

НАДЕЖНАЯ И ВОСПРОИЗВОДИМАЯ МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ОТ-ПЦР-РВ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *mTOR*

Д. О. Корнилов¹✉, В. М. Симарзина¹, А. А. Бехтер¹, Г. П. Маслаков², Д. М. Нечаева¹, А. Е. Карякина¹, Ф. А. Фадеев^{1,3}, Е. С. Ворошилина^{1,4}, Д. Л. Зорников¹

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

⁴ Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR — ключевой регулятор роста клеток, его дисрегуляция вовлечена в онкогенез. Существующие способы оценки активности *mTOR* имеют недостатки дизайна. Целью работы было разработать и провести валидацию новой мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ-тест-системы для относительного количественного анализа экспрессии гена *mTOR* с нормализацией на гены *RPLP0* и *TBP*. Праймеры и зонды сконструированы *in silico*. Валидацию проводили на клеточной линии стромальных клеток костного мозга человека SCP-1. Специфичность оценивали в 10 сепарированных и 10 мультиплексных постановках. Аналитическую чувствительность и эффективность определяли по 27 техническим повторам с использованием протокола без элонгации. Специфичность амплификации оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле, а количественный анализ выполняли в режиме реального времени по каналам флуоресценции FAM (*mTOR*), HEX (*RPLP0*) и ROX (*TBP*). Тест показал 100%-ю специфичность. Стабильная детекция достигалась при 125 тыс. клеток/мл. Эффективность амплификации составила 73–81%. Вариация экспрессии *mTOR*, нормализованной на *RPLP0*, составила от –21,5 до 26,4%, по *TBP* от –14,3 до 19%. Нормализация на среднее геометрическое двух генов обеспечила лучшую воспроизводимость от –9 до 23,4%. Разработанный тест отличается высокой специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью, что делает его надежным инструментом для последующих клинических исследований.

Ключевые слова: профилирование экспрессии генов, молекулярная диагностика, мультиплексная полимеразная цепная реакция, воспроизводимость результатов, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, TOR-серин-треониновые киназы

Благодарности: авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора за помощь в организации работы.

Вклад авторов: Д. О. Корнилов — разработка концепции, методология, написание рукописи; В. М. Симарзина — проведение экспериментов, методология, визуализация; А. А. Бехтер — проведение экспериментов, визуализация; Г. П. Маслаков — проведение экспериментов, программное обеспечение, валидация; Д. М. Нечаева, А. Е. Карякина — методология, рецензирование и редактирование рукописи; Ф. А. Фадеев — ресурсы, рецензирование и редактирование рукописи; Е. С. Ворошилина — научное руководство, администрирование проекта; Д. Л. Зорников — научное руководство, визуализация, формальный анализ, рецензирование и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург (протокол № 6 от 18 октября 2024 г.). В работе использовали коммерческие клеточные линии.

✉ **Для корреспонденции:** Даниил Олегович Корнилов
ул. Ключевская, д. 17, г. Екатеринбург, 620109; danilovkornil@gmail.com

Статья получена: 11.03.2026 **Статья принята к печати:** 25.03.2026 **Опубликована онлайн:** 31.03.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.011

Авторские права: © 2026 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A RELIABLE AND REPRODUCIBLE MULTIPLEX RT-QPCR ASSAY FOR *mTOR* GENE EXPRESSION ANALYSIS

Kornilov DO¹✉, Simarzina VM¹, Bekhter AA¹, Maslakov GP², Nechaeva DM¹, Kariakina AE¹, Fadeev FA^{1,3}, Voroshilina ES^{1,4}, Zornikov DL¹

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³ State Autonomous Health Institution of the Sverdlovsk Region "Center for Specialized Types of Medical Care "Institute of Medical Cellular Technologies", Yekaterinburg, Russia

⁴ Medical Center "Garmoniya", Yekaterinburg, Russia

The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is a key regulator of cell growth, and its dysregulation is involved in oncogenesis. Existing methods for assessing *mTOR* activity have design flaws. The aim of this work was to develop and validate a novel multiplex RT-qPCR assay for relative quantification of *mTOR* gene expression normalized to *RPLP0* and *TBP*. Primers and probes were designed *in silico*. Validation was performed using the human SCP-1 cell line. Specificity was assessed in 10 separate and 10 multiplex runs. Analytical sensitivity and efficiency were determined from 27 technical replicates using a protocol without an elongation step. Specificity of amplification was assessed by agarose gel electrophoresis, and quantitative analysis was performed in real-time PCR using FAM (*mTOR*), HEX (*RPLP0*), and ROX (*TBP*) fluorescence channels. The assay showed 100% specificity. Stable detection was achieved at 125,000 cells/mL. Amplification efficiencies were 73–81%. The variation of *mTOR* expression normalized to *RPLP0* ranged from –21.5% to 26.4%, and normalized to *TBP* from –14.3% to 19.2%. Normalization to the geometric mean of both reference genes provided the best reproducibility, with an interquartile range from –9% to 23.4%. The developed assay demonstrates high specificity, sensitivity, and reproducibility, making it a reliable tool for subsequent clinical research.

Keywords: gene expression profiling, molecular diagnostics, multiplex polymerase chain reaction, reproducibility of results, reverse transcriptase polymerase chain reaction, TOR serine-threonine kinases

Acknowledgments: The authors express their gratitude to the staff of the Laboratory of Enteric Viral Infections, Federal Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" of Rosпотребнадзор, for their assistance in organizing the work.

Author contribution: Kornilov DO — conceptualization, methodology, writing — original draft; Simarzina VM — investigation, methodology, visualization; Bekhter AA — investigation, visualization; Maslakov GP — investigation, software, validation; Nechaeva DM — methodology, writing — review and editing; Kariakina AE — methodology, writing — review and editing; Fadeev FA — resources, writing — review and editing; Voroshilina ES — supervision, project administration; Zornikov DL — supervision, visualization, formal analysis, writing — review and editing.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Local Ethical Committee of the Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia (Protocol No. 6 dated October 18, 2024). Informed consent was not applicable, as commercial cell lines were used.

✉ **Correspondence should be addressed:** Daniil O. Kornilov
Klyuchevskaya, 17, Yekaterinburg, 620109, Russia; danilovkornil@gmail.com

Received: 11.03.2026 **Accepted:** 25.03.2026 **Published online:** 31.03.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.011

Copyright: © 2026 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) / протеинкиназа В (АКТ) / мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) играет ключевую роль в регуляции таких клеточных процессов, как пролиферация и метаболизм, при этом киназа mTOR выступает в качестве его центрального эффектора [1, 2]. Нарушение регуляции этого пути вовлечено в широкий спектр патологий — от прогерии и туберозного склероза до неврологических расстройств и рака, включая рак молочной железы, для которого гиперэкспрессия mTOR является одним из ключевых механизмов прогрессии [1, 3–5]. В связи с этим изучение механизмов передачи сигнала mTOR вызывает значительный интерес в различных областях науки, включая онкологию, исследования старения и нейробиологию [6–8].

Столь важная роль выдвигает mTOR в качестве приоритетной мишени для разработки терапевтических стратегий, направленных на нормализацию гомеостаза данного сигнального пути, и это направление активно разрабатывается научным сообществом [9]. В нашем предыдущем исследовании мы продемонстрировали, что miR-162a подавляет пролиферацию и жизнеспособность клеток остеосаркомы, предположительно, за счет ингибирования экспрессии гена mTOR [10]. Однако отсутствие надежного метода оценки экспрессии mTOR не позволило напрямую верифицировать данный механизм, что послужило стимулом для разработки описываемой тест-системы.

Высокий интерес к изучению регуляции mTOR и его функций обуславливает потребность в надежных методах оценки его активности. Традиционные подходы, такие как вестерн-блоттинг [11] и люминесцентная микроскопия [12], несмотря на свою достоверность, отличаются высокой стоимостью, сложностью исполнения и зависимостью результатов от квалификации оператора.

Альтернативой прямому измерению уровня белка служит оценка экспрессии соответствующего гена путем количественного определения мРНК методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием референсных генов. В качестве последних, как правило, выступают так называемые гены «домашнего хозяйства», характеризующиеся стабильной экспрессией в большинстве типов клеток как в норме, так и при патологии. Примерами таких генов служат гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), бета-актина (ACTB), бета-2-микроглобулина (B2M), TATA-связывающий белок (TBP) и рибосомный белок Р0 (RPLP0) [13, 14].

В предложенной ранее мультиплексной ПЦР-тест-системе для анализа экспрессии mTOR [15] использовались референсные гены TBP и RPLP0, относящиеся к числу наиболее стабильных из известных на сегодняшний день [14]. Однако фундаментальным недостатком дизайна этой системы является перекрытие последовательностей зонда и одного из праймеров для гена TBP, что ставит под сомнение надежность получаемых с ее помощью результатов и подчеркивает необходимость создания корректно сконструированной альтернативы [13, 15, 16].

Целью настоящей работы стали разработка и валидация новой мультиплексной тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ для относительного количественного анализа экспрессии гена mTOR с нормализацией на референсные гены TBP и RPLP0.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

In silico дизайн и анализ ПЦР-тест-системы

Последовательности мРНК целевых генов (в формате FASTA) были получены из базы данных Nucleotide NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Транскрипты были аннотированы с использованием инструмента Assemble by CDS в программном обеспечении Geneious Prime 2019.2.1 (Biomatters Ltd., США). Праймеры и зонды сконструированы с помощью веб-сервиса PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., США; <https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>). Для дизайна праймеров использовали следующие критерии отбора [17]:

- специфичность — праймеры комплементарны уникальному участку гена-мишени;
- длина около 20 нуклеотидов;
- GC-состав (доля гуанина и цитозина) около 50%;
- наличие не менее одной пары G/C на 3'-конце каждого праймера;
- отсутствие комплементарных участков между праймерами, исключающее образование димеров;
- температура плавления (Tm) праймеров в диапазоне 55–65 °С.

К зондам предъявляли следующие требования:

- длина около 20 нуклеотидов;
- GC-состав (доля гуанина и цитозина) около 50%;
- отсутствие участков с четырьмя и более последовательными повторами G или C (поли-G/поли-C участков);

– зонд располагается как можно ближе к праймерам, но не пересекается с ними;

– Tm зонда должна превышать Tm праймеров на 8–10 °С.

Анализ специфичности праймеров, их расположения относительно экзон-интронной структуры («flanking» и «spanning») был выполнен в программе Geneious Prime 2019.2.1 с использованием алгоритма BLAST. Образование димеров праймеров проверяли с помощью веб-сервиса OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., США; <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) [17].

Валидация ПЦР-тест-системы *in vitro*

Клеточная линия

В исследовании использовали линию стромальных клеток костного мозга человека SCP-1, полученную из Коллекции клеточных культур Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия). Клетки культивировали во флаконах T-25 (Sarstedt, Германия) с адгезивным покрытием в среде, содержащей 94% базальной среды LoSera (HiMedia, Индия), 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HiMedia, Индия), 0,01% L-глутамин (Servicebio, Китай) и 0,01% (1 : 1 : 1) раствора пенициллина, стрептомицина и амфотерицина В (Servicebio, Китай), в CO₂-инкубаторе (Panasonic (Sanyo) MCO-15A, Япония) при 5% CO₂ и 37 °С [10]. По достижении 90–100% конfluence клетки пассировали: удаляли использованную среду, дважды промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS) без ионов Ca и Mg (Servicebio, Китай), затем добавляли 2,5 мл 0,25%-го раствора трипсин-ЭДТА (Servicebio, Китай). Раствор удаляли через 10 с экспозиции. Флакон помещали в CO₂-инкубатор на 1 мин 30 с. После добавления свежей среды с сывороткой отслоившиеся клетки

собирали, центрифугировали при 350 g в течение 3 мин, ресуспендировали и распределяли по новым флаконам в соотношении 1 : 3 [18]. Для данного исследования готовили суспензию клеток, как описано выше, и подсчитывали клетки в камере Горяева с использованием метода исключения трипанового синего.

Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения тотальной РНК, содержащей фракцию мРНК, суспензию клеток (1 млн клеток/мл) помещали в пробирку Eppendorf объемом 1,5 мл и титровали двукратными разведениями в физиологическом растворе для получения образцов с концентрациями 1 млн, 500 тыс., 250 тыс., 125 тыс. и 62,5 тыс. клеток/мл. РНК выделяли из всех разведений для расчета аналитических параметров ПЦР-теста.

Выделение РНК из образцов клеточных культур проводили с использованием набора реагентов «Проба-НК» («ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. После выделения тотальную РНК из суспензии 1 млн клеток/мл также последовательно двукратно разводили в физиологическом растворе для получения образцов с концентрациями матрицы 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 и 1 : 16. Все варианты концентраций РНК-матрицы использовали для амплификации с целью валидации ПЦР-теста и расчета эффективности ПЦР.

Амплификация

Для анализа специфичности продукта амплификации было выполнено 10 отдельных технических повторов ОТ-ПЦР-РВ для каждого гена с использованием наборов реагентов «BioMaster RT-qPCR SYBR Blue» («Биолабмикс», Россия). Использовали неразведенную РНК-матрицу из суспензии 1 млн клеток/мл. Праймеры и зонды, соответствующие разработанным последовательностям, были синтезированы в ООО «ДНК-синтез», Россия. Согласно протоколу производителя, реакционные смеси готовили из 12,5 мкл «Реакционного буфера» (содержащего смесь дНТФ, ионы Mg и SYBR Green), 1 мкл «Реакционной смеси» (содержащей генетически модифицированную обратную транскриптазу вируса лейкоза мышей Молони и рекомбинантную Taq-ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами), 5 мкл смеси с зондом, прямым и обратным праймерами (каждый по 0,12 мкмоль/л, 3 пмоль/реакция) и 6,5 мкл РНК-матрицы. Конечный объем реакции составлял 25 мкл.

Дополнительно было выполнено 10 мультиплексных технических повторов (амплификация целевого гена и нормализаторов в одной пробирке) с использованием наборов реагентов «BioMaster RT-qPCR» («Биолабмикс», Россия). Реакционные смеси готовили, как описано выше, за исключением того, что реакционный буфер не содержал интеркалирующего красителя. Детекцию продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в горизонтальном агарозном геле.

Для оценки аналитических характеристик (эффективности, чувствительности и воспроизводимости) использовали схему разведений, описанную в разделе «Выделение нуклеиновых кислот». Эта схема включала как преаналитические (разведения клеток), так и аналитические (разведения РНК-матрицы) переменные, что позволило одновременно оценить эффективность амплификации, аналитическую чувствительность и техническую

воспроизводимость. Все полученные образцы РНК — из пяти различных концентраций клеток и четырех серийных разведений — были проанализированы в трех повторах с использованием описанного ниже мультиплексного протокола ОТ-ПЦР-РВ. Было включено три повтора отрицательного контроля. Этот дизайн в общей сложности дал 27 индивидуальных реакций (девять уникальных типов образцов × три повтора) (рис. 1). Результаты этих 27 технических повторов сформировали основной набор данных для всех последующих расчетов эффективности ПЦР, стабильности референсных генов и технической вариабельности.

Протокол амплификации состоял из обратной транскрипции в течение 30 мин при 45 °С, начальной денатурации в течение 5 мин при 95 °С с последующими 45 циклами денатурации (15 с при 95 °С) и отжига праймеров (30 с при 68 °С). Стадия элонгации была исключена из протокола амплификации, чтобы ограничить

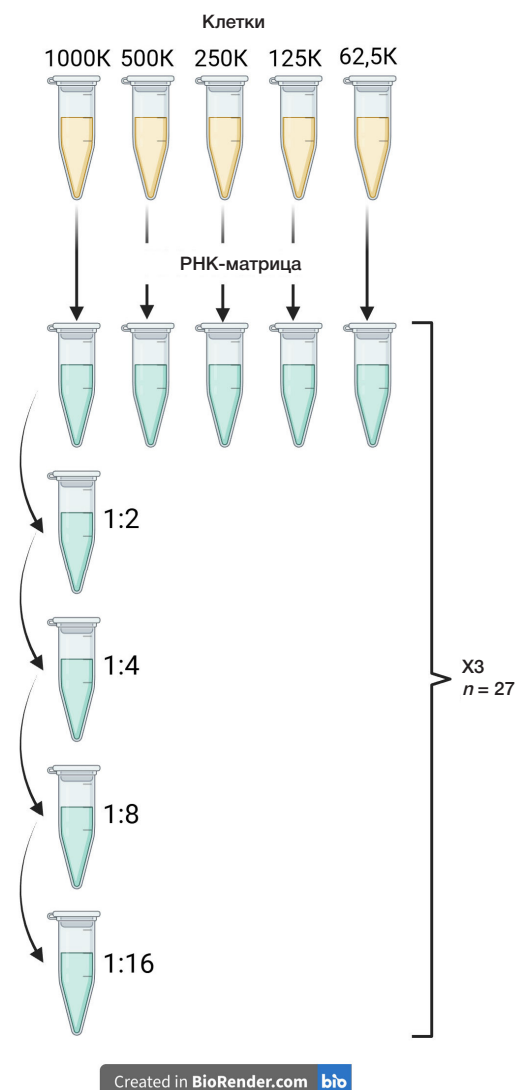


Рис. 1. Дизайн эксперимента для валидации мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ-тест-системы. Схема иллюстрирует две независимые серии разведений, использованные для оценки характеристик теста. Преаналитическая серия (желтый цвет) включала выделение тотальной РНК из клеток SCP-1 при пяти различных исходных концентрациях. Аналитическая серия (синий цвет) была создана путем двукратного серийного разведения РНК, выделенной из самой высокой концентрации клеток. Каждый полученный образец РНК ($n = 9$) анализировали в трех повторах, что в сумме составило 27 индивидуальных реакций для оценки эффективности ПЦР, аналитической чувствительности и технической воспроизводимости

амплификацию геномной ДНК [19]. Для детекции продуктов амплификации *mTOR*, *RPLP0* и *TBP* в реальном времени были выбраны каналы флуоресценции FAM, HEX и ROX соответственно.

Детекцию в режиме реального времени проводили по значению Crossing Point (C_p), которое рассчитывается программным обеспечением прибора, как номер цикла, соответствующий максимуму второй производной кривой роста флуоресценции [20]. Поскольку данное исследование было сфокусировано на относительном количественном анализе экспрессии генов с использованием сравнительного метода, внешние калибровочные кривые не использовались одновременно с экспериментальными образцами. Результат считали валидным, если значение C_p детектировалось до 31-го цикла амплификации. Выбор данного порога обоснован экспериментально: при использовании протокола, включавшего стадию элонгации, начиная с 31 цикла в реакциях наблюдалось появление дополнительных продуктов амплификации, которые при электрофоретическом анализе соответствовали по длине фрагменту, амплифицированному с матрицы геномной ДНК (574 п.н., размер интрона). Исключение стадии элонгации из протокола позволило устранить данную неспецифическую амплификацию, и все сигналы, детектируемые после 31 цикла, более не наблюдались. Таким образом, порог в 31 цикл был установлен как граница, за которой гарантированно отсутствует вклад от амплификации геномной ДНК.

Все постановки выполняли на амплификаторе «ДТпрайм» («ДНК-Технология», Россия) с программным обеспечением производителя.

Электрофорез в агарозном геле

2,5%-й агарозный гель готовили разбавлением 2,5 г порошка агарозы (Helicon, Россия) в 100 мл 1× TBE буфера («Биолабмикс», Россия) с добавлением 3 мкл бромистого этидия (Servicebio, Китай). Электрофорез проводили при 100 В в горизонтальной камере для электрофореза Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, США) в течение 40 мин. Результаты анализировали на УФ-трансиллюминаторе (Vilber, Франция) с использованием маркера ДНК 10–25 (Servicebio, Китай). Изображения фиксировали в цифровом формате и обрабатывали в Adobe Photoshop CC 26.11 (Adobe Inc., США).

Статистический анализ

Значение экспрессии определяли на основе значения C_p с использованием формулы «Fold Change» (FC), представленной Livak и Schmittgen [22]. Формула имела следующий вид:

$$FC = 2^{-\Delta C_p}, \Delta C_p = C_{p_{\text{target}}} - C_{p_{\text{reference}}}$$

где $C_{p_{\text{target}}}$ — значение C_p целевого гена, а $C_{p_{\text{reference}}}$ — значение C_p нормализатора.

Для анализа значение ΔC_p рассчитывали с использованием каждого нормализатора по отдельности (*RPLP0* или *TBP*), а также с использованием среднего геометрического значений C_p обоих нормализаторов в качестве комбинированного референсного значения.

Эффективность ПЦР для гена *mTOR* и референсных генов оценивали с помощью линейной регрессии зависимости значения C_p от \log_2 клеточного эквивалента (CE). Этот показатель представляет собой теоретическое

количество клеток, которому соответствует количество РНК, внесенной в реакцию, с учетом разведения как исходной клеточной суспензии, так и выделенной РНК. Корреляцию между CE в образце и значением C_p оценивали с использованием коэффициента корреляции Спирмена (ρ , считали статистически значимым при $p < 0,05$). Эффективность амплификации для каждого гена рассчитывали исходя из угла наклона (b) линии линейной регрессии, построенной для зависимости значения C_p от \log_2 CE.

Регрессионный анализ дал следующее уравнение для каждого гена:

$$y = a - b \cdot x,$$

где y — предсказанное значение C_p , a — пересечение с осью Y , b — наклон линии регрессии, а x — $\log_2(N)$, где N — рассчитанный CE.

CE рассчитывали как:

CE = начальная концентрация клеток ÷ разведение клеток ÷ разведение матрицы.

Для оценки стабильности референсных генов анализировали распределение уровня экспрессии гена *mTOR*, нормализованного на каждый из этих генов (показатель FC). Распределение описывали с помощью медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля).

Техническую вариабельность показателя FC для гена *mTOR*, рассчитанного с использованием одного или нескольких референсных генов, оценивали, анализируя распределение значений коэффициента вариабельности. Полученное распределение описывали с помощью медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля). Данный коэффициент для каждого образца вычисляли по следующей формуле:

значение вариабельности = $1 - (mTOR \text{ FC образца} / \text{среднее } mTOR \text{ FC})$.

Значения относительной экспрессии гена *mTOR* (FC) были рассчитаны с использованием трех различных стратегий нормализации: по отдельности на гены *RPLP0* и *TBP*, а также на среднее геометрическое их значений.

Весь анализ и построение графиков выполняли в среде R, версия 4.5.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

In silico дизайн и анализ ПЦР-тест-системы

Во избежание амплификации геномной ДНК при разработке олигонуклеотидов руководствовались двумя подходами: интрон-перекрывающим (flanking) и экзон-перекрывающим (spanning). В первом случае праймеры подбирались к последовательностям разных экзонов, фланкирующих крупный интрон; во втором — один из праймеров или гидролизный зонд перекрывал границу сплайсинга двух соседних экзонов.

Для *in silico* верификации соответствия олигонуклеотидов указанным критериям были загружены нуклеотидные последовательности генов *mTOR* (NM_004958.4), *RPLP0* (NM_001002.4) и *TBP* (NM_003194.5) в формате FASTA. В качестве референсных использовали последовательности

Таблица. Характеристики олигонуклеотидов для мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ-тест-системы

Праймер	Ген	Последовательность, 5' → 3'	Длина ампликона, п.н.	Температура плавления, °С	GC%	Канал
Прямой	<i>mTOR</i>	GCCCAGGCCGCATTGTCTCTAT	84	68	59.1	FAM
Обратный		GCAGTAAATGCAGGTAGTCATCCAGGTT		73	60.0	
Зонд		TGGCTGCAATCCAGCTGTTTGGCGC		68	46.4	
Прямой	<i>RPLP0</i>	GGCGACCTGGAAGTCCAACATA	149	66	57.1	HEX
Обратный		CCATCAGCACACAGCCTTC		65	60.0	
Зонд		ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA		72	56.0	
Прямой	<i>TBP</i>	CACGAACCACGGCACTGATT	89	65	55.0	ROX
Обратный		TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC		65	50.0	
Зонд		TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGAAGA		69	52.0	

Примечание: *mTOR* — мишень рапамицина млекопитающих, *RPLP0* — рибосомный белок Р0, *TBP* — ТАТА-связывающий белок. Все олигонуклеотиды разработаны в соответствии со стандартными критериями для мультиплексной ПЦР в реальном времени: длина ампликона <150 п.н., согласованные температуры плавления в пределах каждого набора, оптимальный GC-состав, использование различных неперекрывающихся каналов детекции.

хромосом 1 (NC_000001.11), 12 (NC_000012.12) и 6 (NC_000006.12), несущих целевые гены. Аннотация хромосомных последовательностей позволила установить экзон-интронную структуру исследуемых локусов.

На основе полученных данных об экзонной структуре была проведена оценка праймеров и зондов для генов *mTOR* и *RPLP0*, описанных ранее [16]; эффективность данных была подтверждена. Для гена *TBP* разработано 10 наборов праймер-зонд, из которых отобрана наиболее специфичная комбинация. Последовательности и параметры олигонуклеотидов представлены в таблице.

Предложенные стратегии нормализации и дизайна олигонуклеотидов были верифицированы *in silico*. Для генов *mTOR* и *RPLP0* подтверждено фланкирование праймерами экзон-экзонных границ (экзоны 21–22 и 2–3 соответственно, стратегия flanking), а для гена *TBP* — перекрывание зондом интрона между экзонами 5 и 6 (стратегия spanning), что гарантирует отсутствие амплификации геномной ДНК. Согласно референсным

последовательностям NCBI (NM_004958.4, NM_001002.4, NM_003194.5), праймеры и зонды локализованы на CDS следующим образом: для *mTOR* — прямой праймер 3381–3402, зонд 3411–3435, обратный праймер 3437–3464; для *RPLP0* — прямой праймер 95–115, зонд 181–205, обратный праймер 224–243; для *TBP* — прямой праймер 863–882, зонд 902–926, обратный праймер 930–951.

Кроме того, анализ межпраймерных взаимодействий не выявил стабильных димерных структур, о высокой специфичности разработанных систем.

Валидация ПЦР-тест-системы *in vitro*

При оценке специфичности продуктов амплификации во всех исследованных образцах (10 отдельных и 10 мультиплексных технических повторов для каждого гена) детектировался один четкий продукт, соответствующий расчетной длине ампликона (таблица). Побочных или неспецифических полос при электрофорезе не наблюдали

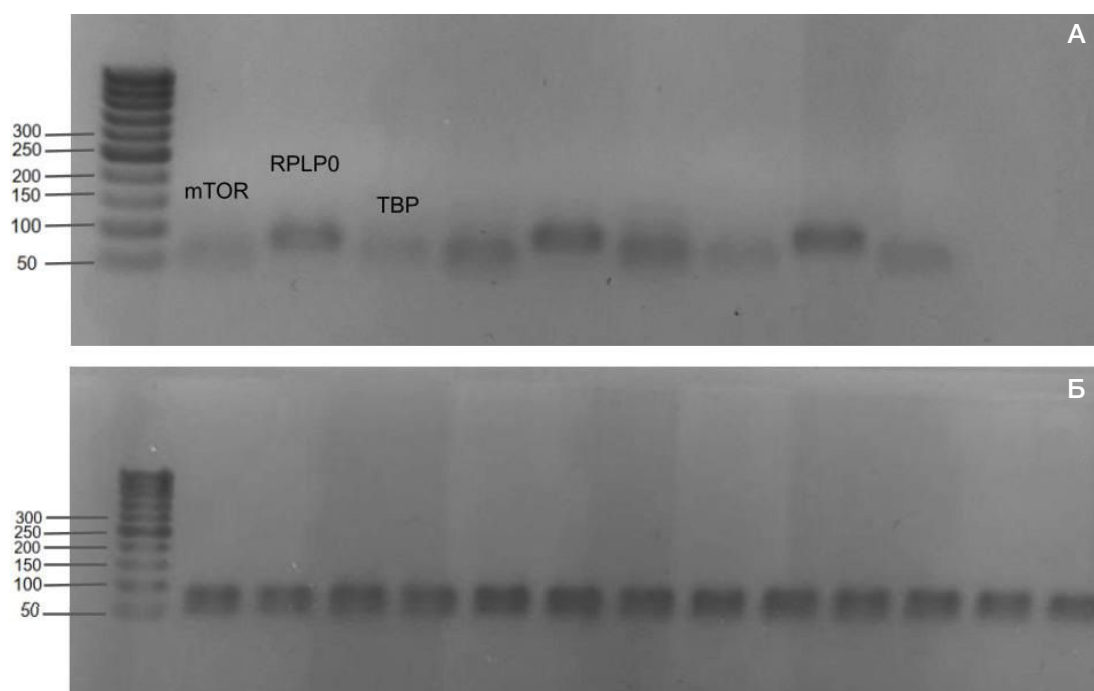


Рис. 2. Результаты анализа специфичности продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле. **А.** Моноплексные реакции: отдельные технические повторы ОТ-ПЦР-РВ для каждого гена. **Б.** Мультиплексные реакции: технические повторы с одновременной амплификацией всех трех мишеней. Для каждого гена детектируется единственная полоса, соответствующая ожидаемому размеру ампликона, что свидетельствует о высокой специфичности разработанной тест-системы

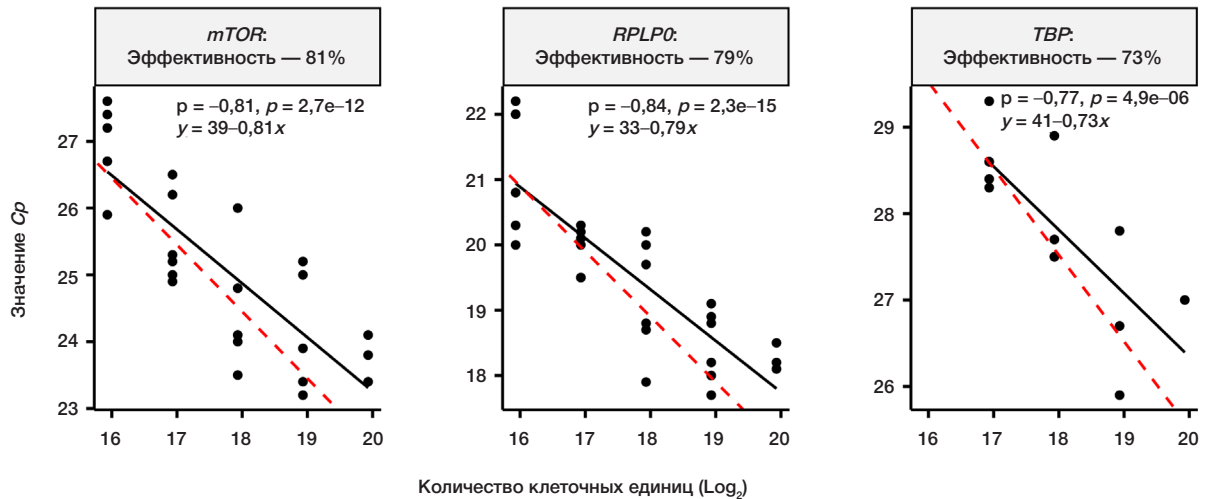


Рис. 3. Эффективность амплификации целевого гена *mTOR* и референсных генов *RPLP0* и *TBP*. Анализ эффективности амплификации для генов *mTOR*, *RPLP0* и *TBP*: графики линейной регрессии значений Crossing Point (Cp) в зависимости от log₂ клеточного эквивалента. Экспериментальная эффективность амплификации составила 81% для *mTOR* (уравнение регрессии: $y = 39 - 0,81x$), 79% для *RPLP0* ($y = 33 - 0,79x$) и 73% для *TBP* ($y = 41 - 0,73x$). Пунктирная красная линия представляет теоретическую 100%-ю эффективность амплификации (наклон = -1), когда значение Cp уменьшается на единицу при каждом двукратном увеличении концентрации клеток; сплошные черные линии показывают фактические линии регрессии; черные точки — отдельные точки данных из мультиплексных технических повторов ОТ-ПЦР-РВ

(рис. 2). Таким образом, аналитическая специфичность теста составила 100%. При исследовании серийных разведений клеток стабильная детекция всех трех генов достигалась при минимальной концентрации 125 тыс. клеток/мл.

Для оценки эффективности амплификации были построены графики линейной регрессии зависимости значения Cp от значения log₂ клеточного эквивалента (CE) (рис. 3).

Анализ линейной регрессии выявил сильную обратную корреляцию между количеством клеток и пороговым циклом (Cp) для всех исследуемых генов. Коэффициенты корреляции Спирмена составили -0,81 для *mTOR*, -0,84 для *RPLP0* и -0,77 для *TBP* ($p < 0,05$ во всех случаях), что свидетельствует о статистически значимой зависимости.

Эффективность амплификации, рассчитанная по углу наклона калибровочных кривых, для гена *mTOR* составила 81%, для *RPLP0* — 79%, для *TBP* — 73%. Полученные значения свидетельствуют о высокой эффективности амплификации, при этом экспериментальные кривые описывались уравнениями: $y = 39 - 0,81x$ для *mTOR*,

$y = 33 - 0,79x$ для *RPLP0* и $y = 41 - 0,73x$ для *TBP*. Близость экспериментальных наклонов к теоретическому значению ($b = -1$, соответствующему 100% эффективности) подтверждает пригодность подобранных олигонуклеотидов для количественного анализа.

Оценка стабильности референсных генов, проведенная на 27 мультиплексных технических повторах, выявила существенные различия в характере нормализации. При использовании гена *RPLP0* медиана относительной экспрессии *mTOR* (FC) составила 0,02 (межквартильный размах: 0,02–0,03), что указывает на более высокий уровень экспрессии *RPLP0* по сравнению с *mTOR* в исследуемых образцах. Напротив, при нормализации на *TBP* медиана FC *mTOR* достигла 9,85 (межквартильный размах: 8,57–12,13), отражая существенно более низкую экспрессию *TBP* относительно *mTOR* (рис. 4).

Для оценки вариабельности между техническими повторами было рассчитано отклонение значений FC *mTOR* от среднего для каждого образца. При нормализации на единственный референсный ген медианное отклонение составило -2,3% (межквартильный размах: от -21,5 до

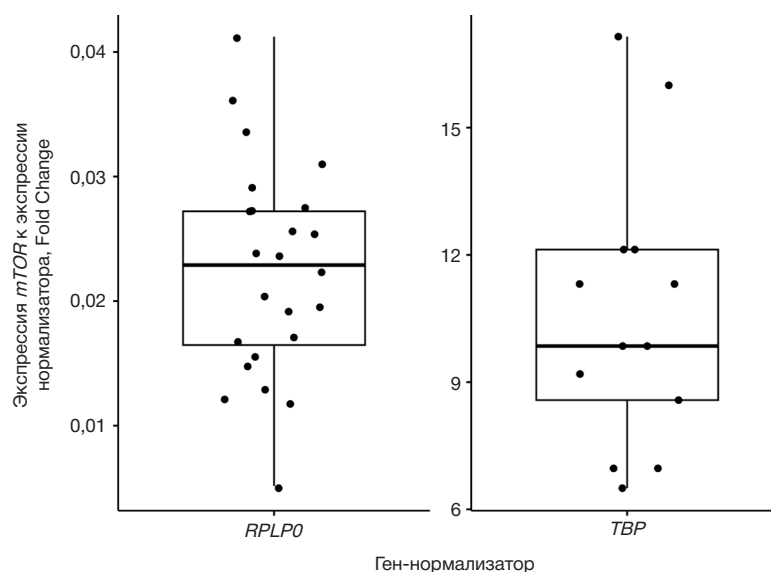


Рис. 4. Экспрессия *mTOR* в клетках SCP-1. Экспрессия *mTOR* стабильно ниже *RPLP0*, но выше *TBP*

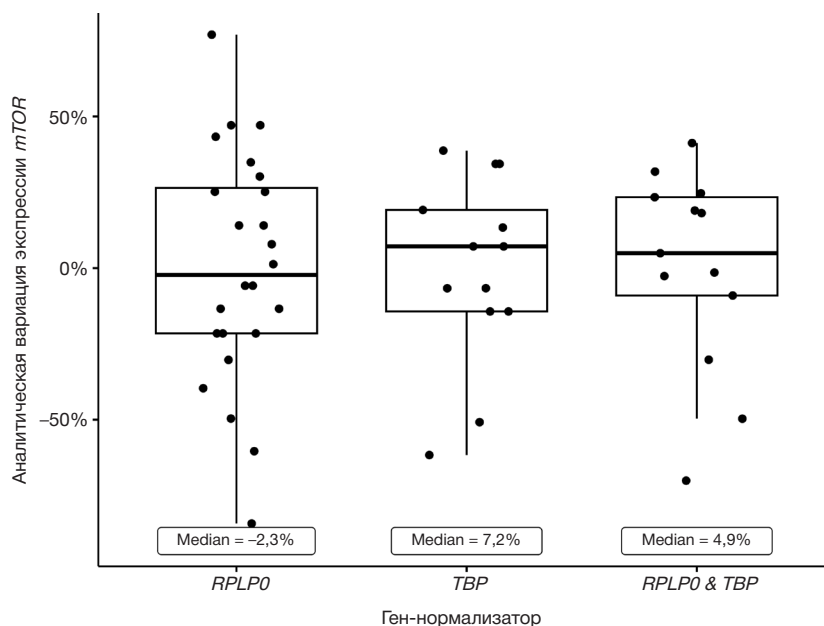


Рис. 5. Оценка аналитической воспроизводимости при различных стратегиях нормализации. Процентное отклонение значений FC $mTOR$ для каждого образца от общей медианы. Показана воспроизводимость результатов при нормализации экспрессии $mTOR$ на $RPLPO$, на TBP и на их среднее геометрическое ($RPLPO$ и TBP). Снижение варибельности (более узкий интерквартильный размах) достигается при использовании двух референсных генов одновременно

26,4%) для $RPLPO$ и 7,2% (межквартильный размах: от $-14,3$ до $19,2\%$) для TBP . Использование среднего геометрического обоих генов позволило снизить разброс данных: медианное отклонение составило 4,9%, а межквартильный размах сузился до интервала от $-9,0$ до $23,4\%$ (рис. 5). Таким образом, нормализация на среднее геометрическое $RPLPO$ и TBP обеспечивает наименьшую варибельность результатов и, следовательно, наиболее высокую воспроизводимость количественной оценки экспрессии гена $mTOR$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании нами была успешно разработана и валидирована мультиплексная ПЦР-тест-система для количественного определения уровня экспрессии гена $mTOR$ с нормализацией на референсные гены TBP и $RPLPO$. На этапе *in silico* анализа были проведены тщательный отбор и проверка праймеров и зондов по критериям специфичности, термодинамических параметров и отсутствия стабильных димеров. Критически важным достижением стало устранение недостатка ранее опубликованной системы [15] — перекрытия последовательностей зонда и праймера для гена TBP , которое ставило под сомнение надежность получаемых с ее помощью результатов. Предлагаемая нами тест-система полностью решает эту проблему.

Доклиническая валидация подтвердила высокую аналитическую специфичность (100%) с детекцией единственного специфичного продукта для каждой мишени. Достигнутая аналитическая чувствительность (125 тыс. клеток/мл) является достаточной для работы с большинством типов клинических образцов, включая биоптаты опухолей, и сопоставима с чувствительностью коммерческих наборов для количественной ПЦР.

Эффективность амплификации для всех трех генов находилась в диапазоне от 73 до 81%. Этот диапазон объясняется двумя ключевыми методологическими решениями, принятыми для обеспечения клинической применимости тест-системы. Во-первых, валидацию

протокола проводили с использованием широко распространенного набора для выделения РНК («Проба-НК»), чтобы максимально приблизить условия эксперимента к реальной диагностической практике; получаемая при этом чистота РНК, будучи репрезентативной для рутинных условий, может влиять на эффективность амплификации [23]. Во-вторых, для исключения риска амплификации контаминирующей геномной ДНК, остатки которой не полностью удаляются даже современными методами выделения, мы исключили стадию элонгации из протокола ПЦР [19]. Эта мера предосторожности особенно актуальна с учетом высокой процессивности современных Taq-полимераз [24]. Несмотря на эти необходимые компромиссы, специфичность тест-системы сохранилась на уровне 100%, а достигнутая эффективность является приемлемой для относительного количественного анализа [22]. Дальнейшая оптимизация, например, тонкая настройка концентраций праймеров, может позволить еще больше повысить эффективность.

Несмотря на удовлетворительные медианные значения, межквартильные размахи остаются относительно широкими. Это объясняется использованием метрики Fold Change, основанной на экспоненциальной формуле ($2^{-\Delta\Delta C_p}$), которая усиливает влияние даже небольших изменений исходных уровней экспрессии на величину процентной варибельности. Данный эффект является ожидаемым для относительного количественного ПЦР-анализа и подтверждается тем, что исходные различия значений C_p варьировали в пределах одного цикла. Полученные диапазоны аналитической вариации FC полностью соответствуют данным большинства опубликованных исследований по разработке наборов для относительной количественной ПЦР без использования абсолютных стандартов и согласуются с результатами фундаментальных работ [22, 25]. Так, имеются сообщения о значениях технической вариации FC от 23 до 52% в зависимости от количества технических повторов [26].

Ключевым преимуществом данной работы является проведение строгой аналитической валидации на стандартизированной клеточной линии. Использование

клеток SCP-1 обеспечило гомогенную и контролируруемую систему, свободную от преаналитических переменных, присущих клиническим образцам (таких как гетерогенность ткани или переменное качество РНК). Это позволило точно определить внутренние аналитические параметры ПЦР-теста — специфичность, чувствительность и воспроизводимость — без влияния мешающих биологических факторов. Продемонстрированная надежность разработанной ПЦР-тест-системы является обязательным условием для ее успешного применения при анализе более сложных типов биоматериала, таких как ткани опухолей человека, что станет следующим этапом исследования.

Разработанный мультиплексный ОТ-ПЦР-тест представляет собой прямой и воспроизводимый инструмент для оценки экспрессии *mTOR*, отражающий интегративную активность сигнального пути PI3K/AKT/mTOR [27], и является многообещающей объективной альтернативой зависимым от оператора методам, таким как иммуногистохимический [28]. В отличие от выявления мутаций в генах (например, *BRCA1/2* или *PIK3CA*), которые, несмотря на свою клиническую полезность, ограничены специфическими подгруппами пациентов и предоставляют информацию о предрасположенности или агрессивности заболевания, наш метод количественно оценивает результирующую активность сигнального пути напрямую. Учитывая роль гиперэкспрессии *mTOR* при раке молочной железы [1, 6, 28], разработанная тест-система обладает значительным потенциалом для интеграции в будущие диагностические и исследовательские стратегии.

Ограничением данного исследования является использование стандартизированной клеточной линии (SCP-1), которая не отражает всей гетерогенности клинических опухолевых образцов и не учитывает влияние преаналитических переменных [30]. Кроме того, эффективность теста неразрывно связана с конкретными реагентами и протоколами, примененными в данной работе. Следовательно, клиническая применимость разработанной тест-системы для оценки экспрессии *mTOR* в диагностике и стратификации рака молочной железы должна быть установлена в ходе будущих исследований на репрезентативных тканевых когортах. Такие исследования позволят определить ее диагностическую точность (чувствительность, специфичность, AUC) и оценить возможность внедрения в рутинную клиническую практику. Следует также учитывать, что повышенная экспрессия

mTOR наблюдается не только при онкологических, но и при других заболеваниях (например, ревматических патологиях), поэтому интерпретация результатов будет зависеть от типа исследуемого биоматериала и дизайна клинического исследования. В зависимости от поставленной задачи в будущем может потребоваться либо установление диагностических порогов для конкретного типа образцов (например, для биоптатов опухоли), либо введение дополнительных маркеров (например, *RILP*) для дифференциации схожих по экспрессии *mTOR* состояний. Несмотря на необходимость дальнейших исследований, разработанная ПЦР-тест-система представляет собой перспективный базовый инструмент для развития молекулярной диагностики рака молочной железы.

ВЫВОДЫ

В настоящем исследовании разработана и валидирована новая мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ-тест-система для относительного количественного анализа экспрессии гена *mTOR* с нормализацией на референсные гены *RPLP0* и *TBP*. Критический недостаток ранее описанного дизайна, заключавшийся в перекрытии последовательностей зонда и праймера для гена *TBP*, устранен в разработанной тест-системе за счет корректного дизайна олигонуклеотидов, проверки отсутствия межпраймерных взаимодействий и применения оптимальных стратегий предотвращения амплификации геномной ДНК. Тест-система продемонстрировала 100% аналитическую специфичность и чувствительность на уровне 125 тыс. клеток/мл. Эффективность амплификации составила 73% для *TBP*, 79% для *RPLP0* и 81% для *mTOR*, что является приемлемым показателем для относительного количественного анализа. В клеточной линии SCP-1 уровень экспрессии *mTOR* был существенно выше, чем *TBP*, но ниже, чем *RPLP0*. Нормализация на геометрическое среднее значений *C_p* обоих референсных генов обеспечила наилучшую воспроизводимость: медиана отклонения значений Fold Change между техническими повторами составила 4,9%. Разработанная тест-система позволяет преодолеть критический недостаток дизайна ранее опубликованного аналога и, с учетом роли гиперэкспрессии *mTOR* в канцерогенезе, может быть перспективным инструментом для развития молекулярной диагностики рака молочной железы.

Литература

- Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*. 2020; 22: 173.
- Корнилов Д. О., Тряпицын М. А., Гребнев Д. Ю. mTOR: сигнализация, регуляция, влияние на метаболизм, роль в регуляции продолжительности жизни и опухолевого роста. *Известия Коми научного центра УРО РАН*. 2021; 5: 104–15.
- Luo C, Ye WR, Shi W, Yin P, Chen C, He YB, et al. Perfect match: mTOR inhibitors and tuberous sclerosis complex. *Orphanet J Rare Dis*. 2022; 17: 106.
- Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, et al. Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2010; 5 (4): e9979.
- Zhu K, Wu Y, He P, Fan Y, Zhong X, Zheng H, et al. PI3K/AKT/mTOR-Targeted Therapy for Breast Cancer. *Cells*. 2022; 11 (16): 2508.
- Xue QL, Yang H, Li HF, Abadir PM, Burks TN, Koch LG, et al. Rapamycin increases grip strength and attenuates age-related decline in maximal running distance in old low capacity runner rats. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8: 769–76.
- Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife*. 2016; 5: e16351.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013; 153: 1194–217.
- Tang L, Fu Y, Song J, Hu T, Li K, Li Z. mTOR inhibition by TAK-228 is effective against growth, survival and angiogenesis in preclinical retinoblastoma models. *Pharmacol Res Perspect*. 2022; 10: e00930.
- Гребнев Д. Ю., Маклакова И. Ю., Корнилов Д. О., Симарина В. М., Тряпицын М. А., Казанцев Ю. А., и др. Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с

- помощью микроРНК mir162a. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2023; 67 (1): 48–55.
11. Xu C, Gao Q, Wu Z, Lou W, Li X, Wang M, et al. Combined HASPIN and mTOR inhibition is synergistic against KRAS-driven carcinomas. *Transl Oncol.* 2022; 26: 101540.
 12. Wei Z, Xia K, Zheng D, Gong C, Guo W. RILP inhibits tumor progression in osteosarcoma via Grb10-mediated inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Med.* 2023; 29: 106.
 13. Kirschneck C, Batschkus S, Proff P, Köstler J, Spanier G, Schröder A. Valid gene expression normalization by RT-qPCR in studies on hPDL fibroblasts with focus on orthodontic tooth movement and periodontitis. *Sci Rep.* 2017; 7: 14739.
 14. Hounkpe BW, Chenou F, de Lima F, De Paula EV. HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49: D947–D955.
 15. Quidville V, Alsafadi S, Goubar A, Commo F, Scott V, Pioche-Durieu C, et al. Targeting the Deregulated Spliceosome Core Machinery in Cancer Cells Triggers mTOR Blockade and Autophagy. *Cancer Res.* 2013; 73: 2247–58.
 16. Корнилов Д. О., Симарзина В. М., Тряпицын М. А., Маслаков Г. П., Бехтер А. А., Зорников Д. Л. Разработка мультиплексной ПЦР тест-системы для анализа экспрессии протоонкогена mTOR. Екатеринбург: ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; 2024 Apr. Доклад на IX Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения».
 17. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: Basu C, editor. *PCR Primer Design.* New York, NY: Humana Press, 2015; 31–56.
 18. Григорьев С. С., Козыменко А. Н., Гайнетдинов М. Р., Корнилов Д. О., Зорников Д. Л. Сравнительный анализ цитотоксичности силеров для проведения пломбирования корневых каналов (in vitro). *Проблемы стоматологии.* 2023; 4: 44–49.
 19. Kaur R, Sodhi M, Sharma A, Sharma VL, Verma P, Swami SK, et al. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative RT-PCR (RT-qPCR) expression data across twelve tissues of riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*). *PLoS One.* 2018; 13: e0191558.
 20. Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn.* 2001; 3 (2): 55–61.
 21. Figueroa S, Freire-Paspuel B, Vega-Mariño P, Velez A, Cruz M, Cardenas WB, et al. High sensitivity-low cost detection of SARS-CoV-2 by two steps end point RT-PCR with agarose gel electrophoresis visualization. *Sci Rep.* 2021; 11: 21234.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001; 25: 402–8.
 23. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1 (3): 1559–82.
 24. Набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×). Новосибирск: ООО «Биолабмикс», 2024. Кат. номер: RM03-80.
 25. Dragon AH, Rowe CJ, Rhodes AM, Pak OL, Davis TA, Ronzier E. Systematic Identification of the Optimal Housekeeping Genes for Accurate Transcriptomic and Proteomic Profiling of Tissues following Complex Traumatic Injury. *Methods Protoc.* 2023; 6: 22.
 26. Gentle A, Anastasopoulos F, McBrien NA. High-Resolution Semi-Quantitative Real-Time PCR without the Use of a Standard Curve. *BioTechniques.* 2001; 31: 502–8. Available from: <https://doi.org/10.2144/01313st03>.
 27. Kołodziej P, Nicoś M, Krawczyk PA, Bogucki J, Karczmarczyk A, Zalewski D, et al. The Correlation of Mutations and Expressions of Genes within the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Breast Cancer — A Preliminary Study. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 2061.
 28. Jaglan P, Dass R, Duhan M. Breast Cancer Detection Techniques: Issues and Challenges. *J Inst Eng India Ser B.* 2019; 100: 379–86.
 29. Madsen RR, Erickson EC, Rueda OM, Robin X, Caldas C, Toker A, et al. Positive correlation between transcriptomic stemness and PI3K/AKT/mTOR signaling scores in breast cancer, and a counterintuitive relationship with PIK3CA genotype. *PLoS Genet.* 2021; 17: e1009876.
 30. Hensler M, Vančurová I, Becht E, Palata O, Strnad P, Tesařová P, et al. Gene expression profiling of circulating tumor cells and peripheral blood mononuclear cells from breast cancer patients. *Oncimmunology.* 2016; 5: e1102827.

References

1. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci.* 2020; 22: 173.
2. Kornilov DO, Tryapicyn MA, Grebnev DYU. MTOR: signalizaciya, regulaciya, vliyanie na metabolismm, rol' v regulacii prodolzhitel'nosti zhizni i opuholevogo rosta. *Izvestiya Komi nauchnogo centra URO RAN.* 2021; 5: 104–115. Russian.
3. Luo C, Ye WR, Shi W, Yin P, Chen C, He YB, et al. Perfect match: mTOR inhibitors and tuberous sclerosis complex. *Orphanet J Rare Dis.* 2022; 17: 106.
4. Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, et al. Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One.* 2010; 5 (4): e9979.
5. Zhu K, Wu Y, He P, Fan Y, Zhong X, Zheng H, et al. PI3K/AKT/mTOR-Targeted Therapy for Breast Cancer. *Cells.* 2022; 11 (16): 2508.
6. Xue QL, Yang H, Li HF, Abadir PM, Burks TN, Koch LG, et al. Rapamycin increases grip strength and attenuates age-related decline in maximal running distance in old low capacity runner rats. *Aging (Albany NY).* 2016; 8: 769–76.
7. Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife.* 2016; 5: e16351.
8. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013; 153: 1194–217.
9. Tang L, Fu Y, Song J, Hu T, Li K, Li Z. mTOR inhibition by TAK-228 is effective against growth, survival and angiogenesis in preclinical retinoblastoma models. *Pharmacol Res Perspect.* 2022; 10: e00930.
10. Grebnev DYU, Maklakova IYu, Kornilov DO, Simarзина VM, Tryapicyn MA, Kazancev YU. A., et al. Ingibirovanie opuholevogo rosta v kletochnoj kul'ture osteosarkomy s pomoshch'yu mikroRNK mir162a. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2023; 67 (1): 48–55. Russian.
11. Xu C, Gao Q, Wu Z, Lou W, Li X, Wang M, et al. Combined HASPIN and mTOR inhibition is synergistic against KRAS-driven carcinomas. *Transl Oncol.* 2022; 26: 101540.
12. Wei Z, Xia K, Zheng D, Gong C, Guo W. RILP inhibits tumor progression in osteosarcoma via Grb10-mediated inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Med.* 2023; 29: 106.
13. Kirschneck C, Batschkus S, Proff P, Köstler J, Spanier G, Schröder A. Valid gene expression normalization by RT-qPCR in studies on hPDL fibroblasts with focus on orthodontic tooth movement and periodontitis. *Sci Rep.* 2017; 7: 14739.
14. Hounkpe BW, Chenou F, de Lima F, De Paula EV. HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49: D947–D955.
15. Quidville V, Alsafadi S, Goubar A, Commo F, Scott V, Pioche-Durieu C, et al. Targeting the Deregulated Spliceosome Core Machinery in Cancer Cells Triggers mTOR Blockade and Autophagy. *Cancer Res.* 2013; 73: 2247–58.
16. Kornilov DO, Simarзина VM, Tryapicyn MA, Maslakov GP, Bekhter AA, Zornikov DL. Razrabotka mul'tipleksnoj PCR test-sistemy dlya analiza ekspressii protoonkogena mTOR. *Ekaterinburg: FGBOU VO UGMU Minzdrava Rossii; 2024 Apr. Doklad na IX*

- Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii molodyh uchennyh i studentov «Aktual'nye voprosy sovremennoj medicinskoj nauki i zdravoohraneniya». Russian.
17. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: Basu C, editor. *PCR Primer Design*. New York, NY: Humana Press, 2015; 31–56.
 18. Grigorev SS, Kozmenko AN, Gajnetdinov MR, Kornilov DO, Zornikov DL. Sravnitel'nyj analiz citotoksichnosti silerov dlya provedeniya plombirovaniya kornevyh kanalov (in vitro). *Problemy stomatologii*. 2023; 4: 44–49. Russian.
 19. Kaur R, Sodhi M, Sharma A, Sharma VL, Verma P, Swami SK, et al. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative RT-PCR (RT-qPCR) expression data across twelve tissues of riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*). *PLoS One*. 2018; 13: e0191558.
 20. Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn*. 2001; 3 (2): 55–61.
 21. Figueroa S, Freire-Paspuel B, Vega-Mariño P, Velez A, Cruz M, Cardenas WB, et al. High sensitivity-low cost detection of SARS-CoV-2 by two steps end point RT-PCR with agarose gel electrophoresis visualization. *Sci Rep*. 2021; 11: 21234.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001; 25: 402–8.
 23. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1 (3): 1559–82.
 24. BioMaster RT-qPCR – Standard (2x) one-step RT-qPCR reagent kit. Novosibirsk: «Biolabmix» LLC, 2024. Cat. No: RM03-80.
 25. Dragon AH, Rowe CJ, Rhodes AM, Pak OL, Davis TA, Ronzier E. Systematic Identification of the Optimal Housekeeping Genes for Accurate Transcriptomic and Proteomic Profiling of Tissues following Complex Traumatic Injury. *Methods Protoc*. 2023; 6: 22.
 26. Gentle A, Anastasopoulos F, McBrien NA. High-Resolution Semi-Quantitative Real-Time PCR without the Use of a Standard Curve. *BioTechniques*. 2001; 31: 502–8. Available from: <https://doi.org/10.2144/01313st03>.
 27. Kołodziej P, Nicoś M, Krawczyk PA, Bogucki J, Karczmarczyk A, Zalewski D, et al. The Correlation of Mutations and Expressions of Genes within the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Breast Cancer — A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 2061.
 28. Jaglan P, Dass R, Duhan M. Breast Cancer Detection Techniques: Issues and Challenges. *J Inst Eng India Ser B*. 2019; 100: 379–86.
 29. Madsen RR, Erickson EC, Rueda OM, Robin X, Caldas C, Toker A, et al. Positive correlation between transcriptomic stemness and PI3K/AKT/mTOR signaling scores in breast cancer, and a counterintuitive relationship with PIK3CA genotype. *PLoS Genet*. 2021; 17: e1009876.
 30. Hensler M, Vančurová I, Becht E, Palata O, Strnad P, Tesařová P, et al. Gene expression profiling of circulating tumor cells and peripheral blood mononuclear cells from breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2016; 5: e1102827.