

Полуян О.С., Костюк С.А.

Разработка метода мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для определения уровней нормализованной экспрессии генов матричных металлопротеиназ при артропатиях коленного сустава

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь

Артропатии коленного сустава сопровождаются наличием воспалительного процесса, образованием остеофитов и дегенерацией суставного хряща. Несмотря на четкое понимание причин возникновения артропатий, до конца не изучены механизмы нарушений физиологического синтеза и деградации суставного хряща при прогрессирова-

нии заболевания. Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют основную роль в деструкция суставного хряща при артропатиях коленного сустава.

Цель исследования: оценить уровни нормализованной экспрессии генов ММП-1, ММП-3 и ММП-9 в хондроцитах синовиальной ткани коленного сустава.

Материалы и методы исследования. В исследование включены 25 пациентов с реактивной артропатией коленного сустава (группа 1), 25 пациентов остеоартрозом с (группа 2); группу сравнения составили 20 пациентов с травматической артропатией коленного сустава (группа 3). Выделение РНК из хондроцитов синовиальной ткани коленного сустава проводили с помощью Rneasy Mini Kit (Qiagen, США), обратнo-транскрипционную ПЦР (ОТ-ПЦР) – согласно инструкции производителя набора реагентов One-Step qRT-PCR Kit (Qiagen). Дизайн праймеров осуществляли с использованием программного приложения Primer3 v.0.4.0. Температура плавления праймеров составила 57°-63°С, размер продукта амплификации – 90-120 пар оснований. Качество и количество выделенной РНК оценивали с спектрофотометрически. Состав реакционной смеси: 5 мкл DyNAmo Flash SYBR Green (Thermo) (2X), 1,5 мкл кДНК, 1 мкл (5 пм/мкл) каждого праймера. Программа амплификации: 95°С – 10 мин, циклирование (40 циклов) 95°С – 20 с, 60°С – 40 с. Анализ кривых плавления и детекция полученных результатов осуществлялась автоматически с использованием программного обеспечения прибора «Rotor-Gene 6000» (Corbett research, Австралия). Для нормализации уровня экспрессии таргетных генов в зависимости от показателя порогового цикла амплификации в качестве house-keeping гена, используемого в качестве внутреннего контроля, использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GADPH). Статистическая обработка проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Количественные данные представлены в виде значений медианы и квартилей Me (Q25/75). Для сравнения независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

Результаты. Полученные значения уровней экспрессии ММП-1 составили: для группы 1 – 18,96 (4,18/48,32)%, для группы 2 – 211,64 (104,79/307,14)%, для группы 3 – 21,96 (6,91/51,15). Критерий Манна-Уитни для групп 1-2 составил $Z = -6,294$, $p = 0,009$, для групп 2-3 $Z = -6,106$, $p = 0,012$ что свидетельствует о наличии статистически значимых различий, тогда как для групп 1-3 статистически значимых до-

стоверных различий выявлено не было ($Z = -0,557$, $p=0,611$). Уровни нормализованной экспрессии гена MMP-3 для группы 1 составили Me (Q25/75) 16,19 (7,99/35,27)%, для группы 2 – 15,14 (7,67/31,35)%, для группы 3 – 121,94 (67,59/240,07)%. Использование критерия Манна-Уитни позволило сделать вывод о наличии статистически достоверных различий для исследуемых групп 1-3 ($Z = -6,171$, $p=0,010$) и 2-3 ($Z = -6,171$ $p=0,022$), тогда как для групп 1-2 статистических различий выявлено не было ($Z = -6,677$ $p=0,509$). При сравнении уровней нормализованной экспрессии гена MMP-9 Me (Q25/75) для группы 1 составили 65,07 (32,84/131,40)%, для группы 2 – 84,47 (39,60/197,09)%, для группы 3 – 16,15 (6,96/28,74)%. Критерий Манна-Уитни выявил наличие статистически достоверных различий для групп 1-3 ($Z = -5,663$, $p=0,018$) и 2-3 ($Z = -6,031$ $p=0,034$). Для групп 2-2 $Z = -6,663$, $p=0,507$ что свидетельствует об отсутствии статистических различий.

Заключение. Профиль генетической экспрессии матриксных металлопротеиназ зависит от этиологического фактора артропатий коленного сустава: при реактивной артропатии наблюдается статистически значимое достоверное усиление экспрессии гена MMP-9; остеоартрит сопровождается усилением экспрессии генов MMP-1 и MMP-9; наличие травматического повреждения коленного сустава характеризуется усилением экспрессии гена MMP-3 ($p<0,05$).