

*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 ( $p<0,05$ ).