expression of toll like receptors and RIG-1 in the placenta of neonates with in utero infections. *Ann. Diagn. Pathol.* 2023; 62:152080. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152080>
2. Yockey L.J., Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity* 2018; 49(3):397–412. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.017>
3. Jedlińska-Pijanowska D., Kasztelewicz B., Czech-Kowalska J., Jaworski M., Charusta-Sienkiewicz K., Dobrzańska A. Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL1, IL12, IL28 and TLR4 and symptoms of congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One* 2020; 15(5):e0233096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233096>
4. Erali M., Voelkerding K.V., Wittwer C.T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp. Mol. Pathol.* 2008; 85(1):50–88. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.012>
5. Wittwer C.T., Hemmert A.C., Kent J.O., Rejali N.A. DNA melting analysis. *Mol. Aspects Med.* 2024; 97:101268. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101268>
6. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wangh L.J. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(7):1933–1938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305476101>
7. Sanchez J.A., Abramowitz J.D., Salk J.J., Reis A.H.Jr, Rice J.E., Pierce K.E., Wangh L.J. Two-temperature LATE-PCR endpoint genotyping. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:44. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-44>

8. Konev A.V., Naumov D.E., Gassan D.A., Drobiaskina K.A., Gorchakova Ya.G., Sugailo I.Y., Kotova O.O. Patent 2024684061 RU. [A program for automated extraction and analysis of structured data from the web resources of nucleotide sequences of DNA and RNA of the lungs]; published 14.10.2024 (in Russian). EDN: WWGYZY.

Информация об авторах:

Олеся Олеговна Некрасова, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория механизмов вирус-ассоциированных патологий развития, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук, зав. лабораторией механизмов вирус-ассоциированных патологий развития, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dani-shi@mail.ru

Андрей Викторович Конеv, аспирант, младший научный сотрудник, лаборатория механизмов вирус-ассоциированных патологий развития, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: andrkonev@vk.com

Ксения Анатольевна Конеvа, лаборант-исследователь, лаборатория механизмов вирус-ассоциированных патологий развития, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dr.ksy@mail.ru

Author information:

Olesya O. Nekrasova, PhD (Med.), Senior Staff Scientist, Laboratory of Mechanisms of Virus-Associated Developmental Pathologies, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Dina A. Gassan, PhD (Med.), Head of Laboratory, Laboratory of Mechanisms of Virus-Associated Developmental Pathologies, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dani-shi@mail.ru

Andrey V. Konev, Postgraduate Student, Junior Staff Scientist, Laboratory of Mechanisms of Virus-Associated Developmental Pathologies, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: andrkonev@vk.com

Kseniya A. Koneva, Assistant Researcher, Laboratory of Mechanisms of Virus-Associated Developmental Pathologies, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dr.ksy@mail.ru

Поступила 27.10.2025
Принята к печати 01.12.2025

Received October 27, 2025
Accepted December 01, 2025
