

УДК 616.728.3-002:575.117

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АРТРОПАТИЯМИ КОЛЕННОГО СУСТАВА© С. А. КОСТЮК¹, О. С. ПОЛУЯН¹, Т. В. РУДЕНКОВА¹, А. Н. БЕНЬКО¹,
М. А. ГЕРАСИМЕНКО²¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь²ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии», г. Минск, Республика Беларусь**РЕЗЮМЕ****Цель исследования:** разработать метод молекулярно-генетического анализа для определения уровней нормализованной экспрессии генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2* и *MMP-9* в биологическом материале пациентов с гонартрозом.**Материал и методы.** В качестве биологического материала для исследования использовали биоптаты хряща коленного сустава 10 пациентов с гонартрозом. Выделение нуклеиновых кислот из образцов биологического материала проводили с использованием реагента TRIzol. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript III reverse transcriptase, dNTP и Ribonuclease inhibitor («Invitrogen», США).**Результаты.** С использованием программного обеспечения VectorNTI подобраны пары праймеров (forward и reverse) и TaqMan-зондов для генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2* и *MMP-9*, изучена возможность использования подобранных пар праймеров и зондов для выявления каждого из исследуемых генов. Сконструированы «in-house» тест-системы в формате мультиплекс для референсного и целевого генов.**Заключение.** Подтверждена высокая специфичность (100 %) выбранных наборов олигонуклеотидных праймеров с использованием онлайн приложения NCBI/Blast. Разработанный молекулярно-генетический метод может быть использован для определения уровней нормализованной экспрессии генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2* и *MMP-9* при артропатиях коленного сустава.**Ключевые слова:** коллаген, матриксная металлопротеиназа, экспрессия генов, нормализация, праймер, ПЦР.**Вклад авторов:** Костюк С.А., Полуян О.С., Руденкова Т.В., Бенько А.Н., Герасименко М.А.: концепция и дизайн исследования, взятие образцов биологического материала, подбор праймеров и зондов, оптимизация условий проведения ПЦР-анализа, получение экспериментальных данных, статистическая обработка данных, редактирование, обсуждение данных, обзор публикаций по теме статьи, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации.**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Источники финансирования:** исследование проведено без спонсорской поддержки.**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:**Костюк СА, Полуян ОС, Руденкова ТВ, Бенько АН, Герасименко МА. Разработка метода определения уровней нормализованной экспрессии структурных и функциональных генов у пациентов с артропатиями коленного сустава. *Проблемы Здоровья и Экологии*. 2020;65(3):144–151**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING THE LEVELS OF NORMALIZED EXPRESSION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL GENES IN PATIENTS WITH KNEE JOINT ARTHROPATHY**© SVETLANA A. KOSTIUK¹, OLGA S. POLUYAN¹, TATYANA V. RUDENKOVA¹,
ALEXANDER N. BENKO¹, MICHAEL A. GERASIMENKO²¹Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus²Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus**ABSTRACT****Objective:** to develop a method of molecular genetic analysis for determining the normalized expression levels of *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, and *MMP-9* genes in the biological material of patients with gonarthrosis.**Material and methods.** The biopsy samples of knee joint cartilage of 10 patients with gonarthrosis were used as a biological material for the study. Nucleic acids were isolated from the samples of the biological material using TRIzol Reagent. Reverse transcription was performed using the SuperScript III reverse transcriptase kit, dNTP and Ribonuclease inhibitor (Invitrogen, USA).**Results.** The usage of VectorNTI software has made it possible to select pairs of primers (forward and reverse) and TaqMan probes for *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, and *MMP-9* genes, and to study the possibility of the use of the selected pairs of primers and probes for the purpose of identification of each of the studied genes. In-house test systems in the multiplex format have been designed for reference and target genes.**Conclusion.** High specificity (100 %) of the selected oligonucleotide primer sets was confirmed using the online application NCBI/Blast. The developed molecular genetic method can be applied to determine the normalized expression levels of *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, and *MMP-9* genes in knee joint arthropathy.**Key words:** collagen, matrix metalloproteinase, gene expression, normalization, primer, PCR.

Author contributions: Kostiuk S.A., Poluyan O.S., Rudenkova T.V., Benko A.N., Gerasimenko M.A.: research concept and design, biological material sampling, primers and probes selection, PCR analysis conditions optimization, obtaining experimental data, statistical data processing, editing, discussing data, reviewing publications on the topic of the article, checking critical content, approving the manuscript for publication.

Conflict of interests: authors declare no conflict of interest.

Funding: study conducted without sponsorship.

FOR CITATION:

Kostiuk SA, Poluyan OS, Rudenkova TV, Benko AN, Gerasimenko MA. Development of a method for determining the levels of normalized expression of structural and functional genes in patients with knee joint arthropathy. *Problems of Health and Ecology = Problemy Zdorov'ya i Ekologii* 2020;65(3):144–151. (In Russ.)

Введение

Коллаген — основной структурный белок межклеточного матрикса, представленный главным образом в коже, костях, сухожилиях [1]. В различных типах тканей преобладают разные типы коллагена. В пластинчатой костной ткани — плоские и трубчатые кости скелета — коллагеновые волокна имеют строго ориентированное направление, создавая единую волокнистую структуру кости. Поперечно ориентированные коллагеновые волокна могут вплетаться в промежуточные слои между костными пластинками, благодаря чему достигается прочность костной ткани [1]. В сухожилиях коллаген образует плотные параллельные волокна, способные выдерживать большие механические нагрузки. В хрящах коллаген образует фибриллярную сеть, придающую ему прочность [1, 2, 3].

Низкое содержание коллагена в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) хрящевой ткани является глобальной проблемой в ортопедической практике. ЭЦМ гиалинового хряща состоит в основном из коллагена II типа, а также гликозаминогликана [1]. Коллаген II типа является структурным компонентом костной ткани, испытывающей постоянную или периодическую механическую нагрузку; также данный коллаген участвует в образовании стромы паренхиматозных органов. Коллаген VI типа является короткоцепочечным белком и образует микрофибриллы, которые располагаются между крупными фибриллами интерстициальных коллагенов, и широко представлен в хрящевом матриксе. Микрофибриллы коллагена VI типа связываются со многими компонентами межклеточного матрикса (фибриллами интерстициальных коллагенов, гиалуроновой кислотой, протеогликанами) и участвуют в клеточной адгезии посредством присоединения к мембранным адгезивным молекулам [1, 2, 3].

Матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinase — MMP) — большая группа протеолитических ферментов, играющих главную роль во внеклеточном матриксном обмене вследствие их способности разрушать все компоненты внеклеточного матрикса [4]. Они вызывают деструкцию суставов за счет повреждения хряща и субхондральной кости, а также участвуют в формировании новых кровеносных сосудов, способствуя развитию ангиогенеза [1]. В норме действие MMP связано с различными процессами, такими как метаболизм соединительной ткани, овуляция, развитие скелета, заживление ран и т.д. [5].

Желатиназа-A (MMP-2) и -B (MMP-9) участвуют в суставном разрушении и формировании ангиогенеза, отвечая за распад желатина и мембранных коллагеназ. Данные MMP повреждают фибриллярные коллагены, основные мембранные компоненты и стромальные молекулы внеклеточного матрикса, участвуют в развитии эрозий суставов [4, 5]. MMP вырабатываются в ответ на действие провоспалительных цитокинов и находятся в избытке в воспаленном суставе, при этом дисрегуляция MMP проявляется при артропатиях различной этиологии [1, 5].

Дегградация суставного хряща — одна из ранних особенностей заболевания, связанных с увеличением активности протеолитических систем [6]. Дисрегуляция MMP проявляется при ревматоидном артрите, остеоартрозе и онкологических заболеваниях. При этом прогрессирующая деструкция внеклеточного матрикса, включающая суставной хрящ, кость, связки и сухожилия, является главной особенностью артрита, приводящей к стойкому нарушению функциональной способности пациента [1, 5, 6].

Ранняя диагностика является критическим вопросом для ортопедии: профили экспрессии генов в начальной стадии заболевания могут обеспечить важную информацию о пусковых механизмах патологического про-

цесса для разработки метода своевременной коррекции на доклиническом уровне.

Цель исследования

Разработать метод молекулярного-генетического анализа для определения уровней нормализованной экспрессии генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2* и *MMP-9* в биологическом материале пациентов с гонартрозом.

Материал и методы

Исследования проводились на базе Научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) (группа ПЦР-диагностики) Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО).

В качестве биологического материала для разработки метода использовались биоптаты хряща коленного сустава 10 пациентов с гонартрозом, находившихся на стационарном лечении в УЗ «Минская областная клиническая больница».

Выделение нуклеиновых кислот из образцов биологического материала проводили с использованием реагента TRIzol. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript III reverse transcriptase, dNTP и Ribonuclease inhibitor («Invitrogen», США).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования были подобраны пары праймеров (forward и reverse) и TaqMan-зондов для генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2* и *MMP-9* с использованием программного обеспечения VectorNTI.

Ген *COL2A1*:

f-GCTGGAGAAGAAGGCAAG; r-CAGGTTCACCATTTGGCAC; p-FAM-TGCTGGTCTCTGCTGTCC-BHQ1.

Длина фрагмента — 391 п.о.

Ген *COL6A1*:

f-TCAGAATAGTGATGTGTTCGACGTT; r-AGCAACATGGATATG GTTCAGAAA; p-FAM-CCTTATGCCTAGCAACATGCCAATC-BHQ1.

Длина фрагмента — 98 п.о.

Ген *MMP-2*:

f-ATTCTGGAGATACAATGAGGTGAAG; r-GCACCTTGAAGA AGTAGCTG; p-FAM-TGCTGGTCTCTGCTGGTCCGTCTGC-BHQ1.

Длина фрагмента — 297 п.о.

Ген *MMP-9*:

f-CAAGGGCGTCGTGGTTCC; r-CCGTCTGGGTGTAGAGTC; p-FAM-CCTTATGCCTAGCAACAT-BHQ1.

Длина фрагмента — 253 п.о.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров и зондов при определении экспрессии каждого из исследуемых генов проводили моноплексную ПЦР-РВ. Амплификацию для каждого гена проводили в 10 образцах, пробы ставили в дублях [7].

Состав амплификационной смеси был универсален для всех генов и различался только вносимыми парой праймеров и зондом: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 3 мкл смеси f-праймер — r-праймер — p-зонд (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 рмоль/мкл) и 3 мкл соответствующей кДНК (комплементарной ДНК).

На основании расчета температуры отжига пар праймеров была выбрана универсальная программа для амплификации исследуемых генов: 95 °C — 15 мин.; 50 циклов: 95 °C — 20 с, 58 °C — 20 с, 72 °C — 15 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин. при использовании термоциклера «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Детекцию проводили по каналу «Green», так как зонды для всех генов были мечены флуорофором FAM.

Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР-РВ (таблица 1), для всех исследуемых генов находились в пределах от 20,05 (для гена *COL2A1*) до 34,17 (для гена *MMP-9*).

Для оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов. На электрофореграмме присутствовали четкие полосы на уровне детекции специфических фрагментов ДНК во всех анализируемых образцах [7].

После проведения электрофореза из геля извлекли фрагменты ДНК с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit («Qiagen», Германия) для проведения секвенирования с целью анализа нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК, для оценки аналитической специфичности разработанной методики [8].

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 («Applied Biosystems», США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit («Qiagen», Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 («Applied Biosystems», США) [7, 8].

Таблица 1 — Значения пороговых циклов для генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*, полученные при выполнении моноплексной ПЦР

Образец №		Значения пороговых циклов (Ct) для генов			
		<i>COL2A1</i>	<i>COL6A1</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-9</i>
1	1.1	29,24	26,65	27,11	29,32
	1.2	29,47	26,47	26,85	29,05
2	2.1	28,85	25,62	26,33	26,81
	2.2	28,33	25,87	26,02	26,52
3	3.1	20,05	24,31	30,21	31,22
	3.2	20,18	24,05	30,45	30,67
4	4.1	26,65	24,33	25,11	27,52
	4.2	26,71	24,76	24,68	27,14
5	5.1	27,14	29,63	31,14	28,92
	5.2	26,85	29,42	30,88	28,64
6	6.1	29,78	25,16	27,63	28,55
	6.2	29,06	24,82	27,14	28,01
7	7.1	24,52	23,55	26,54	27,66
	7.2	23,93	24,01	26,61	27,82
8	8.1	31,82	32,11	29,12	33,92
	8.2	31,03	31,64	28,77	34,17
9	9.1	30,13	31,03	32,64	33,36
	9.2	29,68	31,54	32,01	32,75
10	10.1	32,84	31,18	30,58	31,41
	10.2	32,55	30,78	30,42	31,02

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 («Applied Biosystems», США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit («Qiagen», Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 («Applied Biosystems», США) [7, 8].

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями анализируемых генов в online поисковой системе BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному гену. Все анализируемые образцы имели 100 % гомологию с зарегистрированными в базе данных последовательностями, что свидетельство-

вало о 100 % специфичности разработанной методики [7, 8].

Таким образом, подобранные пары праймеров и зонды можно использовать для амплификации фрагментов, изучаемых генов.

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны два образца (№ 3, 7) для проведения оценки эффективности ПЦР-РВ для генов *COL2A1* и *COL6A1*, а также 2 образца (№ 2, 4) — для генов *MMP-2* и *MMP-9*, 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 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях (рисунок 1).

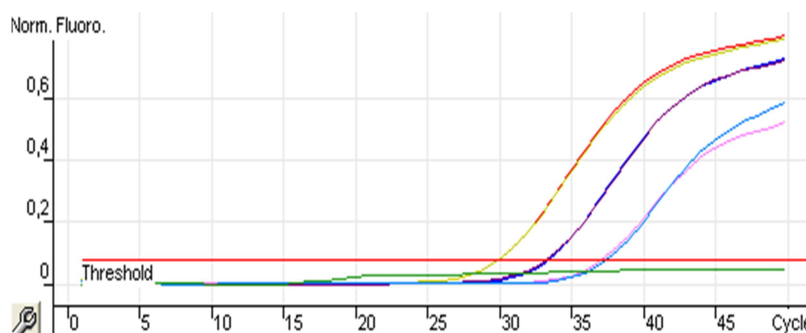


Рисунок 1 — Кривые флуоресценции для определения порогового цикла амплификации специфического фрагмента гена *COL6A1*

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями

пороговых циклов C_t и \log_{10} условной концентрации кДНК для изучаемых генов (рисунок 2).

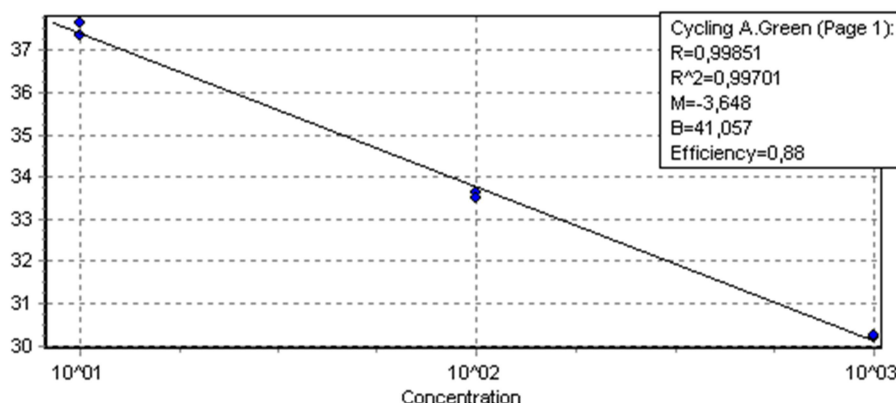


Рисунок 2 — Построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов C_t и \log_{10} условной концентрации кДНК для гена COL6A1

Корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов C_t и \log_{10} условной концентрации кДНК в образце составила от 0,994 до

0,999. Полученные значения эффективности ПЦР (таблица 2) находились в пределах от 1,56 (для гена COL2A1) до 1,71 (для гена MMP-2).

Таблица 2 — Значения пороговых циклов, эффективности и корреляции для генов COL2A1, COL6A1, MMP-2, MMP-9

Ген	№ образца	Значения пороговых циклов (Ct)						E	R²
		100		10		1			
		100.1	100.2	10.1	10.2	1.1	1.1		
COL2A1	3	20,46	20,69	23,51	23,88	27,42	27,67	1,61	0,997
	7	24,87	24,55	27,28	27,06	31,27	31,65	1,56	0,994
COL6A1	3	25,88	25,62	28,77	28,81	33,27	33,91	1,63	0,997
	7	25,15	25,61	28,45	28,76	31,98	32,46	1,57	0,995
MMP-2	2	30,01	30,08	33,74	33,69	37,12	37,35	1,71	0,999
	4	26,01	25,48	29,12	29,02	33,52	33,11	1,61	0,997
MMP-9	2	27,15	27,72	30,13	30,45	35,61	35,27	1,70	0,998
	4	28,24	28,14	31,34	31,05	36,27	36,02	1,61	0,996

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 1 [7]:

$$CV = \left| 1 - \frac{\text{рассчитанная концентрация ДНК}}{\text{известная концентрация ДНК}} \right| \times 100 \quad (1)$$

Количественное определение house-keeping генов проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию исследуемых таргетных генов, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций.

В качестве референсного был выбран ген HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyl-

transferase human 1), так как именно для него было установлено самое низкое значение коэффициента вариации — 5,8 %. Для генов HGUS, GAPDH, β -актин рассчитанные значения коэффициентов вариации находились на уровне 12,7, 10,4 и 13,3 % соответственно.

Для амплификации гена HPRT1 использовали: f-AGCGGTAACCATGCGTAT TT; r-CACATGTGAATTTCGGCTTG; p-ROX-GAAGGA ACTAGGGAAAAGGCA-BHQ2.

В ходе оценки эффективности протекания реакции амплификации для выбранного референсного гена HPRT1 было установлено, что при использовании подобранных пар праймеров, зонда, состава реакционной смеси и условий амплификации (которые были использованы и для таргетных генов) рассчитанное значение

эффективности протекания реакции составило 1,67. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена *HPRT1* и исследуемых генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9* позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации целевого и референсного генов в одной пробирке.

В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ в одной пробирке одновременно амплифицировали один из исследуемых генов (*COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*) и референсный ген *HPRT1*. Детекцию целевых генов проводили по каналу «Green», так как зонды для данных генов были мечены флуорофором FAM, а детекцию гена *HPRT1* проводили по каналу «Orange», так как зонд для него был мечен флуорофором ROX.

В пробирки для амплификации вносили: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для одного из целевых генов (*COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*), 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для гена *HPRT1* и 3 мкл ДНК (комплементарной ДНК).

Для выбора оптимального режима амплификации для каждого из исследуемых генов при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (таблица 3) с учетом оптимальной температуры отжига праймеров и одновременной амплификации двух генов в одной пробирке. Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Таблица 3 — Программы амплификации для генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*

Режим №	Программа амплификации
1	1 цикл: 95 °C — 15 мин.; 50 циклов: 95 °C — 20 с, 58 °C — 20 с, 72 °C — 15 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин.
2	1 цикл: 95 °C — 10 мин.; 45 циклов: 95 °C — 20 с, 58 °C — 20 с, 72 °C — 15 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин.
3	1 цикл: 94 °C — 10 мин.; 45 циклов: 94 °C — 20 с, 58 °C — 20 с, 72 °C — 20 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин.
4	1 цикл: 94 °C — 15 мин.; 50 циклов: 94 °C — 20 с, 58 °C — 20 с, 72 °C — 20 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин.

Наилучший результат амплификации для генов *COL2A1* и *COL6A1* и *HPRT1* был достигнут при использовании режима 1, для генов *MMP-2* и *MMP-9* и *HPRT1* — режима 3. Значения пороговых циклов для целевых генов находились в пределах от

21,63 до 35,49, для референсного гена *HPRT1* — от 19,43 до 31,24.

Для апробации разработанного метода расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) целевых генов (таблица 4) осуществляли по формуле 2 [7]:

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(Ct \text{ интересующего гена} - Ct \text{ гена } HPRT1)} \times 100 \% \quad (2)$$

Таблица 4 — Значения пороговых циклов и УНЭ для целевых генов

Ген	Значения пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COL2A1	29,24	28,85	21,63	26,65	27,14	29,78	23,93	31,82	30,13	32,84
<i>HPRT1</i>	24,15	26,72	22,13	24,81	25,16	23,41	19,42	26,64	27,11	24,57
% УНЭ	2,94	22,85	141,42	27,93	25,35	1,21	4,39	2,76	12,33	0,32
COL6A1	26,65	25,62	24,31	24,33	29,63	25,16	29,01	32,11	31,03	31,18
<i>HPRT1</i>	24,42	26,16	22,52	24,71	25,03	23,96	19,87	26,55	27,42	24,66
% УНЭ	21,32	145,40	28,92	130,13	4,12	43,53	0,18	2,12	8,19	1,09
MMP-2	27,11	26,33	30,21	25,11	31,14	27,63	26,61	29,12	32,64	30,58
<i>HPRT1</i>	24,51	26,17	22,27	24,17	25,32	23,78	19,81	26,39	27,42	24,75
% УНЭ	16,49	89,50	0,41	52,12	1,77	6,93	0,90	15,07	2,68	1,76
MMP-9	29,32	26,81	31,22	28,92	27,52	28,55	27,82	35,49	33,36	31,41
<i>HPRT1</i>	24,13	26,24	22,37	24,09	25,41	23,65	19,75	26,27	27,33	24,63
% УНЭ	2,74	67,36	0,22	3,52	23,16	3,35	0,37	0,17	1,53	0,91

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что разработанный метод можно использовать для одновременной амплификации одного из целевых генов (*COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*) и референсного гена *HPRT1*. Полученные с использованием разработанного метода данные можно использовать для расчета процента уровня нормализованной экспрессии генов *COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*. Рассчитанные значения процента уровня нормализованной экспрессии генов находились в пределах от 0,17 до 145,40 %.

Заключение

Анализ результатов, полученных в ходе разработки, оптимизации и валидации, позволил сделать вывод, что разработанный метод, основанный на использовании мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, специфических пар праймеров и зондов, можно использовать для одновременной амплификации одного из целевых генов (*COL2A1*, *COL6A1*, *MMP-2*, *MMP-9*) и референсного гена *HPRT1* при определении уровней нормализованной экспрессии данных генов в биоптатах (хрящевой ткани) пациентов с артропатией коленного сустава.

ЛИТЕРАТУРА

1. Северин ЕС. Биохимия. Москва, РФ: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 768 с.
2. Murdoch AD, Hardingham TE, Eyre, DR, Fernandes RJ The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture. *Matrix Biol.* 2016;50:16-26.
3. Bastiaansen-Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart A.C.W, van der Linden JC, Zuurmond AM, Weinans H. Contribution of collagen network features to functional properties of engineered cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;359:16.
4. Рогова ЛН, Шестернина НВ, Замечник ТВ, Фастова ИА. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор). *Вестник Новых Медицинских Технологий.* 2011;2:86-89.
5. Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Brain Pathol.* 2012;22(2):133-41.

6. Naderi M, Younesi MR, Dorgalaleh A. Association between expression of MMP-2 and MMP-9 genes and pathogenesis of intracranial hemorrhage in severe coagulation factor XIII deficiency. *Hematology.* 2015;20(8):487-92.
7. Костюк СА, Руденкова ТВ, Демидчик ЮЕ, Третьяк ИЮ. Разработка методики определения уровней экспрессии некоторых генов семейств ABC и GST в образцах из парафин-фиксированных срезов опухолевой ткани молочной железы. *Медицинские Новости.* 2014;12:55-58.
8. Костюк СА, Руденкова ТВ, Шиманская ИГ, Клименкова НВ, Полуян ОС, Глинкина ТВ Метод определения уровней экспрессии генов, обеспечивающих синтез коллагена и эластина, в биоптатах кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи. *Дерматовенерология. Косметология.* 2017;2:179-87.

REFERENCES

1. Severin ES. Biohimiya. Moskva, RF: GEOTAR-Media, 2009. 768 p. (in Russ.)
2. Murdoch, AD, Hardingham, TE, Eyre, DR, Fernandes, RJ. The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture. *Matrix Biol.* 2016;16:50.
3. Bastiaansen-Jenniskens, YM, Koevoet, W, de Bart, ACW, van der Linden, JC, Zuurmond, AM, Weinans, H. Contribution of collagen network features to functional properties of engineered cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;359:16.
4. Rogova LN, Shesternina NV, Zamechnik TV, Fastova IA. Matriksnyye metalloproteinazy, ikh rol v fiziologicheskikh i patologicheskikh protsessakh (obzor). *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologiy.* 2011;T. XVIII;2:86-89. (in Russ.).
5. Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Brain Pathol.* 2012;22(2):133-41.
6. Naderi M, Younesi MR, Dorgalaleh A. Association between expression of MMP-2 and MMP-9 genes and pathogenesis of intracranial hemorrhage in severe coagulation factor XIII deficiency. *Hematology.* 2015;20(8):487-92.
7. Kostyuk SA, Rudenkova TV, Demidchik YuE, Tretiak IYu. Razrabotka metodiki opredeleniya urovney ekspressii nekotorykh genov semeystv ABC i GST v obraztsakh iz parafin-fiksirovannykh srezov opukholevoy tkani molochnoy zhelezy. *Meditsinskiye Novosti.* 2014;12:55-8. (in Russ.)
8. Kostyuk SA, Rudenkova TV, Shimanskaya IG, Klimenkova NV, Poluyan OS, Glinkina TV. Metod opredeleniya urovney ekspressii genov, obespechivayushchikh sintez kollagena i elastina, v biopтатаkh kozhi patsiyentov s khronicheskimi dermatozami, soprovozhdayushchimisya atrofiyey kozhi. *Dermatovenerologiya. Kosmetologiya.* 2017;2:179-87. (in Russ.)

Поступила 11.03.2020

Received 11.03.2020

Принята в печать 24.09.2020

Accepted 24.09.2020

Сведения об авторах:

Костюк Светлана Андреевна — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; e-mail: s.kostiuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3252-2626>

Полуян Ольга Сергеевна — к.б.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; <https://orcid.org/0000-0001-7130-2776>

Руденкова Татьяна Владимировна — к.б.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; <https://orcid.org/0000-0002-8917-6816>

Бенько Александр Николаевич — к.м.н., доцент кафедры травматологии и ортопедии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Герасименко Михаил Александрович — д.м.н., профессор, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии».

Автор, ответственный за переписку:

Костиук Светлана Андреевна — e-mail: s.kostiuk@mail.ru

Information about authors:

Svetlana A. Kostiuk — Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief researcher at the Science-Research Laboratory of Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education; e-mail: s.kostiuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3252-2626>

Olga S. Poluyan — Leading researcher at the Science-Research Laboratory of Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education; <https://orcid.org/0000-0001-7130-2776>

Tatyana V. Rudenkova — Candidate of Biological Sciences, Leading researcher at the Science-Research Laboratory of Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education; <https://orcid.org/0000-0002-8917-6816>

Alexander N. Benko — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at Traumatology and Orthopedics Department of Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education.

Michael A. Gerasimenko — Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics.

Corresponding author:

Svetlana A. Kostiuk — e-mail: s.kostiuk@mail.ru