



Полуян О.С.✉, Костюк С.А., Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.
Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Усовершенствование и клиническая апробация метода определения уровней нормализованной экспрессии генов костного гомеостаза (COL1A1) и рецептора витамина D (VDR) в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Полуян О.С., Костюк С.А.; сбор материала – Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.; обработка материала, написание текста – Полуян О.С.; редактирование – Костюк С.А.

Подана: 28.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: olga.poluyan@mail.ru

Резюме

Цель. Усовершенствование и клиническая апробация молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта.

Материалы и методы. В исследование включено 123 образца биологического материала (соскоб клеток эпителия ротовой полости), в которых с использованием усовершенствованного метода ПЦР в реальном времени проводили определение уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR. Статистическая обработка данных проводилась с помощью SPSS 16 (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 перцентилей – Me (25/75), сравнение независимых групп количественных переменных проводили с использованием критерия Манна – Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

Результаты. В ходе исследования подобраны нуклеотидные последовательности пар праймеров и молекулярных зондов, меченных флуоресцентными красителями, оптимизированы состав амплификационной смеси и температурные профили реакции амплификации. Для нормализации использовали ген человека HPRT1. Усовершенствованный метод, основанный на использовании мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, специфических пар праймеров и зондов, можно использовать для одновременной амплификации целевого гена (COL1A1 и VDR) и референсного гена HPRT1 при определении уровней нормализованной экспрессии указанных генов в биологическом материале пациентов с заболеваниями периодонта.



Заключение. Проведенные молекулярно-генетические исследования с использованием усовершенствованного метода позволили получить количественные данные уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в образцах биологического материала пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта. С использованием непараметрических методов статистического анализа установлено отсутствие ($p > 0,05$) статистически значимых достоверных различий в уровнях нормализованной экспрессии гена VDR, тогда как для гена COL1A1 такие различия установлены ($p < 0,05$), за исключением групп 1-4, 2-3, 2-4 и 3-4.

Ключевые слова: ПЦР, ген α -1 цепи коллагена 1-го типа, ген рецептора витамина D, уровни нормализованной экспрессии, заболевания периодонта

Poluyan O.✉, Kostiuk S., Melnikova T., Yudina N.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Improvement and Clinical Testing of the Method for Determining the Normalized Expression Levels of Bone Homeostasis Gene (COL1A1) and Vitamin D Receptor Gene (VDR) in Biological Material of Patients with Inflammatory Periodontal Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – Poluyan O., Kostiuk S.; collection of material – Melnikova T., Yudina N.; material processing, text writing – Poluyan O.; editing – Kostiuk S.

Submitted: 28.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: olga.poluyan@mail.ru

Abstract

Purpose. Improvement of the molecular genetic method for determining the normalized expression levels of the COL1A1 and VDR genes and its clinical approbation in the biological material of patients with inflammatory periodontal diseases.

Materials and methods. The study included 123 samples of biological material (scraping of the epithelial cells of the oral cavity), in which, using an improved real-time PCR method, the levels of normalized expression of the COL1A1 and VDR genes were determined. Statistical data processing was carried out using SPSS 16 (SPSS Inc.). All quantitative data had a non-parametric distribution and are presented as median values (Me) indicating 25/75 percentiles: Me (25/75), comparison of independent groups of quantitative variables was performed using the Mann-Whitney test. The critical level of significance in testing statistical hypotheses was the level $p < 0.05$.

Results. In the course of the study, the nucleotide sequences of pairs of primers and molecular probes labeled with fluorescent dyes were selected, the composition of the amplification mixture and the temperature profiles of the amplification reaction were optimized. The human HPRT1 gene was used for normalization. An improved method based on the use of multiplex real-time PCR, specific pairs of primers and probes, can

be used for simultaneous amplification of the target gene (COL1A1 and VDR) and the reference gene HPRT1 in determining the levels of normalized expression of these genes in the biological material of patients with periodontal diseases.

Conclusion. Conducted molecular genetic studies using an improved method made it possible to obtain quantitative data on the levels of normalized expression of the COL1A1 and VDR genes in samples of biological material from patients with inflammatory periodontal diseases. Using non-parametric methods of statistical analysis, it was found that there were no ($p>0.05$) statistically significant differences in the levels of normalized expression of the VDR gene, then for the COL1A1 gene such differences were established ($p<0.05$), except for groups 1-4, 2-3, 2-4 and 3-4.

Keywords: PCR, type 1 collagen α -1 gene, vitamin D receptor gene, normalized expression levels, periodontal disease

■ ВВЕДЕНИЕ

Болезни пародонта – ведущая стоматологическая проблема. Наибольшей распространенности (60–65%) периодонтит достигает у людей старше 30 лет [1]. Одной из задач лечения пациентов с заболеваниями пародонта становится профилактика или устранение функциональной перегрузки пародонта, которая на определенной стадии болезни оказывается одним из главных патогенетических факторов, определяющих ее течение.

Авторы многих работ указывают на взаимосвязи болезней с нарушением метаболизма костной ткани организма и патологией пародонта. Так, у пациентов с тяжелой потерей минеральной плотности кости (МПК) отмечается достоверное повышение риска тяжелых форм генерализованного периодонтита [2]. В ряде исследований [3, 4] продемонстрирована значимая корреляция ($p<0.02$) между потерей плотности костной ткани в периферическом скелете и потерей МПК в челюстях.

Коллаген 1-го типа является основным белком матрикса соединительной (до 25–30%) и костной (90%) тканей. Он придает механическую прочность и выполняет морфогенетическую функцию, влияя на рост, миграцию и дифференцировку клеток, определяя их секреторную и синтетическую активность. Структурно он образован из α 1- и α 2-полипептидных цепей, синтез которых у человека детерминирован двумя соответствующими генами – COL1A1 и COL1A2. В настоящее время известны мутации в этих генах, приводящие к развитию переломов, остеопений, а также полиморфизмы, ассоциированные со снижением минеральной плотности костной ткани [5]. К настоящему времени одним из генов-кандидатов снижения минеральной плотности костной ткани является ген α -1 цепи коллагена 1-го типа (COL1A1) [6].

Нарушение образования гормонов и их дефицит также могут стать причиной развития патологии пародонта. Дефицит витамина D, обладающего широким спектром биологических свойств и участвующего в регуляции многих важных физиологических процессов, также имеет негативные последствия и лежит в основе ряда заболеваний [2]. До недавнего времени наиболее изученным свойством витамина D была его регуляция кальций-фосфорного гомеостаза. Однако новые данные отечественных и зарубежных авторов позволяют расширить представления о подлинном его



влиянии на разнообразные биологические эффекты. Витамин D имеет свой ядерный рецептор, в связи с этим его относят к гормоноподобным соединениям и даже часто называют D-гормоном [7]. Молекулярные механизмы действия витамина D связаны с наличием участков ДНК, с которыми происходит связывание комплекса гормон – рецептор в генах, кодирующих трансэпителиальные кальциевые каналы в эпителиоцитах кишечника и почках, а также в гене RANKL, который отвечает за созревание, активацию и продолжительность жизни остеокластов [8, 9]. Рецептор витамина D входит в суперсемейство стероидных ядерных рецепторов и обязателен для реализации большинства известных биологических эффектов витамина D [8, 10].

Изучение влияния молекулярно-генетических факторов на риск развития тяжелых форм воспалительных заболеваний периодонта является весьма важным для современной персонифицированной и предиктивной медицины, поскольку дает возможность прогнозировать развитие заболевания, характер течения и риск возможных осложнений.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усовершенствование и клиническая апробация молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологического материала для установления функционального состояния генов COL1A1 и VDR использовали соскоб клеток эпителия ротовой полости 108 пациенток репродуктивного возраста с заболеваниями периодонта, проходивших амбулаторное лечение на базе кафедры общей стоматологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», а также 15 практически здоровых женщин, составивших группу контроля.

Всем пациенткам диагноз устанавливали на основании клинических параметров и рентгенологической картины. В группу 1 (n=26) «хронический гингивит» (МКБ-10 K05.10 – хронический простой маргинальный гингивит) относили пациенток с признаками воспаления десны, без потери зубодесневого прикрепления, глубина зондирования десневой борозды не превышала 3 мм. Группы с хроническим периодонтитом отличались наличием периодонтальных карманов и потери зубодесневого прикрепления. В группу 2 (n=22) «хронический периодонтит» (МКБ-10 K05.30 – хронический простой периодонтит) включены пациентки с горизонтальной деструкцией костной ткани (по данным дополнительной, лучевой диагностики). В группу 3 (n=35) «хронический сложный периодонтит» (МКБ-10 K05.31 – хронический сложный периодонтит) включены пациентки с горизонтальной и вертикальной деструкцией костной ткани (по данным дополнительной, лучевой диагностики). В группу 4 (n=25) «сложный агрессивный периодонтит» (МКБ-10 K05.31 – хронический сложный периодонтит (агрессивная форма течения)) включены пациентки с хроническим сложным периодонтитом, у которых по данным анамнеза было установлено раннее начало заболевания (до 30 лет) с частым абсцедированием.

Учитывая возраст обследуемых пациенток (женщины до 44 лет) и высокую распространенность патологии периодонта (до 98% взрослого населения), существовали ограничения по включению женщин в группу контроля (здоровые, без истории

любого заболевания тканей периодонта, без клинических признаков воспаления десен, кровоточивости десны, рентгенологических признаков потери костной ткани, без потери зубодесневого прикрепления на любой поверхности зуба. Таким образом, в исследование включено 15 женщин группы контроля, что достаточно для непараметрических методов статистического анализа.

Выделение РНК из образцов биологического материала, основанное на принципе связывания нуклеиновых кислот с силикатными сорбентами в присутствии хаотропных солей и их последующей элюции в низкосолевого буфера, проводили с использованием наборов реагентов «АртРНК MiniSpin» (производитель «АртБиоТех», Республика Беларусь). По окончании этапа пробоподготовки препарат РНК незамедлительно использовали для постановки реакции обратной транскрипции.

Определение концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты проводили спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda=230$ нм. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230.

Расчет уровней нормализованной экспрессии целевых генов осуществлялся по формуле:

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(\text{Ct интересующего гена} - \text{Ct гена omp1})} \times 100\%,$$

где CT – пороговый цикл (cycle threshold).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS, версия 16 (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 перцентилей – Me (25/75). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна – Уитни (U-тест). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования с использованием программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse), а также TaqMan-зонды (probe) для определения уровней нормализованной экспрессии гена COL1A1 и гена VDR.

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

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для выбранных гомологичных участков с использованием бесплатного программного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold.

На основании проведенных исследований нами подобраны пары праймеров (forward и reverse) и TaqMan-зонд (probe) для гена COL1A1: forward – CCTGGAATGAAGGGACACAGAGGT; reverse – TGACCAGGAGCTCCATTTTCACCA; probe – FAM-TGCTGGTCTGCTGGTCCTA-BHQ1. Для гена VDR: forward –



ACAGCATCCAAAAGGTGGTC; reverse – TGA^{CTTCAGCAGCACGATCT}, probe – FAM-TATGGGCAAAAACCACAG-BHQ1.

Проведенная оценка специфичности выбранных наборов олигонуклеотидных праймеров и зондов с использованием онлайн-приложения NCBI/Blast подтвердила 100%-ную гомологию геному человека и отсутствие гомологии с другими организмами.

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля ПЦР в режиме реального времени использовали последовательность ДНК гена HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human) генома человека. Дизайн олигонуклеотидов начали с последовательности, расположенной в начале гена и протяженностью 1200 п. о.

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона Ic AGCGGTA ACCATGCGTATTTGACACACGAAGGAAGGAACTAGGGAAAAGGCATTAGGTCATTTCAAGCCGAAAT TCACATGTG.

В результате анализа с использованием алгоритма mfold установлено, что во время протекания ПЦР, а именно на стадии отжига/элонгации при +60 °C все вероятные вторичные шпильчатые структуры будут нестабильны. Анализ с использованием алгоритма Vector NTI показал наличие 29 вероятных вторичных шпильчатых структур. Стабильных структур выявлено не было. Результаты анализа олигонуклеотидных праймеров показали практически полное отсутствие негативных эффектов за счет гомо- и гетеродимеров.

Затем были проведены исследования по моделированию совместимости внутреннего контроля и олигонуклеотидных праймеров для амплификации участков генов COL1A1 и VDR в условиях мультиплекс-ПЦР (две реакции в одной пробирке). При постановке совместных мультиплекс-реакций учитывались вероятные гетеродимеры олигонуклеотидов, которые компенсировались, 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 гена COL1A1 и гена VDR и внутреннего контроля показал, что в большинстве случаев выбранные олигонуклеотиды последнего не образуют стабильных гетеродимеров в условиях протекания этапа отжига/элонгации ПЦР.

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

Состав амплификационной смеси включал в себя: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 3 мкл смеси F-праймер – R-праймер – Р-зонд (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 рмоль/мкл) и 3 мкл соответствующей кДНК.

На основании расчета температуры отжига пар праймеров была выбрана программа амплификации: 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.

Таблица 1
Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР
Table 1
Threshold cycle values obtained from monoplex PCR

№ образца		Значения пороговых циклов (Ct)	
		для гена COL1A1	для гена VDR
1	1.1	29,24	23,15
	1.2	29,47	23,46
2	2.1	28,85	19,45
	2.2	28,33	19,54
3	3.1	20,05	25,16
	3.2	20,18	25,84
4	4.1	26,65	22,19
	4.2	26,71	22,23
5	5.1	27,14	28,87
	5.2	26,85	29,04
6	6.1	29,78	31,05
	6.2	29,06	31,33
7	7.1	24,52	26,74
	7.2	23,93	26,59
8	8.1	31,82	33,29
	8.2	31,03	33,47
9	9.1	30,13	21,13
	9.2	29,68	20,95
10	10.1	32,84	28,14
	10.2	32,55	28,34

Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР в режиме реального времени (табл. 1), для гена COL1A1 находились в пределах от 20,05 до 32,84, для гена VDR – в пределах от 19,45 до 33,47.

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.

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 [11].

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) [11].

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями анализируемых генов в поисковой



онлайн-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%-ную гомологию с зарегистрированными в базе данных последовательностями, что свидетельствовало о 100%-ной специфичности разработанной методики [11].

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны два образца (№ 3, 7) для проведения оценки эффективности (Е) ПЦР-ПВ для гена COL1A1 и два образца (№ 2, 9) для проведения оценки эффективности (Е) ПЦР-ПВ для гена VDR, так как значения пороговых циклов амплификации для указанного гена 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.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК для изучаемого гена.

Для гена COL1A1 корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК в образце составила 0,997. Полученное значение эффективности ПЦР составило 1,61. Для гена VDR корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК в образце составила 0,998. Полученное значение эффективности ПЦР составило 1,72.

Количественное определение house-keeping гена 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 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 для генов COL1A1 и VDR составило 1,67 и 1,63 соответственно. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена HPRT1 и исследуемых генов позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации таргетного и референсного генов в одной пробирке.

В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-ПВ в одной пробирке одновременно амплифицировали исследуемый ген (COL1A1 или VDR) и референсный ген HPRT1. Детекцию таргетного гена проводили по каналу Green, так как зонды 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 таргетного гена, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для гена HPRT1 и 3 мкл кДНК.

Для выбора оптимального режима амплификации при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (табл. 2) с учетом оптимальной температуры

Таблица 2
Тестируемые программы амплификации
Table 2
Tested amplification programs

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.

Таблица 3
Значения пороговых циклов и УНЭ для гена COL1A1 и VDR
Table 3
Threshold cycles values and normalized gene expression levels for COL1A1 and VDR genes

Ген	Значения пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COL1A1	25,18	25,33	19,55	23,94	22,27	23,00	21,23	20,32	24,79	25,83
HPRT1	27,99	23,34	21,86	23,67	22,03	23,85	22,52	23,32	23,35	27,42
% УНЭ	14,26	397,24	20,17	20,58	118,10	55,48	40,90	12,50	271,32	33,22
VDR	18,79	21,56	13,51	3,58	19,26	26,11	29,12	27,73	25,54	28,09
HPRT1	23,18	26,48	22,54	27,11	26,94	25,63	29,38	22,97	23,59	24,42
% УНЭ	4,77	3,30	0,19	0,00	0,49	139,47	83,51	2709,58	386,37	1272,86

отжига праймеров и одновременной амплификации двух генов в одной пробирке. Амплификацию проводили с использованием термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

Наилучший результат амплификации был достигнут при использовании режима 1. Значения пороговых циклов для гена COL1A1 находились в пределах от 19,55 до 25,83, для референсного гена HPRT1 – от 21,86 до 27,99; для гена VDR – в пределах от 3,58 до 29,12, для референсного гена HPRT1 – от 22,54 до 29,38.

Для апробации разработанного метода расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) целевого гена (табл. 3) осуществляли по формуле.

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что усовершенствованный метод можно использовать для одновременной амплификации целевого гена COL1A1 и референсного гена HPRT1, а также целевого гена VDR и референсного гена HPRT1. Полученные с использованием усовершенствованного метода данные оказались возможным использовать для расчета процента уровня нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR. Рассчитанные значения процента уровня нормализованной экспрессии генов



находились в пределах от 12,50 до 397,24% (для гена COL1A1) и в пределах от 0,00 до 2709,58% (для гена VDR).

На следующем этапе были проведены молекулярно-генетические исследования по определению уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR непосредственно в образцах биологического материала (соскоб клеток эпителия ротовой полости) пациенток с воспалительными заболеваниями периодонта.

На основании выполненных молекулярно-генетических исследований установлено, что уровни нормализованной экспрессии гена COL1A1 для группы 1 составили Me (Q25/75) 123,54 (95,69/179,71)%, для группы 2 – 46,05 (20,59/126,08)%, для группы 3 – 22,38 (11,66/52,12)%, для группы 4 – 35,60 (14,95/215,21)%, для группы 5 – 338,70 (232,95/499,33)% (рис. 1).

Использование непараметрического критерия Манна – Уитни позволило сделать вывод о наличии статистически достоверных различий между некоторыми исследуемыми группами (табл. 4).

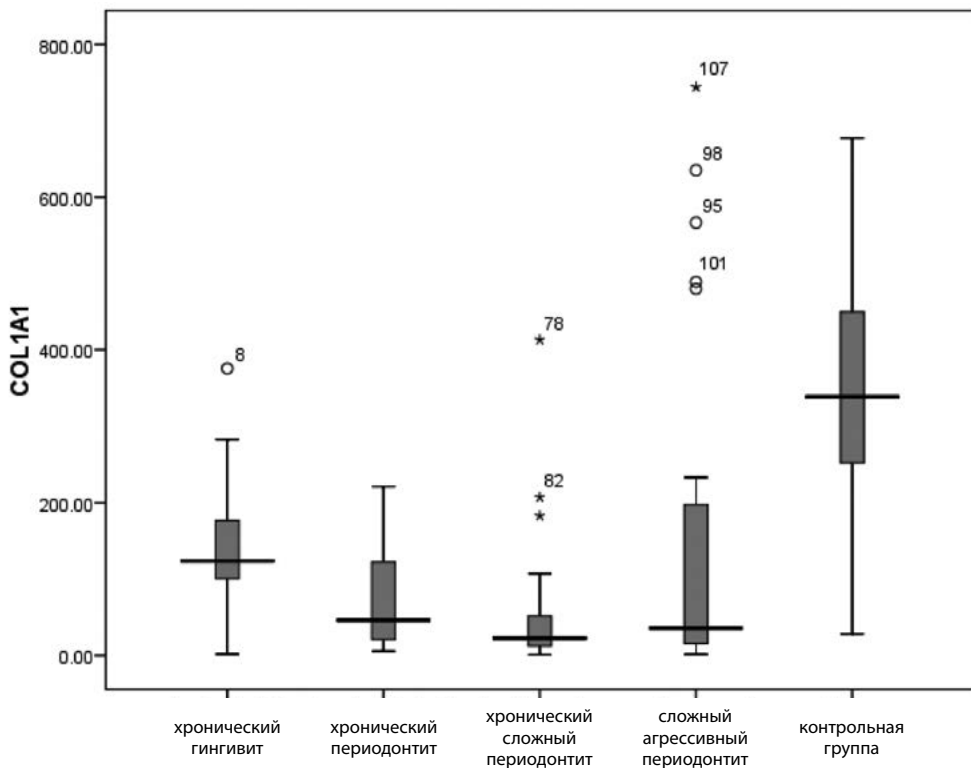


Рис. 1. Уровни нормализованной экспрессии гена COL1A1 в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта

Fig. 1. Normalized gene expression levels for COL1A1 gene in the biological material of patients with inflammatory periodontal diseases

Таблица 4
 Статистические параметры критерия Манна – Уитни
 Table 4
 Statistical parameters of the Mann-Whitney test

Сравниваемые группы	Показатель Z	Показатель p
1-2	-2,638	0,008
1-3	-4,631	<0,001
1-4	-1,781	0,075
1-5	-4,168	<0,001
2-3	-1,746	0,081
2-4	-0,192	0,848
2-5	-4,547	<0,001
3-4	-1,162	0,245
3-5	-4,965	<0,001
4-5	-3,087	0,002

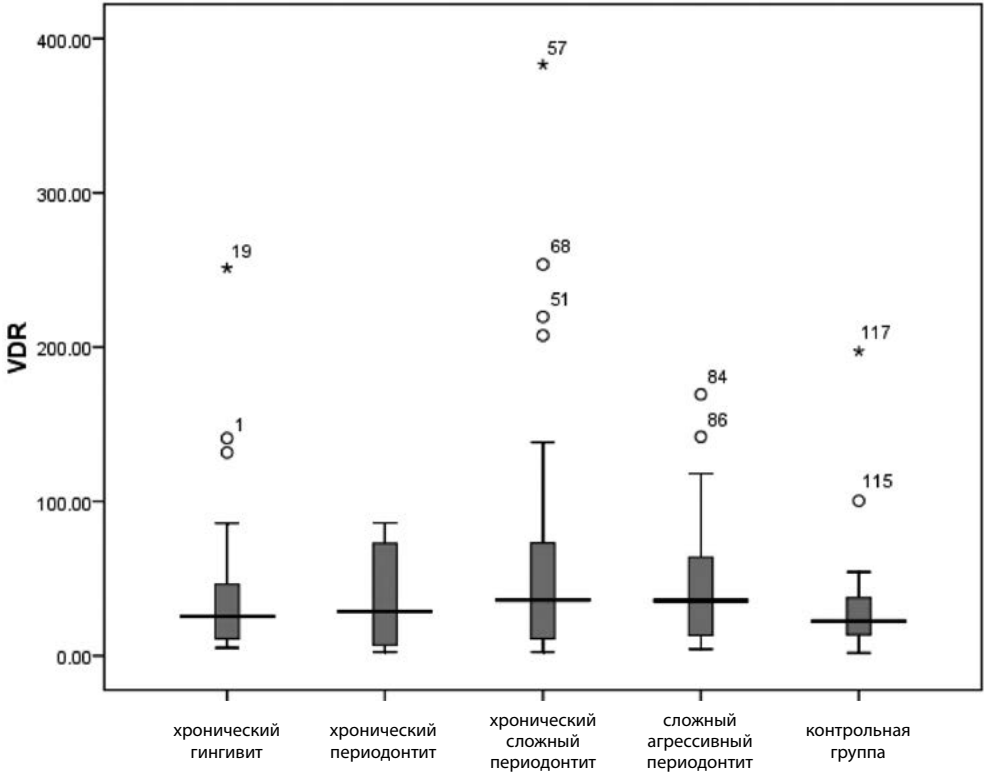


Рис. 2. Уровни нормализованной экспрессии гена VDR в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта
 Fig. 2. Normalized gene expression levels for VDR gene in the biological material of patients with inflammatory periodontal diseases



Таким образом, на основании проведенного статистического анализа установлено наличие достоверных ($p < 0,05$) различий между обследуемыми группами, за исключением групп 1-4, 2-3, 2-4 и 3-4.

Затем были проведены аналогичные исследования по определению уровней нормализованной экспрессии гена VDR. Для группы 1 значения Me (Q25/75) составили 25,61 (10,16/50,35)%, для группы 2 – 28,79 (6,68/73,05)%, для группы 3 – 36,07 (10,42/82,44)%, для группы 4 – 35,67 (12,67/82,84)%, для группы 5 – 22,47 (9,74/45,56)% (рис. 2).

При использовании непараметрического критерия Манна – Уитни установлено отсутствие статистически значимых ($p < 0,05$) достоверных различий по анализируемому признаку для всех групп.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненного исследования легли в основу усовершенствования молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR. Показано, что подобранные нуклеотидные последовательности пар праймеров и молекулярных зондов, меченных флуоресцентными красителями, позволяют проводить амплификацию генов COL1A1 и VDR, а также гена человека HPRT1 с применением ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в мультиплексном формате. В ходе определения аналитических характеристик установлено, что аналитическая специфичность амплификации генов COL1A1 и VDR составляет 100% соответственно.

Для стандартизации ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в качестве референсного гена для определения уровней экспрессии генов COL1A1 и VDR был выбран ген HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human), так как именно для него было установлено наиболее низкое значение коэффициента вариации.

Анализ полученных результатов позволил сделать вывод о том, что усовершенствованный метод, основанный на использовании мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, специфических пар праймеров и зондов, можно использовать для одновременной амплификации таргетного гена (COL1A1 и VDR) и референсного гена HPRT1 при определении уровней нормализованной экспрессии указанных генов в биологическом материале пациентов с заболеваниями пародонта.

При клинической апробации усовершенствованного метода рассчитаны количественные показатели уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в образцах биологического материала пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. Использование непараметрических методов статистического анализа позволило установить отсутствие ($p > 0,05$) статистически значимых достоверных различий в уровнях нормализованной экспрессии гена VDR, тогда как для гена COL1A1 такие различия установлены ($p < 0,05$), за исключением случаев сравнения пациентов с хроническим гингивитом (группа 1), хроническим периодонтитом (группа 2) и хроническим сложным периодонтитом (группа 3) с пациентами со сложным агрессивным периодонтитом (группа 4), а также при сравнении полученных данных по уровням нормализованной экспрессии между пациентами с хроническим периодонтитом (группа 2) и хроническим сложным периодонтитом (группа 3).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lebedenko I., Bragin E., Kalivradzhiyan E. *Orthopedic dentistry*. Moscow: GEOTAR-Media. 2016. 640 p. (in Russian)
2. Schwartz G. Vitamin D, D-hormone and alfacalcidol: medical, molecular biological and pharmacological aspects. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal*. 2009;3(37):62–66. (in Russian)
3. Ingraham B.A., Bragdon B., Nohe A. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr. Med. Res. Opin.* 2008;24(1):139–149. doi: 10.1185/030079908x253519.
4. Skinner H.G., Michaud D.S., Giovannucci E. Vitamin D intake and the risk for pancreatic cancer in two cohort studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15(9):1688–1695. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0206.
5. Baranov V., Baranova E., Ivashchenko T. *The human genome and "susceptibility" genes (Introduction to predictive medicine)*. St. Petersburg: Intermedica. 2000. 270 p. (in Russian)
6. Dytfeld J., Marcinkowska M., Drwęska-Matelska N. Association analysis of the COL1A1 polymorphism with bone mineral density and prevalent fractures in Polish postmenopausal women with osteoporosis. *Arch. Med. Sci.* 2016;12(2):288–294. doi: 10.5114/aoms.2016.59253.
7. Kotova S., Karlova N., Maksimova I., Zhorina O. *Formation of the skeleton in normal and pathological conditions*. St. Petersburg: St. Petersburg State Medical Academy named after I.I. Mechnikov; 2002. 49 p. (in Russian)
8. Holick M.F., Binkley N.C., Bischoff-Ferrari H.A. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911–1930. doi: 10.1210/jc.2011–0385.
9. Pike J.W., Zella L.A., Meyer M.B. Molecular Actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2007;22:16–19. doi: 10.1359/jbmr.07s207.
10. Xue L.N., Xu K.Q., Zhang W. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and crohn's disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(1):54–60. doi: 10.1002/ibd.22966.
11. Kostyuk S., Rudenkova T., Shimanskaya I. Method for determining gene expression levels. for the synthesis of collagen and elastin. in skin biopsies of patients with chronic dermatoses. associated with skin atrophy. *Dermatovenerologiya. Kosmetologiya.* 2017;2:179–187. (in Russian)