

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ, ПРИ ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Полуян О. С., Костюк С. А., Воробей А. В.

*Государственное учреждение образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Дивертикулярная болезнь ободочной кишки является мультифакторным генетически опосредованным заболеванием желудочно-кишечного тракта. В настоящее время ведутся полномасштабные исследования по поиску и идентификации генетических локусов, а также установлению их биологической вероятностной роли в развитии дивертикулярной болезни. В статье представлены данные разработки и клинической апробации in-house тест-системы для определения уровней нормализованной экспрессии генов, участвующих в формировании соединительной ткани, с целью установления молекулярно-генетической характеристики различных тканей ободочной кишки при дивертикулярной болезни.

Ключевые слова: дивертикулярная болезнь ободочной кишки, гены, соединительная ткань, ПЦР, уровни нормализованной экспрессии.

Введение. Дивертикулярная болезнь — распространенное комплексное заболевание, характеризующееся выпячиванием слизистой оболочки стенки толстой кишки в местах относительной слабости мышечных слоев, близких к проникающим кровеносным сосудам [1].

Патогенез дивертикулярной болезни считается многофакторным процессом, включающим факторы образа жизни (курение, отсутствие физической активности, высокий индекс массы тела), структурно-функциональные изменения стенки толстой кишки, старение и генетическую предрасположенность [1, 2]. Эпидемиологические исследования и исследования близнецов показали, что наследуемость дивертикулярной болезни составляет 40–53 % [3].

На сегодняшний день выявлено не менее 35 локусов, ассоциированных с дивертикулярной болезнью. При этом все гены разделены на пять групп:

1) гены, ассоциированные с изменением функционирования гладкой мускулатуры или нервов;

2) гены, ассоциированные с изменением других функций кишечника (эпителиальная, иммунная);

3) гены, ассоциированные с изменением функционирования соединительной ткани;

4) гены, имеющие биологическую или клиническую значимость, но не связанные с функциями кишечника;

5) неохарактеризованные или неназванные гены с неясным биологическим или клиническим значением [1, 4].

Так, например, ген *COL6A1*, кодирующий синтез альфа-1 цепи коллагена 6-го типа, оказывает потенциальное влияние на структуру, прочность на растяжение и биомеханические свойства толстой кишки. Ген *S100A10*, кодирующий синтез кальций-связывающего белка, регулирует ремоделирование внеклеточного матрикса, что также предполагает нарушение моторики или потенциальную структурную слабость дивертикулов, приводящую к развитию дивертикулита. Ген *ELN*, кодирующий синтез эластина, оказывает непосредственное влияние на функции соединительной ткани, при этом дряблость дивертикула является предрасполагающим фактором разрыва артерий. Тахикининовые пептиды участвуют в широком

спектре биологических процессов, включая сокращение гладкой мускулатуры, нейротрансмиссию, активацию иммунной системы, нейрогенное воспаление и гемопоэз [4].

Цель работы — установить уровни нормализованной экспрессии генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*, участвующих в формировании соединительной ткани, в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью.

Материалы и методы. Для проведения молекулярно-генетических исследований в качестве биологического материала использовали: 35 образцов интраоперационных биоптатов слизистой оболочки патологических участков неосложненных дивертикулов (группа 1), 19 образцов интраоперационных биоптатов слизистой оболочки патологических участков осложненных дивертикулов (группа 2), 37 образцов интраоперационных биоптатов слизистой оболочки участков здоровой кишки без дивертикулов пациентов с дивертикулярной болезнью ободочной кишки (группа 3), а также 8 образцов интраоперационных биоптатов стенки кишки пациентов, оперированных по поводу рака ободочной кишки без признаков непроходимости и долихоколон (контрольный биологический материал — группа 4).

Выделение РНК из пунктатов тканей ободочной кишки осуществлялось в несколько этапов, включая предварительное удаление раствора RNAlater (Sigma) перед экстракцией и гомогенизацией образцов, с использованием набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь).

Выделенную РНК использовали для определения количества и степени чистоты выделения полученной нуклеиновой кислоты, а затем незамедлительно замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Определение концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты проводили спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda = 260\text{ нм}$. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230.

Для проведения обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) одношаговым методом использовали набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (ООО «Биолаб-

микс», РФ), специально подобранные пары праймеров (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь) для каждого гена, включая house-keeping ген; постановку реакции ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием термоциклера-амплификатора Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия) с соответствующим программным обеспечением.

В пробирки вносили 25 мкл 2× смеси для ОТ-ПЦР с SYBR, 2 мкл БиоМастер-микс, 3 мкл выделенной РНК-матрицы, 3 мкл смеси F-праймер — R-праймер (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 рмоль/мкл) целевого гена, 3 мкл смеси F-праймер — R-праймер (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 рмоль/мкл) house-keeping гена человека *GAPDH*, 14 мкл стерильной воды. Конечный объем смеси составил 50 мкл.

Пробирки устанавливали в амплификатор и программировали прибор в соответствии с инструкцией производителя тест-системы:

- обратная транскрипция: 1 цикл, 45 °С — 30 мин;
- предварительная денатурация: 1 цикл, 95 °С — 5 мин;
- денатурация, отжиг, элонгация: 40 циклов, 95 °С — 10 с, 60–68 °С (в зависимости от исследуемого гена) — 10 с, 72 °С — 60 с;
- плавление: при температуре от 60 до 95 °С.

В каждой пробирке проводили амплификацию одного из исследуемых генов (*COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*) и house-keeping гена человека *GAPDH*, относительного которого проводилась нормализация по значениям пороговых циклов *Ct* исследуемых генов, для сравнения уровней экспрессии.

Расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) целевых генов осуществляли по формуле

$$\text{Уровень экспрессии} = 2^{-(Ct \text{ исследуемого гена} - Ct \text{ гена HPRT1})} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где *Ct* — пороговый цикл [5].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормаль-

ность проводили с использованием критерия Колмогорова — Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)) Для характеристики частоты изучаемых признаков использовали абсолютные показатели. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся *U*-критерий Манна — Уитни с целью сравнения величин измерений признака. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$ [6].

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования с использованием программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse) для определения уровней нормализованной экспрессии генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*.

С помощью демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 и встроенного приложения AlignX выбранные последовательности ДНК «выравнивали» для выбора наиболее консервативных участков. Далее проводили «выравнивание» последовательностей ДНК исследуемых генов.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли поэтапно для каждого гена и последовательно для каждого выбранного гомологичного участка с использованием бесплатно программного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold. Параметры праймеров: оптимальный размер ПЦР продукта около 50–80 пар оснований (п.о.) длиной 15–25 оснований (гуанин (G), цитозин (C), аденин (A), тимин (T)). Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров был осуществлен анализ последовательности предполагаемых ампликонов.

Анализ наличия вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием встроенного алгоритма Vector NTI — Oligo Duplexes. Условия проведения анализа: +60 °С.

В результате дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* с использованием ПЦР в режиме реального времени были выбраны следующие варианты (таблица 1).

Таблица 1 — Выбранные последовательности олигонуклеотидных праймеров для генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*

Олигонуклеотид	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
COL6A1-F	TCAGAATAGTGATGTGTTTCGACGTT
COL6A1-R	AGCAACATGGATATGGTTCAGAAA
S100A10-F	AACAAAGGAGGACCTGAGAGTAC
S100A10-R	CTTTGCCATCTCTACACTGGTCC
ELN-F	TGTGTGAGTGTGTGCTTGTGTGCA
ELN-R	ATTACGAAAGGCCCGGCTCA
TAC1-F	GCTCGGAGGAACCAGAGAAAAC
TAC1-R	AAGGCCGCGAGGATTTTCATG

Оценку специфичности выбранных наборов олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием онлайн-приложения NCBI/Blast (таблица 2).

Таблица 2 — Результаты анализа специфичности выбранных наборов олигонуклеотидных праймеров

Олигонуклеотид	Гомология	
	Геном человека	Другие организмы
COL6A1	100 %	Нет
S100A10	100 %	Нет
ELN	100 %	Нет
TAC1	100 %	Нет

Выбор референсного гена из числа house-keeping генов человека, таких как *GAPDH*, *HGUS*, β -актин, *HPRT1*, проводили исходя из рассчитанных значений коэффициента вариации (CV) по формуле [7]

$$CV = 1 - \frac{\text{Рассчитанная концентрация ДНК}}{\text{Известная концентрация ДНК}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

В качестве референсного был выбран ген *GAPDH*, так как именно для него было установлено самое низкое значение коэффициента вариации — 4,1 %. Для генов *HGUS*, *HPRT1*, β -актин рассчитанные значения коэффициентов вариации находились на уровне 16,7, 10,4 и 7,9 % соответственно.

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля ПЦР в режиме реального времени использовали последовательность ДНК гена *GAPDH* генома человека. Предварительно был осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона *GAPDH*.

Затем нами проведено моделирование совместимости внутреннего контроля и олигонуклеотидных праймеров для ампли-

фикации участков генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* в условиях мультиплекс-ПЦР (две реакции в одной пробирке). При постановке совместных мультиплекс-реакций следует учитывать вероятные гетеродимеры олигонуклеотидов и компенсировать их исходя из пропорций и процентного соотношения стабильный гетеродимер/нестабильный гетеродимер. Как правило, является достаточным повышение концентрации олигонуклеотидов до 500–600 нМ.

Анализ вероятности совместного протекания специфической реакции с наборами олигонуклеотидов генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* и внутреннего контроля показал, что в большинстве случаев выбранные олигонуклеотиды последнего не образуют стабильных гетеродимеров в условиях протекания этапа отжига/элонгации ПЦР в реальном времени.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров при определении экспрессии каждого из исследуемых генов проводили моноплексную ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Амплификацию для каждого гена проводили в 10 образцах, пробы ставили в дублях.

Состав амплификационной смеси был универсален для всех генов и различался только вносимыми парой праймеров: 25 мкл 2× смеси для ОТ-ПЦР с SYBR, 2 мкл «Био-Мастер-микс», 3 мкл смеси «F-праймер — R-праймер», 3 мкл выделенной РНК-матрицы. Конечный объем смеси составил 50 мкл.

На основании расчета температуры отжига пар праймеров была выбрана универсальная программа для амплификации исследуемых генов: обратная транскрипция

1 цикл 45 °С — 30 мин; предварительная денатурация 1 цикл 95 °С — 5 мин; денатурация, отжиг, элонгация 40 циклов: 95 °С — 10 с, 63 °С — 10 с, 72 °С — 60 с; плавление при температуре от 60 до 95 °С.

Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР в режиме реального времени, для всех исследуемых генов находились в пределах от 22,09 (для гена *S100A10*) до 33,21 (для гена *COL6A1*) (таблица 3).

Таблица 3 — Значения пороговых циклов для генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*, полученные при выполнении моноплексной ПЦР

Номер образца		Значения пороговых циклов (Ct) для генов			
		<i>COL6A1</i>	<i>S100A10</i>	<i>ELN</i>	<i>TAC1</i>
1	1.1	32,93	28,36	22,23	27,71
	1.2	33,21	28,77	22,65	27,14
2	2.1	32,05	31,11	31,70	26,35
	2.2	31,84	30,76	31,08	26,73
3	3.1	27,12	32,71	31,59	28,23
	3.2	27,85	33,19	32,00	27,84
4	4.1	28,90	28,64	32,46	23,41
	4.2	29,22	29,05	32,89	23,03
5	5.1	29,54	29,42	30,72	29,81
	5.2	30,02	29,92	31,18	30,45
6	6.1	32,70	27,33	31,67	28,41
	6.2	32,27	27,89	32,00	28,92
7	7.1	31,40	28,28	30,26	27,51
	7.2	31,68	28,56	30,67	27,93
8	8.1	28,53	28,69	32,18	26,12
	8.2	28,94	29,01	32,76	26,57
9	9.1	23,95	22,09	31,73	31,15
	9.2	23,41	22,63	32,12	31,59
10	10.1	30,37	29,81	26,59	26,16
	10.2	30,87	29,46	27,00	25,52

По результатам анализа кривых плавления для проведения оценки эффективности (E) ПЦР-РВ были выбраны: образцы № 3, 9 для гена *COL6A1*, образцы № 6, 9 для гена *S100A10*, образцы № 1, 10 для гена *ELN*, а также образцы № 4, 10 для гена *TAC1*, так как значения пороговых циклов амплификации для указанных генов в данных образцах были самыми низкими.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов кДНК с целью построения стандартной кривой. Концентрацию кДНК в неразведенном образце условно

принимали за 100 и делали два разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях. Корреляции (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и \log_{10} условной концентрации кДНК в образце составила от 0,994 до 0,997. Полученные значения эффективности ПЦР находились в пределах от 1,52 (для *COL6A1*) до 1,68 (для *S100A10*).

Количественное определение house-keeping генов проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию исследуемых целевых генов, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в ду-

блях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций. В ходе оценки эффективности протекания реакции амплификации для референсного гена *GAPDH* было установлено, что при использовании подобранных пар праймеров, состава реакционной смеси и условий амплификации рассчитанное значение эффективности протекания реакции составило 1,67. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена *GAPDH* и генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации целевого и референсного генов.

В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ в одной пробирке одновременно

амплифицировали один из исследуемых генов (*COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*) и референсный ген *GAPDH*. В пробирки для амплификации вносили: 25 мкл 2× смеси для ОТ-ПЦР с SYBR, 2 мкл «БиоМастер-микс», 3 мкл смеси «F-праймер — R-праймер» одного из целевых генов (*COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*), 3 мкл смеси «F-праймер — R-праймер house-keeping» гена *GAPDH*, 3 мкл выделенной РНК-матрицы. Конечный объем смеси составил 50 мкл.

Для выбора оптимального режима амплификации для каждого из исследуемых генов при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (таблица 4). Амплификацию проводили с использованием термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

Таблица 4 — Программы амплификации для генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*

Ген	Программа амплификации
<i>COL6A1</i>	1 цикл: 45 °С — 30 мин; 95 °С — 5 мин; 40 циклов: 95 °С — 10 с, 64 °С — 10 с, 72 °С — 60 с; Плавление: 60–95 °С.
<i>S100A10</i>	1 цикл: 45 °С — 30 мин; 95 °С — 5 мин; 40 циклов: 95 °С — 10 с, 68 °С — 10 с, 72 °С — 60 с; Плавление: 60–95 °С.
<i>ELN</i>	1 цикл: 45 °С — 30 мин; 95 °С — 5 мин; 40 циклов: 95 °С — 10 с, 62 °С — 10 с, 72 °С — 60 с; Плавление: 60–95 °С.
<i>TAC1</i>	1 цикл: 45 °С — 30 мин; 95 °С — 5 мин; 40 циклов: 95 °С — 10 с, 60 °С — 10 с, 72 °С — 60 с; Плавление: 60–95 °С.

Для апробации разработанного метода расчет уровней нормализованной экспрес-

сии (УНЭ) целевых генов (таблица 5) осуществляли по формуле (2).

Таблица 5 — Значения пороговых циклов и УНЭ для генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*

Ген	Значение пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>COL6A1</i>	24,37	24,97	24,87	23,40	21,85	23,27	29,15	23,23	23,32	24,79
<i>GAPDH</i>	23,69	22,05	27,44	25,16	22,40	25,06	28,67	23,89	24,03	25,82
% УНЭ	62,42	13,21	593,81	338,70	146,41	345,81	71,70	158,01	163,58	204,20
<i>S100A10</i>	22,09	21,11	24,09	22,57	20,92	22,58	28,51	22,34	23,13	24,62
<i>GAPDH</i>	23,66	22,02	27,41	25,13	22,37	25,03	28,64	23,86	24,00	25,79
% УНЭ	296,90	187,90	998,66	589,71	273,21	546,42	109,43	286,79	182,77	225,01

Окончание табл. 5

Ген	Значение пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>ELN</i>	27,89	25,31	32,09	27,65	26,64	31,44	30,63	28,27	28,4	30,34
<i>GAPDH</i>	23,67	22,03	27,42	25,14	22,38	25,04	28,65	23,87	24,01	25,80
% УНЭ	5,37	10,29	3,93	17,56	5,22	1,18	25,35	4,74	4,77	4,30
<i>TAC1</i>	26,64	25,48	29,63	26,98	25,47	27,51	30,43	26,75	26,84	28,99
<i>GAPDH</i>	23,68	22,04	27,43	25,15	22,39	25,05	28,66	23,88	24,02	25,81
% УНЭ	12,85	9,21	21,76	28,13	11,83	18,17	29,32	13,68	14,16	11,03

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что разработанный метод можно использовать для одновременной амплификации одного из таргетных генов (*COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*) и референсного гена *GAPDH*. Полученные с использованием разработанного метода данные можно использовать для расчета уровня нормализованной экспрессии генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с ди-

вертикулярной болезнью. Рассчитанные значения уровня нормализованной экспрессии генов находились в пределах от 1,18 до 998,66 %.

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований установлено, что уровни нормализованной экспрессии гена *COL6A1* для группы 1 составили Me (Q25/75) 117,82 (36,55/173,36) %, для группы 2 — 33,81 (23,77/55,35) %, для группы 3 — 114,50 (37,49/171,19) %, для группы 4 — 336,17 (190,38/677,58) % (рисунок 1).

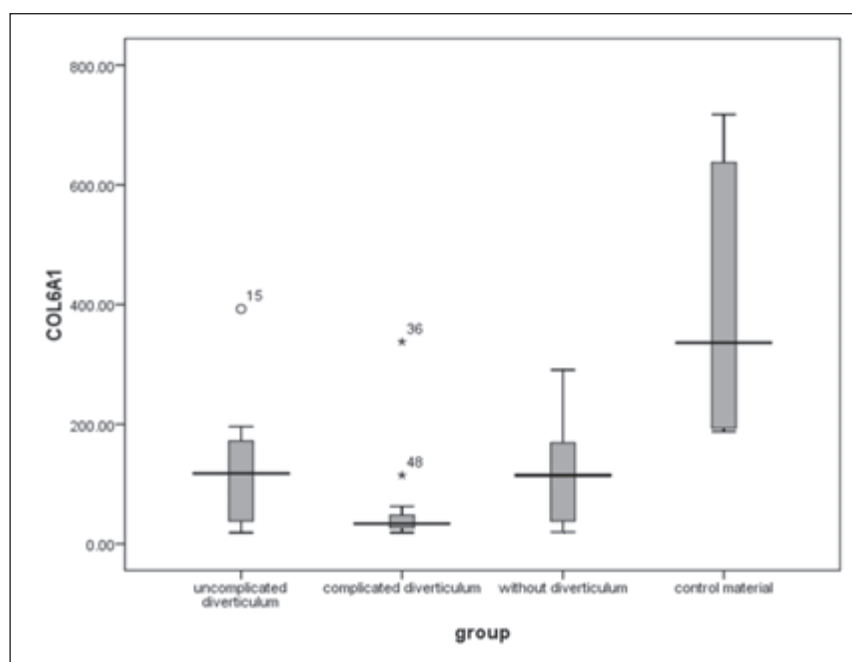


Рисунок 1 — Уровни нормализованной экспрессии гена *COL6A1* в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью

Установлено, что при дивертикулярной болезни ободочной кишки наблюдается снижение экспрессии коллагена VI типа с биоптатах тканей участков стенки кишки без дивертикулов, с осложненными и неосложненными дивертикулами. Данный факт под-

тверждает имеющиеся данные о роли *COL6A1* в построении экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и обеспечении активности мышечной функции. Использование непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни позволило выявить наличие статистически значи-

мых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена *COL6A1*» между группами 1–2 ($Z = -2,409, p = 0,015$), 1–4 ($Z = -3,213, p < 0,001$), 2–3 ($Z = -2,465, p = 0,013$), 2–4 ($Z = -2,908, p = 0,002$), 3–4 ($Z = -3,414, p < 0,001$). Для групп 1–3 ($Z = -0,082, p = 0,935$) статистически значимых достоверных различий выявлено не было.

При проведении молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии гена *S100A10* нами были установлены следующие значения Me (Q25/75): для группы 1 — 106,00 (83,42/122,05) %, для группы 2 — 104,04 (89,97/144,31) %, для группы 3 — 126,57 (95,73/136,22) %, для группы 4 — 9,87 (3,888/29,69) % (рисунок 2).

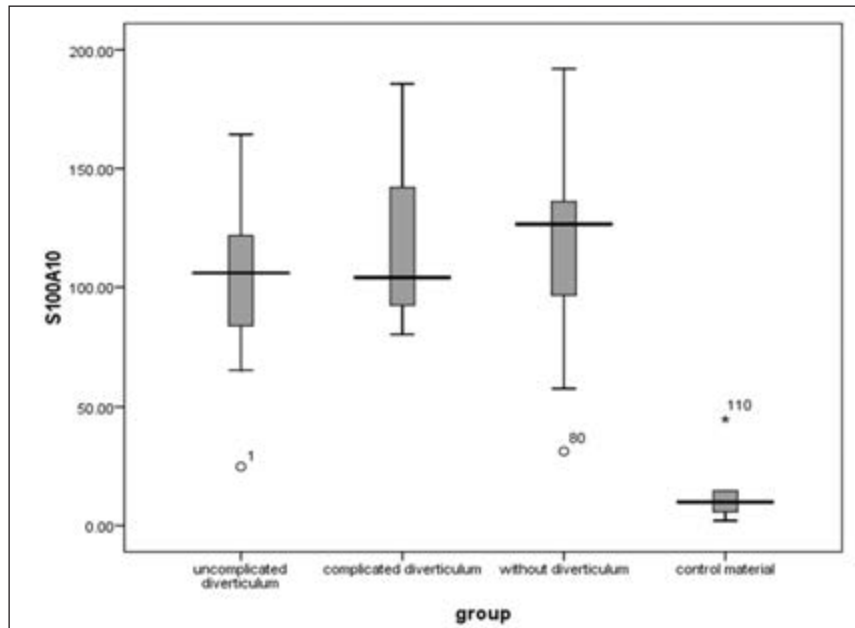


Рисунок 2 — Уровни нормализованной экспрессии гена *S100A10* в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью

Увеличение экспрессии гена кальций-связывающего белка *S100A10* в пунктатах тканей участков стенки кишки приводит к разрушению и деградации ЭЦМ вследствие фибринолиза и действия металлопротеиназ. Использование непараметрического *U*-критерия Манна — Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена *S100A10*» только при проведении попарных сравнений с группой 4 (контрольный материал пациентов без дивертикулярной болезни ободочной кишки): для групп 1–4 $Z = -3,464, p < 0,001$, 2–4 $Z = -3,204, p < 0,001$, 3–4 $Z = -3,464, p < 0,001$; тогда как для всех остальных групп выявленные различия в экспрессии ген были статистически достоверными: для групп 1–2 $Z = -0,925, p = 0,367$, 1–3 $Z = -1,770, p = 0,077$, 2–3 $Z = -0,392, p = 0,709$.

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии гена *ELN* установлено, что для группы 1 Me (Q25/75) составило 54,17 (39,18/103,75) %, для группы 2 — 56,34 (26,16/90,40) %, для группы 3 — 56,69 (37,04/106,53) %, для группы 4 — 234,44 (132,77/472,53) % (рисунок 3).

Различающиеся уровни нормализованной экспрессии гена *ELN* в пунктатах тканей участков ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью по сравнению с контрольным материалом свидетельствуют о роли данного гена в развитии заболевания: *ELN* является основным компонентом ЭЦМ, обеспечивающим его эластичность и стабильность. Использование непараметрического *U*-критерия Манна — Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализо-

ванной экспрессии гена *ELN* между группами 1–4 ($Z = -3,364, p < 0,001$), 2–4 ($Z = -3,204, p < 0,001$) и 3–4 ($Z = -3,414, p < 0,001$). При проведении статистического анализа между группами пациентов с дивертикулярной болезнью (группы 1–3) статистически значимых достоверных различий выявлено не было: для групп 1–2 $Z = -1,009, p = 0,324$, 1–3 $Z = -0,197, p = 0,844$, 2–3 $Z = -1,009, p = 0,324$).

На заключительном этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по установлению уровней нормализованной экспрессии гена *TAC1*: для группы 1 Ме (Q25/75) составило 154,55 (118,79/182,57) %, для группы 2 — 148,47 (128,12/244,34) %, для группы 3 — 180,23 (136,33/206,03) %, для группы 4 — 14,06 (5,53/42,28) % (рисунок 4).

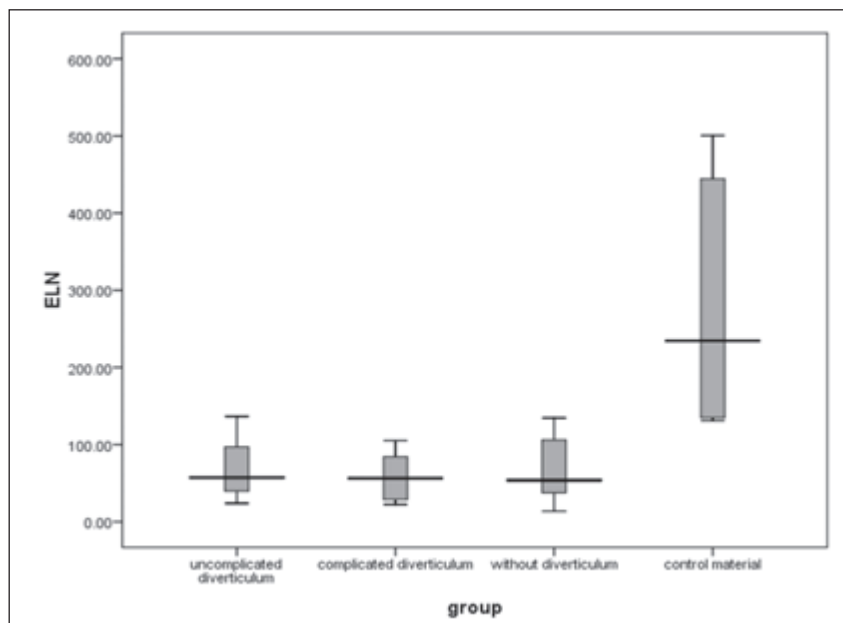


Рисунок 3 — Уровни нормализованной экспрессии гена *ELN* в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью

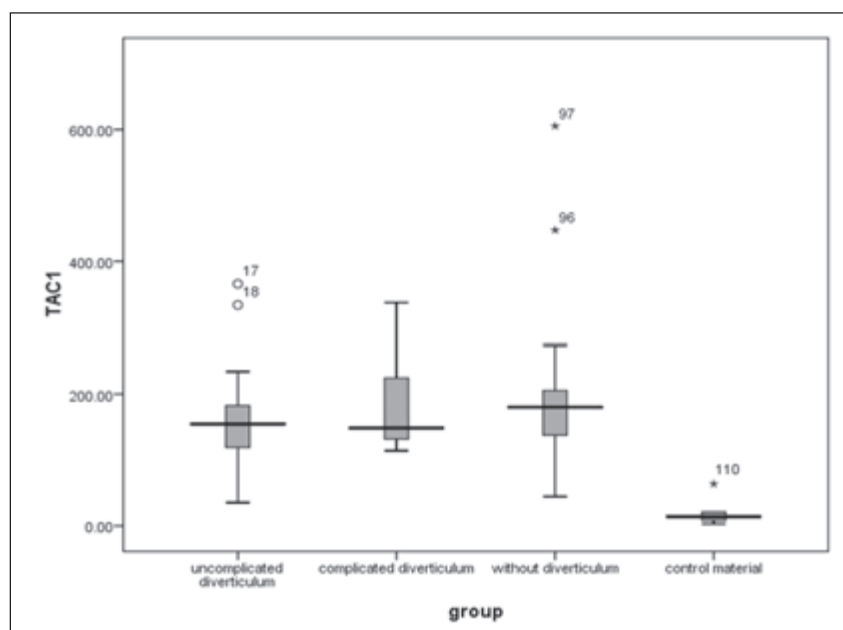


Рисунок 4 — Уровни нормализованной экспрессии гена *TAC1* в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью

Усиление экспрессии гена *TAC1* является маркером местной воспалительной реакции. При использовании непараметрического *U*-критерия Манна — Уитни установлены статистически значимые различия по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена *TAC1*» между группами 1–4 ($Z = -3,464$, $p < 0,001$), 2–4 ($Z = -3,204$, $p < 0,001$) и 3–4 ($Z = -3,464$, $p < 0,001$), тогда как для групп 1–2 ($Z = -1,093$, $p = 0,285$), 1–3 ($Z = -1,376$, $p = 0,169$) и 2–3 ($Z = -0,252$, $p = 0,814$) таких различий выявлено не было.

Заключение. Подобранные нуклеотидные последовательности пар праймеров позволяют проводить амплификацию генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*, а также гена человека *GAPDH* в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью, с применением ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в мультиплексной формате.

Анализ результатов, полученных в ходе разработки, оптимизации и валидации, позволил сделать вывод, что разработанный метод, основанный на использовании специфических пар праймеров для проведения мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, можно использовать для одновре-

менной амплификации одного из таргетных генов (*COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*) и референсного гена *GAPDH* при определении уровней нормализованной экспрессии указанных генов в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью.

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* установлено, что при дивертикулярной болезни ободочной кишки наблюдается статистически значимое ($p < 0,01$) достоверное снижение уровней экспрессии генов *COL6A1* и *ELN* на фоне статистически достоверного ($p < 0,01$) увеличения уровней экспрессии генов *S100A10* и *TAC1* по сравнению с контрольным материалом пациентов без дивертикулярной болезни. При этом статистически достоверные различия между группами пациентов с дивертикулярной болезнью выявлены только для гена *COL6A1*. Изменение экспрессии указанных генов приводит к нарушению строения экстрацеллюлярного матрикса (*COL6A1*), снижению его эластичности (*ELN*), деструкции и деградации (*S100A10*), сопровождающимся воспалением (*TAC1*).

Список цитированных источников

1. Colonic diverticular disease / A. Tursi [et al.] // *Nat Rev Dis Primers*. — 2020. — Vol. 6 (1). — P. 20. DOI: 10.1038/s41572-020-0153-5.
2. Von Rahden, B. H. A. Pathogenesis of colonic diverticular disease / B. H. A. von Rahden, C.-T. Germer // *Langenbecks Arch Surg*. — 2012. — Vol. 397 (7). — P. 1025–1033. DOI: 10.1007/s00423-012-0961-5.
3. Heritability and familial aggregation of diverticular disease: a population-based study of twins and siblings / L. L. Strate [et al.] // *Gastroenterology*. — 2013. — Vol. 144 (4). — P. 736–742. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.12.030.
4. Genome-wide association analyses identify 39 new susceptibility loci for diverticular disease / L. H. Maguire [et al.] // *Nat Genet*. — 2018. — Vol. 50. — P. 1359–1365. DOI: 10.1038/s41588-018-0203-z.
5. Полуян, О. С. Усовершенствование метода определения уровней нормализованной экспрессии генов белков теплового шока *Chlamydia trachomatis* для оценки риска диссеминации возбудителя из уrogenитального тракта / О. С. Полуян // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. — 2017. — № 3. — С. 333–342.
6. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных / А. Д. Наследов. — СПб. : Питер, 2008. — 416 с.
7. Метод определения уровней экспрессии генов, обеспечивающих синтез коллагена и эластина, в пунктатах кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи / С. А. Костюк [и др.] // *Дерматовенерология. Косметология*. — 2017. — № 2. — С. 179–187.



Method for determining the levels of relative gene expression involved in the formation of connective tissue in colonic diverticulitis

Poluyan O. S., Kostiuk S. A., Vorobej A. V.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Colon colonic diverticulitis is a multifactorial genetically mediated disease of the gastrointestinal tract. Currently, full-scale studies are underway to search for and identify genetic loci, as well as to establish their biological probabilistic role in the development of diverticular disease. The article presents data on the development and clinical testing of an in-house test system for determining the normalized expression levels of genes involved in the formation of connective tissue in order to establish the molecular genetic characteristics of various tissues of the colon in diverticular disease.

Keywords: diverticular disease of the colon, genes, connective tissue, PCR, relative expression levels.

Поступила 24.05.2023