

Оценка транскрипционной активности генов-циклинов в тканях желудка у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*

УДК 577.214/.215:616.33.018.1:[616.98:579.835.12]-052

Евгений Воропаев,
проректор по научной работе Гомельского государственного медицинского университета (ГОМГМУ), кандидат медицинских наук, доцент;
voropaev.evgenii@gmail.com

Ольга Осипкина,
заведующий научно-исследовательской лабораторией ГОМГМУ;
olga.osipkina@mail.ru

Алла Воропаева,
врач клинической лабораторной диагностики РНПЦ радиационной медицины и экологии человека, кандидат биологических наук, доцент;
allo4ka3665@mail.ru

Сергей Ачинович,
заведующий патологоанатомическим отделением Гомельского областного клинического онкологического диспансера, кандидат медицинских наук, доцент;
ser.achinowitch2017@yandex.ru

Helicobacter pylori – модельный организм для понимания взаимодействия в патосистеме «человек – бактерия» и инфекционно-опосредованного канцерогенеза. База данных по онкозаболеваниям GLOBOCAN Международного агентства по изучению рака и ВОЗ показывает, что рак желудка занимает 5-ю позицию среди наиболее распространенных новообразований и 3-ю среди причин смерти от онкопатологии в мире [1]. Заболевания этого органа и смертность от рака различаются по регионам и в значительной степени зависят от диеты и инфекции, вызываемой *Helicobacter pylori*. Однако злокачественная опухоль

Аннотация. В статье представлены результаты исследования у пациентов с диагнозом «злокачественное новообразование желудка» на фоне подтвержденной инфекции *Helicobacter pylori* особенностей транскрипционной активности генов-циклинов в образцах тканей желудка. Исходя из полученных данных предложен молекулярно-генетический метод оценки их патофизиологического состояния на основе комплексного анализа уровня экспрессии генов-циклинов.

Ключевые слова: гены-циклины, транскрипционная активность, злокачественное новообразование желудка, *Helicobacter pylori*, ПЦР в реальном времени, лабораторная диагностика.

Для цитирования: Воропаев Е., Осипкина О., Воропаева А., Ачинович С. Оценка транскрипционной активности генов-циклинов в тканях желудка у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori* // Наука и инновации. 2023. № 11. С. 79–83.
<https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-11-79-83>

развивается лишь у очень небольшой части инфицированных этой бактерией, в среднем от 1 до 3% [2]. Лучшее понимание этиологии и факторов риска заболевания может помочь прийти к консенсусу в отношении лечения данной инфекции [3]. Особенности патологических процессов, происходящих в различных тканях и системах организма, можно изучить путем оценки данных об уровне активности генов (экспрессии) [4].

За регуляцию процессов клеточного цикла отвечают белки-циклины, представленные 15 семействами полипептидов (циклин А – циклин Y), при этом основную

роль в регуляции клеточного цикла играют циклины A, B, C, D, E и H, кодируемые одноименными генами, что делает обоснованным изучение генов-циклинов при онкологических заболеваниях и различных предраковых состояниях [5]. Так, например, циклины семейств D и E экспрессируются при переходе клетки от состояния покоя к делению и регулируют переход от фазы G1 к фазе S клеточного цикла, а гиперэкспрессия циклина D1 наблюдалась в процессе канцерогенеза [6].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что одна из ключевых ролей в регуляции пролиферации клеток на всех фазах клеточного цикла принадлежит циклинам.

Цель данной работы – изучение особенностей их транскрипционной активности в образцах тканей желудка у пациентов с злокачественным новообразованием этого органа на фоне подтвержденной инфекции *Helicobacter pylori*.

Материалы и методы

В исследовании были задействованы 26 пациентов с диагнозом «злокачественное новообразование желудка» (С16 – С16.9), проходивших лечение в Гомельском областном клиническом онкологиче-

ском диспансере, без разделения по полу и возрасту. У всех было получено информированное письменное согласие на участие. Лабораторные исследования проводились на базе научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета. Для них был использован биопсийный материал желудка, полученный при выполнении плановых оперативных вмешательств (биоптаты объемом до 5мм³ из участка с патологически измененными (Р) и не измененными (N) тканями для каждого пациента). Молекулярно-генетическая диагностика наличия инфекции *Helicobacter pylori* осуществлялась на основе методики, описанной в работе [7]. Для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) применялись праймеры, синтезированные компанией «Праймтех», Беларусь [8]. ПЦР-РВ выполняли при помощи термоциклера Rotor Gene 3000. Кроме имеющихся образцов для качественного контроля ПЦР-РВ в ходе каждой реакции были задействованы дополнительные «отрицательная» и «положительная» пробы. Нормализацию получаемых первичных данных проводили с применением транскрипта гена АСТВ (белка β-актина). Интерпретировали и обрабатывали данные при помощи программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, США), Excel (Microsoft, США).

Ген	A1		A2		B1		B2	
	Ст	Экспр.	Ст	Экспр.	Ст	Экспр.	Ст	Экспр.
2020бжN	35,55	17,66	29,34	11,45	28,87	10,98	28,92	11,03
2020бжР	33,02	16,36	24,05	7,39	23,46	6,8	24,48	7,82
2020бжN	35,53	17,93	28,23	10,63	28,25	10,65	28,07	10,47
2020бжР	34,49	18,73	30,33	14,57	28,61	12,85	29,32	13,56
2022бжN	34,75	17,57	30,41	13,23	29,7	12,52	29,93	12,75
2022бжР	33,65	16,41	28,34	11,1	27,41	10,17	28,01	10,77
2022бжN	34,6	18,03	30,41	13,84	29,23	12,66	30,35	13,78
2022бжР	35,52	18,61	30,52	13,61	29,96	13,05	30,68	13,77
2017бжN	36,36	17,93	28,63	10,2	27,36	8,93	27,77	9,34
2017бжР	34,46	16,65	27,66	9,85	26,38	8,57	27,53	9,72
2017бжN	34,21	16,75	25,77	8,31	25,04	7,58	25,86	8,4
2017бжР	33,49	16,46	26,11	9,08	25,15	8,12	25,68	8,65
2019бжN	36,51	19,01	27,6	10,1	27,09	9,59	27,3	9,8
2019бжР	32,95	16,22	30,61	13,88	29,41	12,68	30,5	13,77
2019бжN	34,54	16,91	30,07	12,44	29,36	11,73	30,33	12,7
2019бжР	36,88	19,17	29,04	11,33	28,52	10,81	29,19	11,48
норм.Кднк	34,98	15,44	25,97	6,43	27,38	7,84	25,44	5,9

Таблица 1. Значения Ct и нормализованной экспрессии для генов-циклинов A1, A2, B1, B2 (фрагмент базы данных)

Результаты и их обсуждение

Проведенная количественная оценка содержания мРНК генов-циклинов в транскриптах биоптатов желудка показала, что для большинства маркеров уровень транскрипции не имел прямой взаимосвязи с патофизиологическим состоянием ткани.

Данные, представленные в *табл. 1* свидетельствуют о том, что в ходе анализа транскриптов гена A1 образец опухоли характеризуется сходным уровнем экспрессии с биоптатом без признаков патологии ($Me_n=16,83$; $Me_p=16,35$, $p=0,826$), по сравнению с близлежащей здоровой тканью. В то же время выявляемые особенности могут быть объяснены относительно низкой активностью данного маркера и, соответственно, незначительным содержанием мРНК в биоптатах. Аналогичные данные были получены при анализе транскриптов генов-циклинов A2, B1 и B2.

Изучение активности гена-циклина C показало, что данный маркер входит в группу высокоэкспрессируемых локусов – абсолютные значения Ct для большинства образцов находились в пределах 26–28 циклов. Для доминирующего числа пар сравнения «патология – норма» уровень активности различался

в среднем не более, чем в 2–3 раза, и не имел выраженной зависимости от их патофизиологического статуса. Аналогичные данные получены при изучении гена-циклина E1.

Наиболее значимые особенности характера экспрессии были получены для гена-циклина D1, уровень которой при сравнении пар «патология – норма» всегда различался в 4 и более раз, при этом в тканях без признаков онкологических изменений активность данного локуса, как правило, была снижена по сравнению с опухолевыми тканями (*табл. 2*). При изучении уровней транскрипции генов-циклинов D2 и D3 таких явных различий, при их определенной диагностической значимости, выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что каждый из маркеров не является универсальным признаком, отражающим патофизиологическое состояние тканей. На наш взгляд, это обусловлено наличием индивидуальных и гистологических особенностей, а также, вероятно, и различием в типах новообразований. Тем не менее в большинстве случаев наблюдались изменения активности генов, что является отражением протекающих клеточных процессов в изученных тканях. При этом различные

Ген	C		D1		D2		D3	
	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.
Образец	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.
Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	Ct	Экспр.	11,03
2020бжN	26,87	8,98	28,46	10,57	27,78	9,89	28,05	10,16
2020бжP	24,21	7,55	23,73	7,07	27,96	11,3	25,94	9,28
2020бжN	26,22	8,62	28,03	10,43	27,08	9,48	27,35	9,75
2020бжP	25,83	10,07	29,36	13,6	29,4	13,64	29,28	13,52
2022бжN	27,18	10	26,59	9,41	29,12	11,94	29,88	12,7
2022бжP	26,62	9,38	29,13	11,89	29,24	12	30,94	13,7
2022бжN	26,61	10,04	26,28	9,71	28,33	11,76	29,47	12,9
2022бжP	26,97	10,06	27,78	10,87	30,48	13,57	30,77	13,86
2017бжN	26,68	8,25	36,9	0	29,29	10,86	28,57	10,14
2017бжP	26,33	8,52	36,9	0	26,81	9	28,16	10,35
2017бжN	25,36	7,9	36,9	0	27,51	10,05	26,77	9,31
2017бжP	25,08	8,05	36,9	0	28,57	11,54	27,29	10,26
2019бжN	25,77	8,27	27,02	9,52	27,25	9,75	27,08	9,58
2019бжP	25,22	8,49	25,82	9,09	31,67	14,94	30,46	13,73
2019бжN	25,82	8,19	24,85	7,22	32,18	14,55	29,38	11,75
2019бжP	26,78	9,07	28,29	10,58	29,33	11,62	29	11,29
норм.Кднк	26,99	7,45	36,9	0	35,05	15,51	26,35	6,81

Таблица 2. Значения Ct и нормализованной экспрессии для генов-циклинов C, D1, D2, D3 (фрагмент базы данных)

физиологические изменения характеризуются дифференциальной активностью не отдельных генов, а их комплекса, поэтому они обусловлены согласующимся статусом транскрипции различных локусов.

Исходя из этого положения, на следующем этапе исследований была проведена оценка профиля экспрессии изученных генов-циклинов как единой системы, отображающей физиологический статус исследуемой ткани. Для этого каждый образец был описан в виде нормализованных значений экспрессии набора локусов. На предварительном этапе были отобраны наборы генов для их сравнительного анализа: A1, A2, B1, B2, C, D1, D2 и D3. Выбор связан с выявленным, по нашим и литературным данным [5], изменением уровня экспрессии перечисленных локусов в опухолевых тканях.

Для графического отображения результатов кластеризации на основании метода UPGMA была построена дендрограмма, иллюстрирующая уровень отличий по уровню экспрессии генов-циклинов в исследуемых образцах (рис. 1).

На рисунке изображены типы ткани, каждый из которых характеризуется уникальным мультигенным профилем и может использоваться для диагностики онкогенного процесса. На следующем этапе анализа были изучены пары генов, характеризующиеся согласованным изменением активности. Для этого были рассчитаны коэффициенты евклидовой дистанции между патологически измененными и неизменными тканями из имеющегося клинического материала (табл. 3).

Серой заливкой в таблице отмечены пары генов, имеющие разнонаправленный характер экспрессии, у остальных он согласованный. Таким образом, данные табл. 3 подтверждают, что различные этапы

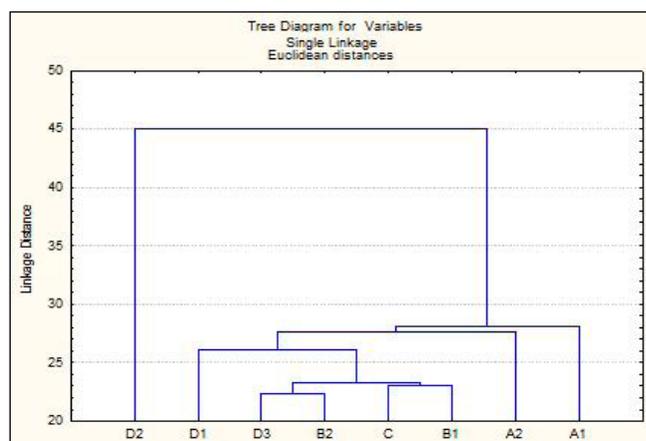


Рис. 1. Уровень экспрессии генов-циклинов в образцах с патологически измененными (слева) и не измененными (справа) тканями желудка

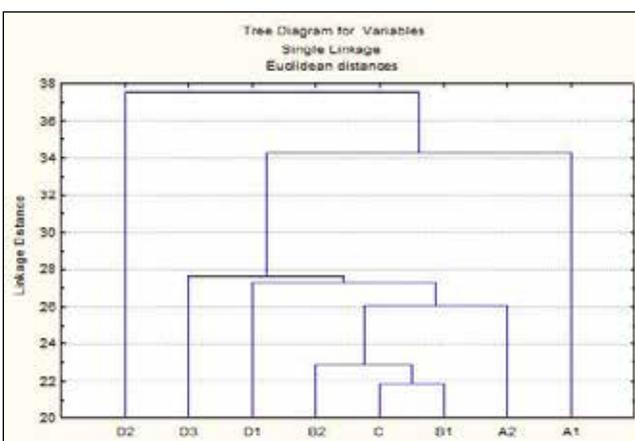


Рис. 2. Интерпретация уровней экспрессии генов-циклинов в зависимости от степени выраженности патологических процессов [8]

клеточного цикла имеют строгую приуроченность к физиологическому статусу клетки.

Полученные результаты для образцов патологической ткани желудка подтверждают специфичность дифференциальной активности генов в патологических и нормальных тканях. В то же время отсутствие абсолютной корреляции, по всей видимости, связано с физиологически различающимися типами опухолей в клиническом материале.

В целом из представленных данных следует, что корреляционные связи между экспрессией генов носят разнонаправленный характер, что может говорить о неполном разделении опухолевой и нормальной ткани с помощью морфологических методов диагностики. Предположительно, небольшое количество нормальных клеток может присутствовать в патологических образцах, и наоборот, патологические могут находиться в нормальной ткани и отражаться на результатах молекулярной диагностики. Тем не менее анализ показывает, что активность генов-циклинов может применяться в качестве дополнительного диагностического маркера протекания патологических процессов. В связи с этим нами предложен метод диагностики онкологиче-



Гены-циклины	A1		A2		B1		B2		C		D1		D2	
	норм.	пат.												
A2	28,1	36,8												
B1	40,5	42,4	27,7	28,0										
B2	39,2	48,9	30,7	26,1	23,2	22,8								
C	43,2	47,3	33,5	29,4	23,0	21,9	23,6	25,9						
D1	47,9	45,0	34,8	30,4	29,5	29,4	30,6	27,8	26,1	27,3				
D2	64,8	61,7	55,6	47,2	54,4	42,6	47,3	40,8	42,6	37,5	31,4	29,5		
D3	30,0	34,3	31,0	27,9	30,5	29,4	22,4	30,9	28,1	25,3	31,4	25,5	39,4	37,9

Таблица 3. Значения евклидовой дистанции уровней экспрессии нормальных и патологических образцов пациентов с различной онкологической и предраковой патологией желудка

ских заболеваний на основании оценки экспрессионных профилей генов-циклинов.

Для попарного сравнения многолокусных профилей экспрессии рядом находящихся образцов биоптатов предлагается использовать следующую формулу:

$$D(p, n) = (\sum (Sp_k - Sn_k)^2)^{1/2},$$

где Sn_k – показатель экспрессии k -гена циклина образца без признаков патологии, Sp_k – с патологией.

Коэффициент $D < 1,5$ указывает, что уровень экспрессии генов-циклинов находится в норме; $1,5 < D < 2,5$ говорит о начале развития патологических процессов; а $D > 2,5$ – о наличии онкологических клеток в образце (рис. 2).

Заключение

Проведенные исследования показывают, что активность генов-циклинов имеет выраженный дифференциальный характер при изменении патофизиологического статуса тканей желудка. Разработанный метод анализа результатов попарного сравнения профилей экспрессии этих генов может быть использован в качестве дополнительного критерия в области онкологической диагностики для молекулярно-генетической оценки физиологического статуса пациентов и выявления возможного риска возникновения онкологической заболеваний. **■**

■ Summary. The article presents the result of the authors' own experience in the study of transcriptional activity of cyclin genes in gastric tissue samples from patients diagnosed with gastric malignant neoplasm against the background of confirmed *Helicobacter pylori* infection. Based on the obtained data, a molecular-genetic method of assessing the pathophysiological state of gastric tissues on the basis of complex analysis of the level of transcriptional activity of cyclin genes is proposed.

■ Keywords: cyclin genes, transcriptional activity, gastric malignant neoplasm, *Helicobacter pylori*, real-time PCR, laboratory diagnostics.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-11-79-83>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021. Vol. 71, №3. P. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
2. New insights of *Helicobacter pylori* host-pathogen interactions: The triangle of virulence factors, epigenetic modifications and non-coding RNAs / F. Vaziri [et al.] // *World Journal of Clinical Cases*. 2018. Vol. 6, №5. P. 64–73. doi: 10.12998/wjcc.v6.i5.64.
3. The role of heme oxygenase-1 in hematopoietic system and its microenvironment. The role of heme oxygenase-1 in hematopoietic system and its microenvironment / A. Szade [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020. Vol. 78, №10. P. 4639–4651. doi: 10.1007/s00018–021–03803-z.
4. Herceg Z. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis / Z. Herceg, P. Hainaut // *Molecular Oncology*. 2007. Vol. 1, №1. P. 26–41. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.004.
5. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease / M. C. Casimiro [et al.] // *Genes Cancer*. 2012. Vol. 3, №11–12. P. 649–657. doi: 10.1177/1947601913479022.
6. Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer: An Experience from Madinah, Saudi Arabia / A. M. Albasri [et al.] // *he Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2019. Vol. 20, №8. P. 2471–2476. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.8.2471.
7. Определение онкогенного потенциала *Helicobacter pylori* по результатам комплексной оценки его CagA-статуса и цитокинового профиля сыворотки крови пациентов с заболеваниями желудка / Е. В. Воропаев [и др.] // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2022. Т. 11. №1. С. 48–59. doi: 10.34883/Pl.2022.11.1.015.
8. Методика молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний на основе анализа изменений экспрессии генов-циклинов семейств A, B, C, D и E: инструкция по применению / Е. В. Воропаев [и др.]; М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УО «Гомель. гос. мед. ун-т». – Гомель, 2010.
9. Alterations in the proliferating compartment of gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection: the putative role of epithelial cells expressing p27 (kip1) / Sougioultzis S. [et al.] // *Modern Pathology*. 2003. Vol. 16, №11. P. 1076–1085. doi: 10.1097/01.MP.0000093626.15701.76.
10. Adeola F. Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes / F. Adeola // *The Ethiopian Journal of Health Sciences*. 2018. Vol. 28, №6. P. 741–748. doi: 10.4314/ejhs.v28i6.9.

Статья поступила в редакцию 12.10.2023 г.