

**СЕКЦИЯ 9**  
**«КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА.**  
**ИММУНОЛОГИЯ. АЛЛЕРГОЛОГИЯ»**

---

УДК [575.113:577.112]:616-006-07

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОВ-ЦИКЛИНОВ**  
**В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ВЕРИФИКАЦИИ**  
**ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Воропаев Е. В., Осипкина О. В., Шафорост А. С.,  
Зятыков А. А., Баранов О. Ю., Беляковский В. Н.*

**Учреждение образования**  
**«Гомельский государственный медицинский университет»**  
**г. Гомель, Республика Беларусь**

***Введение***

В настоящее время в области диагностики различных заболеваний неинфекционного генеза, в том числе и онкологических процессов, широкое развитие получило направление, связанное с функциональной оценкой транскриптомов, что позволяет использовать данные об уровне активности генов в качестве одного из критериев характеристики патологических изменений [1]. Согласно общепринятой методологии молекулярно-биологической диагностики опухолей, основными объектами исследований является генотип (в т. ч. наследуемые и соматические точечные мутации, хромосомные aberrации) и фенотип (включая оценку уровня экспрессии генов) патологических тканей. В то же время, необходимо отметить, что экспрессионная активность может регулироваться на всех уровнях реализации генетической информации: транскрипции, трансляции и пост-трансляционной модификации полипептидов. Регуляция генов позволяет клеткам осуществлять контроль над поддержанием структурой и функциональной целостности, является молекулярной основой их дифференцировки, морфогенеза и адаптации. Система регуляции генов, также может выступать в качестве объекта для различных эволюционных изменений, поскольку все атрибуты экспрессии (временные, структурные, количественные и др.) представляют собой исходный материал для процессов отбора. Кроме филогенетической значимости, система регуляция генов играет важную роль для функционирования онтогенетических процессов, включая возникновение и развитие онкологических заболеваний. Среди регуляторных элементов, ассоциированных с процессами онкогенеза, наиболее изученными являются циклины — гены, детерминирующие функциональные характеристики различных процессов клеточного цикла [2]. К настоящему моменту, одним из широко используемых в лабораторной практике методов для оценки активности генов является количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), или ПЦР в реальном времени [3]. Анализ данных, получаемых при использовании данного аналитического метода, позволяет производить оценку как количественных характеристик уровня транскрипционной активности, так и выполнять дополнительный анализ структурных особенностей изучаемых генов. Обработка первичных данных анализа, как правило, осуществляется путем оценки кинетики ПЦР реакции и изучении термодинамических особенностей амплифицируемого продукта [3]. Для проведения такого рода анализа предлагается и апробировано нами несколько вариантов оценки полученных данных [4].

### **Цель**

Разработать и апробировать протоколы молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний путем изучения особенностей регуляции клеточного цикла и оценки полиморфизма генов-циклинов семейств A, B, C, D на сформированных когортах больных с использованием метода ПЦР в реальном времени.

### **Материал и методы исследования**

Исследования проводились на базе научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Для проведения исследований экспрессии генов-циклинов использовались образцы биоптатов желудка и кишечника пациентов с различной онкологической патологией, хранящиеся в банке биологического материала научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет», в том числе лица инфицированные *Helicobacter pylori*, и больные находящиеся на учете в Гомельском областном онкологическом диспансере.

Выделение нуклеиновых кислот, получение кДНК, проведение ПЦР, электрофоретической детекции, секвенирования проводили с использованием соответствующих коммерческих наборов реагентов (фирма ThermoScientific, США). Амплификацию проводили, используя термоциклеры «RotorGene 3000» и «RotorGene Q» (фирма Corbett Research, Австралия).

Материалы исследования статистически обработаны с использованием методов параметрического и непараметрического анализа («MS Excel 2010», «Statistica» 6.0). При описании количественных показателей, имеющих нормальное распределение, полученные данные объединялись в вариационные ряды, в которых проводили расчет средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95 % доверительного интервала (95 % ДИ) ( $p < 0,05$ ).

На первом этапе работы проводили разработку структуру праймеров и зондов для выявления различных циклинов семейств (A-D), включая их виды (A1, A2, B1, B2, C, D1, D2, D3) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени кДНК-матриц (ОТ-ПЦР-РВ), протоколы SybrGreen и TaqMan, используя соответствующее программное обеспечение. После проведения амплификации диагностических маркеров, для сопоставления получаемых данных экспрессии генов различных образцов проводили нормализацию (уравнивание) результатов по референсным генам, характеризующимся относительно стабильным уровнем транскрипции в ткани, вне зависимости от ее физиологического состояния.

### **Оценка качественных показателей реакции и достоверности результатов ПЦР-РВ**

Кроме имеющихся образцов, для качественного контроля ПЦР-РВ в ходе каждой реакции использовали дополнительные: «отрицательный» и «положительный» пробы. Отрицательный образец представлял собой дистиллированную воду и был предназначен для выявления артефактов в ходе реакции. Наличие амплификации в данной пробе указывало на загрязнение реагентов или расходных материалов чужеродной ДНК. Положительный контроль представляет собой пробу, содержащую кДНК (ДНК) для которой в ходе предварительного изучения была получена достоверная амплификация. Отсутствие ПЦР-реакции в положительном образце указывало на некорректность при составлении ПЦР-смеси или программы амплификации. В качестве референсных маркеров использовались «гены домашнего хозяйства»: ACTB, Hu2BM, GAPD. Отсутствие амплификации или высокое значение Ct ( $> 30$  цикла) указывало на незначительное содержание кДНК в пробе или низкое качество образцов. Качество препаратов кДНК проверяли путем количественного анализа разведений. Для этого приготавливалось 5 вариантов разведений: 1:0, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. В случае низкого

качество препарата кДНК (в частности, наличия ингибиторов ПЦР) отмечалось изменения угла наклона экспоненциальной части кривой вариантов или выявления несоответствия разницы  $C_t$  между первыми и последними вариантами разведений.

Некачественные или контаминированные образцы кДНК и реагенты подлежали элиминации из дальнейшей работы. Специфичность амплификации в ходе выполнения SYBRGreen протокола производилась с помощью оценки кривых плавления.

Результаты работы представлены на примере изучения экспрессии гена циклина D1.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

На первом этапе изучения экспрессии в биоптатах исследуемых образцов, был проведен анализ контрольных образцов — препаратов РНК из клеточных культур различных типов тканей. Изучение физиологически «нормальных» тканей выявило значительно меньший уровень экспрессии данного локуса, по сравнению с патологическими тканями в среднем в 130 раз. Так, в препаратах кДНК из культур *in vitro* опухолевых тканей молочной железы и кишечника, показатель  $\Delta C_t$  имел значение равное 5,0–5,1, относительно генов-нормализаторов, в тоже время, данный параметр в нормальных тканях варьировал 12,1–12,2.

При анализе полученных данных было установлено, что структурный полиморфизм данного локуса не имел абсолютной направленности по отношению к изменению уровня экспрессии для патологических и нормальных тканей. В то же время, для большей части вариантов, в тканях без признаков онкологических изменений экспрессия данного локуса была ниже по сравнению с опухолевыми тканями (таблица 1).

Таблица 1 — Нормализованные значения параметра  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ) гена циклина D1 в изученных биоптатах желудка и кишечника (фрагмент базы данных)

Образец	$\Delta C_t$	Образец	$\Delta C_t$	Образец	$\Delta C_t$
1049 БкN	9,0	1055 БжN	14,4	1060 БкN	14,7
1049 БкO	7,1	1055 БжO	11,8	1060 БкO	13,5
1050 БкN	10,3	1056 БкN	14,9	1061 БкN	16,4
1050 БкO	6,2	1056 БкO	10,1	1061 БкO	11,2
1051 БкN	11,1	1057 БкN	13,0	1062 БжN	15,1
1051 БкO	7,4	1057 БкO	7,2	1062 БжO	18,0
1053 БкN	14,0	1058 БжN	14,3	1063 БжN	17,2
1053 БкO	10,5	1058 БжO	17,4	1063 БжO	12,4

*Примечание:* Бж — биоптат желудка; Бк — биоптат кишечника; N — норма; O — патология (опухоль)

В целом, различия между тканями по данному гену являются диагностически достоверными, поскольку уровень активности данного локуса в патологических тканях был более высоким относительно других генов циклинов (рисунки 1 и 2). Так, абсолютные значения  $C_t$  для большинства образцов находились в пределах 22–28 циклов (рисунок 3).

Однако, значения показателя  $\Delta C_t$  различались в меньшей степени, по сравнению с препаратами, полученными из клеточных линий.

Как видно из представленных данных на рисунках 1 и 2, изменения спектров активности генов затрагивает все семейства циклинов, и в особенности группу D, что также согласуется с имеющимися литературными данными [5]. Следует отметить, что для доминирующего числа клинических биоптатов пар сравнения «патология-норма» уровень экспрессии всегда различался в четыре и более раз.

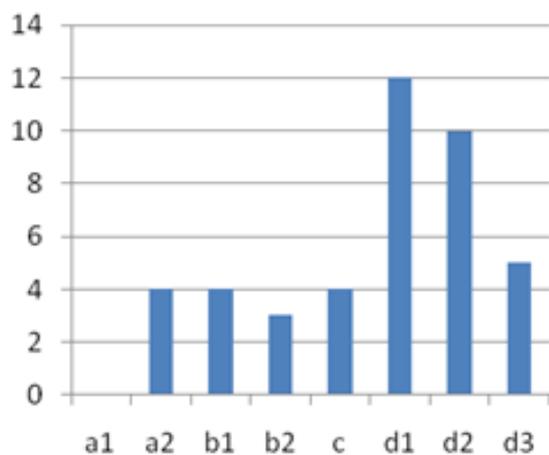


Рисунок 1 — Значения параметра  $\Delta C_t$  генов-циклинов в клетках нормальной ткани

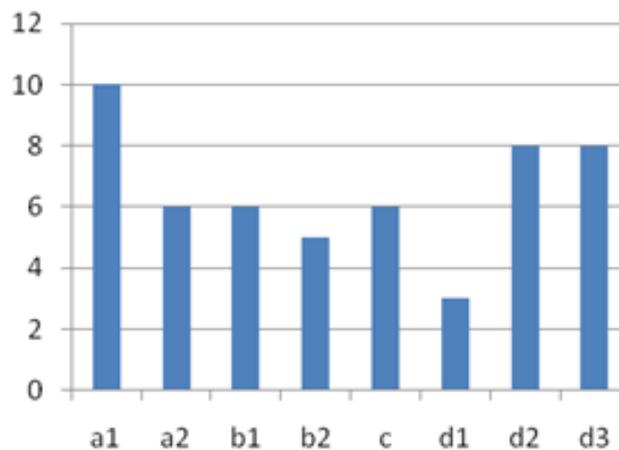


Рисунок 2 — Значения параметра  $\Delta C_t$  генов-циклинов в клетках опухоли кишечника

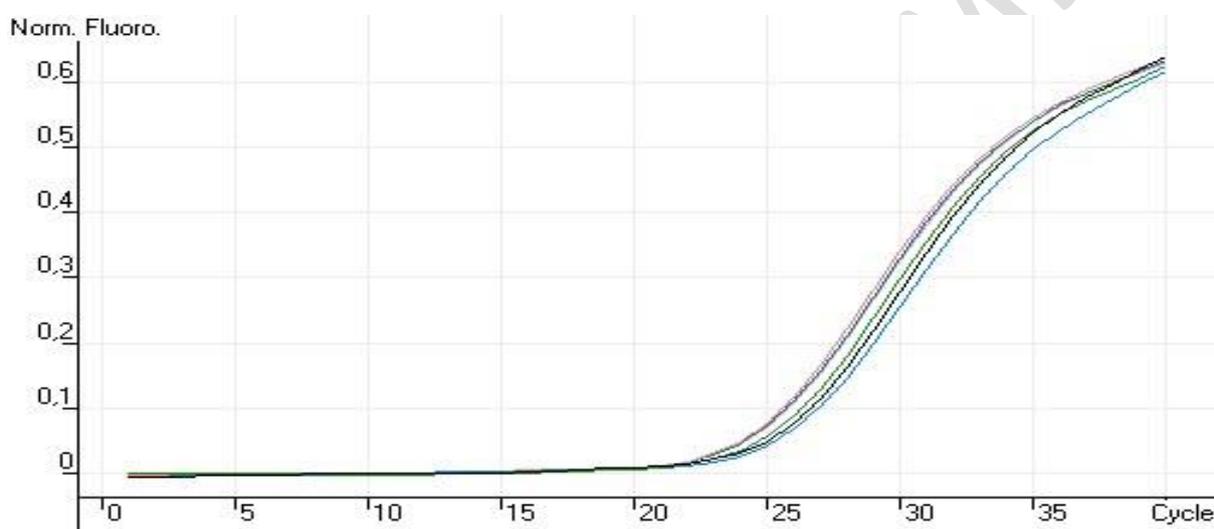


Рисунок 3 — Кинетические кривые амплификации гена циклина D1 исследованных патологических образцов

### Заключение

Таким образом, значение уровня экспрессии генов-циклинов может являться дополнительным маркером верификации онкологических состояний, однако в ряде случаев могут иметь место гистологические и индивидуальные различия, а также типология опухолей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Dixit M. Reduced expression of IQGAP2 and higher expression of IQGAP3 correlates with poor prognosis in cancers / D. Kumar [et al.] // PLoS One. — 2017 Oct 26. — Vol. 12(10):e0186977. doi: 10.1371/journal.pone.0186977. PMID: 29073199; PMCID: PMC5658114.
2. Cyclin D1 and cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer / S. Kumari [et al.] // Med Oncol. — 2016 May. — Vol. 33(5):40. doi: 10.1007/s12032-016-0754-8. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27034264.
3. Development of strand-specific real-time RT-PCR for the analysis of SCRV transcription and replication dynamics / M. A. Valasek [et al.] // Microb Pathog. — 2019 Apr. — Vol. 129. — P. 146–151. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.001. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30731189.
4. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. — Минск: Юнипол, 2007. — 176 с.
5. Elevated HOXA1 expression correlates with accelerated tumor cell proliferation and poor prognosis in gastric cancer partly via cyclin D1 / C. Yuan [et al.] // J Exp Clin Cancer Res. — 2016 Jan 2. — Vol. 35:15. doi: 10.1186/s13046-016-0294-2. PMID: 26791264; PMCID: PMC4721151.