



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И БИОЛОГИЯ“**

Д-р Десислава Маринова Маринова

**Проучване експресията на получените чрез алтернативния
сплайсинг иРНК варианти на холинацетилтрансферазата в
ентералната нервна система на мишка**

Автореферат

**на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „Доктор“**

**Докторска програма:
„Анатомия, хистология и цитология“**

**Пловдив
2025**

Дисертационният труд съдържа 126 стандартни страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цели, Задачи и методични подходи, Резултати, Обсъждане на резултатите, Заключение, Изводи, Приноси, Бъдещи насоки за развитие. Работата е илюстрирана с 5 таблици и 33 фигури. Включени са две приложения.

Библиографският списък включва 270 литературни източника. Лабораторната работа и молекулярния анализ са извършени в катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, сектор „Анатомия, хистология и цитология“, факултет „Медицина“ при МУ-Плевен и Университетска лаборатория за научни изследвания при МУ-Плевен.

Във връзка с дисертационния труд са направени 3 пълнотекстови публикации и 4 научни съобщения на национални форуми.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за публична защита от разширен Катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, факултет „Медицина“, при МУ-Плевен, проведен на 23.09.2025 год.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.12.2025г. от 13.30 ч. в зала „Амброаз Паре“ на ТЕЛЕЦ при МУ- Плевен, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-Плевен и въз основа на Заповед на Ректора № 4059/28.10.2025г. пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. Стефан Сивков, д.м.

Членове:

Проф. Иван Масларски, д.м.

Проф. Николай Димитров, д.м.

Проф. Димитър Сиврев, д.м.

Проф. Галя Ставрева, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. Стефан Сивков, д.м.

Проф. Димитър Сиврев, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на сайта на МУ-Плевен:
<http://www.mu-pleven.bg/index.php/bg/>

Използвани съкращения и терминология

ENS – Enteric nervous system (ентерална нервна система)
Ach – Acetylcholine (ацетилхолин)
ChAT – Choline acetyltransferase (холинацетил трансфераза)
ГИТ – Гастроинтестинален тракт
ЦНС – Централна нервна система
иРНК – mRNA (информационна РНК)
сChAT – Common type of ChAT (общ тип холинацетил трансфераза)
pChAT – Peripheral type of ChAT (периферен тип холинацетил трансфераза)
CHT – High-affinity choline transporter (транспортър на холин с висок афинитет)
VAChT – Vesicular acetylcholine transporter (везикуларен ацетилхолинов транспортър)
NO – Nitric oxide (азотен оксид)
VIP – Vasoactive intestinal peptide (вазоактивен интестинален пептид)
ATP – Adenosine-5'-triphosphate (аденозин-трифосфат)
CO – Carbon monoxide (въглероден оксид)
ICC – Interstitial cells of Cajal (интерстициални клетки на Кахал)
EGCs – Enteric glial cells (ентерални глиални клетки)
5-HT – 5-hydroxytryptamine (серотонин)
IPANS – Intrinsic primary afferent neurons (вътрешни първични аферентни неврони)
PARs – Protease-activated receptors (протеаза-активирани рецептори)
SOM – Somatostatin (соматостатин)
TK – Tyrosine kinase (тирозин киназа)
NPY – Neuropeptide Y (невропептид Y)
CGRP – Calcitonine Gene-Related Peptide (калцитонин-ген-свързан пептид)
NADH – Nicotinamide Adenine Dinucleotide (никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат)
NADH-d – редуцирана форма на NADH
PCR – Polymerase Chain Reaction (полимеразна верижна реакция)
RT-PCR – Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (обратно транскрипционна полимеразна верижна реакция)
PBS – Phosphate-Buffered Saline (фосфатно буфериран физиологичен разтвор)
Отворена рамка за четене – нуклеотидните последователности, намиращи се между инициращия и терминиращия кодон
Праймер – едноверижен синтетичен олигонуклеотид, комплементарен на определен нуклеотиден участък в матричната ДНК
Tm – Температура на топене – температура, при която половината от ДНК фрагмента е двойноверижна, а другата половина – едноверижна. Tm зависи от големината на фрагмента и съдържанието на GC базите
GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа)

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение	6
II. Цел, задачи и методични подходи	9
1. Цели	9
2. Задачи	9
3. Материали и методи	9
3.1. Светлинно-микроскопски методи за изработване на трайни обзорни препарати оцветени с хематоксилин-еозин	9
3.2. Анализ и дизайн на праймерни двойки за сплайсинг вариантите на ензима холинацетилтрансфераза	11
3.3. <i>De novo</i> дизайн на двойноверижни gBlock генни фрагменти и плазмид pGEM-N1, използвани в PCR реакцията за тестване специфичността на праймерните двойки	13
3.4. PCR амплификация на изследваните сплайсинг варианти	15
3.5. Конструирание на стандартни криви за определяне ефикасността на амплификация на всяка праймерна двойка	16
3.6. Изолиране на РНК от експериментални животни	16
3.7. Синтез на комплементарна ДНК (cDNA)	17
3.8. Количествен PCR със специфичните праймерни двойки и cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl	18
3.9. Статистически анализ	19
III. Резултати	20
1. Хистологично устройство на стената на храносмилателния тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl	20
2. Тестване специфичността на <i>de novo</i> синтезираните праймерни двойки и ДНК матрици в конвенционален PCR в реално време	22
3. Относителен количествен анализ на експресията на сплайсинг вариантите на ензима ChAT	27
3.1. Изготвяне на стандарти за генериране на стандартни криви	27
3.2. Определяне ефикасността на амплификация на всяка праймерна двойка	30
3.3. PCR в реално време със специфичните праймерни двойки за M, cChAT, pChAT, R3, N1 и N2 варианти и cDNA от различните отдели на ГИТ на мишки порода C57Bl/6NCrl	32
3.4. Относителен количествен PCR анализ на експресията на сплайсинг вариантите на ензима ChAT в различните части на ГИТ на мишки порода C57Bl/6NCrl	39
IV. Обсъждане на резултатите	45
1. Особености в хистологичното устройство на стената на храносмилателния тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl	45
2. Функционална организация на ENS	48
3. Генетичен анализ на ChAT. Молекулярно-генетични методи за визуализация на сплайсинг вариантите на ензима ChAT при мишка	49

V. Заключение	58
VI. Изводи	59
VII. Приноси.....	60
Приноси с оригинален характер	60
Приноси с приложен характер.....	60
VIII. Бъдещи насоки и перспективи.....	61
IX. Публикации, участия в научни форуми и научен проект във връзка с дисертационния труд.....	62
Приложение 1.....	63
Приложение 2.....	66

I. Въведение

Ентералната нервна система (ENS) е обособена част от автономния дял на нервната система включваща невронални кръгове контролиращи моторните функции, локалния кръвен ток, лигавичния транспорт и секрецията. В допълнение към своите двигателни и секреторни функции, клетъчните компоненти на ENS са в комуникация с чревния микробиом. Съвременни проучвания посочват критичната роля на връзката черва-микробиом-мозък за поддържане на здравето на червата, имунната функция и невропсихичното благополучие на цялостния организъм. С цел изпълнение на многообразните си функции този трети дял на вегетативната нервна система е изграден от множество различни неврони, оформящи рефлексни вериги, някои от които се затварят на местно ниво.

В състава на ENS се описват четири нервни сплетения, които се различават по локализация, наличие или липса на обособени ганглии и таргентни ефекторни структури. Под серозната обвивка на гастроинтестиналния тракт (ГИТ) се разполага субсерозно сплетение, описано от Auerbach, което се състои от финна мрежа нервни влакна, разположени в подлежащата субсерозна съединителна тъкан. Миентералното нервено сплетение – *plexus myentericus* (Auerbach) е представено от първично нервено сплетение, най-добре изразено, разположено между вътрешния (напречен) и външния (надлъжен) мускулен слой. Сред влакната на напречния мускулен слой се разполага вторично нервено сплетение. Третичното нервено сплетение е разположено сред влакната на надлъжния мускулен слой. Миентералните ганглии в това сплетение варират по размер, форма и ориентация при различните животински видове. Подлигавичното нервено сплетение – *plexus submucosus* (Meissner) се разполага в съединителнотъканния слой между лигавицата и мускулната обвивка на тънкото и дебело черво. Описано е за първи път в средата на XIX век от Meissner и Billroth. Структурно се разполага в два подслоя – външен (Shabadasch) и вътрешен (Meissner). Ганглиите в субмукозното сплетение са значително по-малки на размер в сравнение с тези в миентералното нервено сплетение.

Ентералните неврони в рамките на ENS осъществяват своите функции посредством богата палитра от невротрансмитери. Основните подходи за класифициране на невроните включват – външна морфология, изпълнявана функция, електрофизиологични характеристики и неврохимичен код. Използвани методи за определяне на неврохимичната принадлежност на ентералните неврони включват хистохимични, имунохистохимични и съвременни генетични методики. С тяхна помощ става възможно изучаването на ензимите отговорни за синтеза на невромедиаторите в ENS. Натрупаните знания относно химичния код на невроните дава възможност да бъдат идентифицирани отделните класове ентерални неврони чрез съдържанието в тях на уникална комбинация от химични маркери. Неврохимичният код на ентералните неврони е тясно свързан с тяхната функционална специализация, локализацията и вида на връзките, които те изграждат в рамките на ENS.

Холинергичната медиация в ENS е отчетливо представена и участва в реализирането на моторните, секреторните, вътрешните сетивни и съдовите рефлексии. Ацетилхолинът (ACh) е основен невротрансмитер във възбудните мотоневрони заедно с тахикинин и calretinin. Във възходящите интерневрони вторични невротрансмитери заедно с ACh са тахикинин и АТР. В низходящите интерневрони действието на ACh се допълва от NO, 5-HT, АТР и SOM. Във вътрешните първични аферентни неврони (IPANs) ACh е основен невротрансмитер, като негови ко-трансмитери са също CGRP и тахикинин.

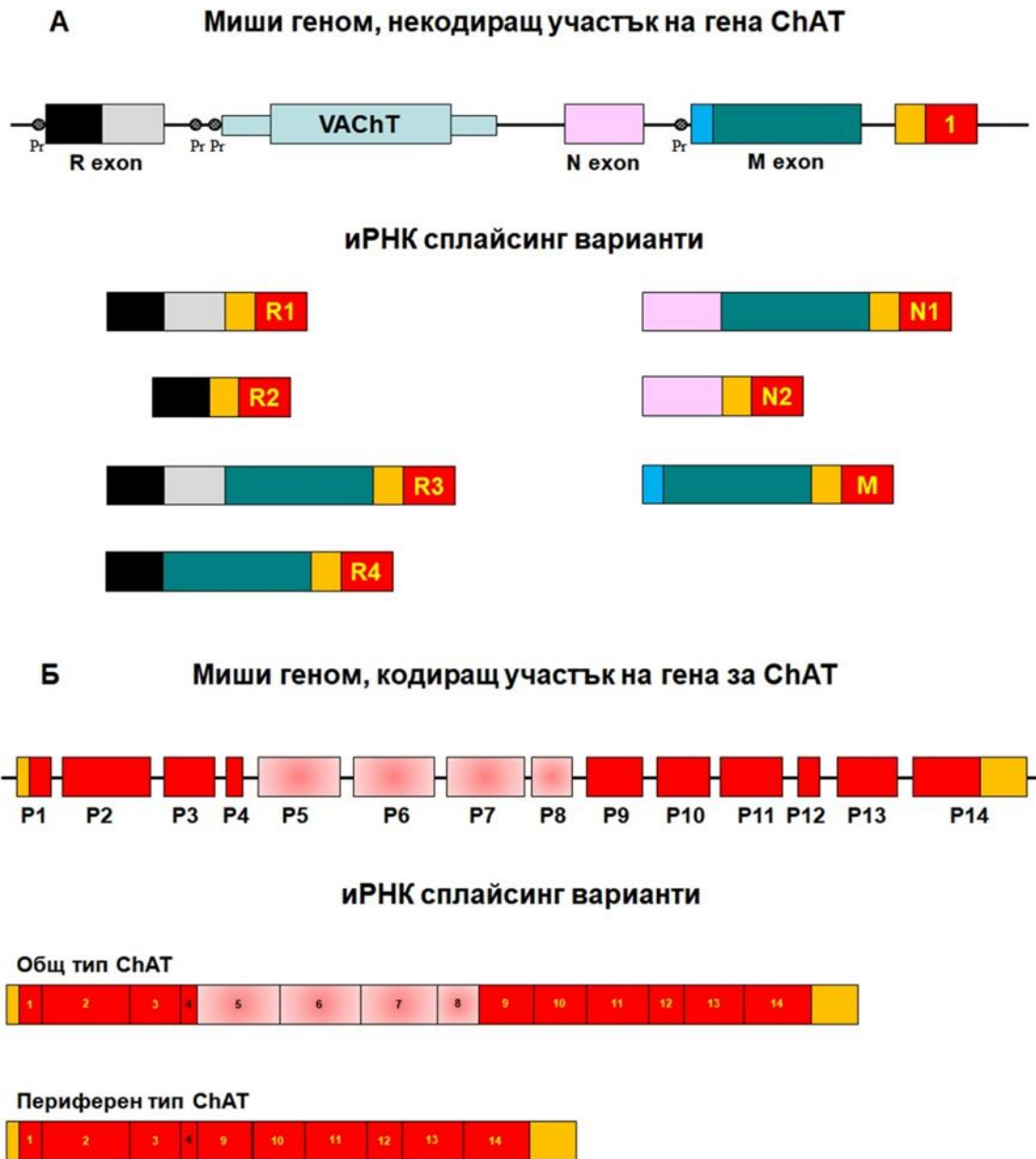
ACh се синтезира в цитоплазмата на холинергичните неврони от холин и ацетил коензим А, процес катализиран от ензима холинацетилтрансфераза (ChAT). Скорост-лимитиращият процес в биосинтезата на невромедиатора е активния транспорт на холина в нервните окончания чрез Na^+ -зависимия транспортер на холин с висок афинитет (CHT). Новосинтезираният невромедиатор се натрупва в синаптичните везикули чрез везикуларния ацетилхолинов транспортер (VAChT), който представлява протеин с 12 трансмембранни домена, използващ електрохимичния градиент генериран от протонна АТФ-аза, за да обмени два протона с една ацетилхолинова молекула.

Генетичните проучвания и анализ показват уникална организация на гена кодиращ синтеза на ChAT. В мишка генът кодиращ синтеза на ChAT се разполага в дългото рамо на 10 хромозома (10q11.23) и включва седемнадесет екзона – 14 кодиращи и 3 не кодиращи. В 5'-края се разполагат не кодиращите екзони – R, N и M (Фиг. 1А), следвани от 14 кодиращи екзона (Фиг. 1Б). Цялата отворена рамка за четене на иРНК за VAChT е локализирана в първия интрон на холинацетилтрансферазния ген, в зоната между R и N-не кодиращите екзона.

Седем различни сплайсинг варианта на иРНК (M, N1, N2, R1, R2, R3 и R4) се транскрибират от мишия ген за ChAT, пет варианта при плъх (R1, R2, N1, N2 и M). До момента седем сплайсинг варианта на иРНК за ензима са доказани при примати и хора (R1/R2, N1/N2, H, S и M). Всички описани алтернативни сплайсинг варианти се различават в техните 5'-не кодиращи участъци и поради това всички транскрипти кодират синтеза на еднакъв протеин с молекулно тегло 67 kDa (при мишка и плъх) и 69 kDa (при човек) – общ тип ChAT (cChAT). Функционалната роля на тези не кодиращи екзони е недостатъчно изяснена, вероятно те повлияват стабилността и транслационната ефективност, компартментализацията и триизмерната структура на съответстващите им иРНК. Наличието на няколко места за инициация (промоторни участъци) на транскрипцията увеличава вероятността да се експресират различни типове иРНК за ензима ChAT в различните холинергичните неврони и неневронални клетъчни типове.

Наличието на алтернативен сплайсинг вариант на иРНК за ензима ChAT при мишка, в който липсва последователност, съответстваща на кодиращите екзони от 5 до 8 е описан в периферни неврони и нервни влакна, както и в неневронални структури. Продуктът от транслацията на този алтернативен сплайсинг вариант има молекулно тегло от 49 kDa. Поради доминиращото му присъствие в периферни структури този новооткрит вариант на ензима ChAT е означен като периферен тип (pChAT), за разлика от варианта откриващ се в централната и

периферна нервна система, който е от общ тип (сChAT).



Фигура 1. А) Схематично представяне структурата на гена, кодиращ синтеза на ChAT при мишка и седем сплайсинг варианта на иРНК в 5'-некодиращия участък. **Б)** Схематично представяне на двата сплайсинг варианта на иРНК на ChAT в 3'-кодиращия участък на гена.

II. Цел, задачи и методични подходи

1. Цели

- 1.1. Проучване хистологичното устройство на стената на храносмилателния тракт на мишки порода C57Bl/6NCrI с помощта на Swiss roll техника.
- 1.2. Проучване експресията на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT в храносмилателен тракт на мишки порода C57Bl/6NCrI.

2. Задачи

За постигане на така дефинираните цели са поставени следните задачи:

2. 1. Вземане на материал от различни части на храносмилателния канал на мишки порода C57Bl/6NCrI за изготвяне на трайни хистологични препарати.
2. 2. Анализ на нуклеотидните последователности на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT.
2. 3. Дизайн на специфичен набор от праймери за сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT.
2. 4. Тестване специфичността на праймерните двойки чрез конвенционален PCR и гел електрофореза. Оптимизиране на условията на PCR реакцията.
2. 5. Определяне ефикасността на амплификация на всяка праймерна двойка чрез анализ на стандартните криви.
2. 6. Вземане на материал и изолиране на тотална РНК от различни части на храносмилателен тракт на мишки (стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво).
2. 7. Обратно транскрипционна реакция за получаване на cDNA.
2. 8. Количествен PCR със специфичните праймерни двойки за всеки сплайсинг вариант.

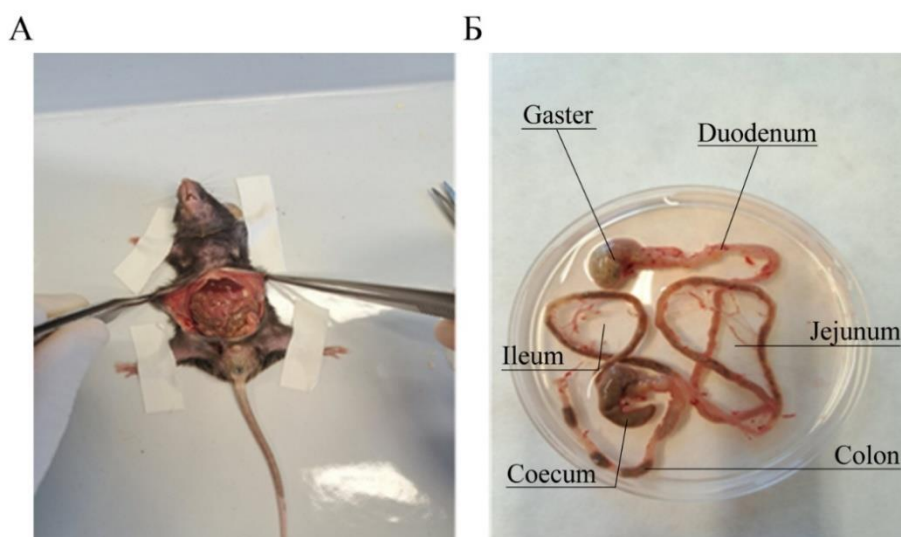
3. Материали и методи

За реализиране на поставените цели и задачи са използвани експериментални мишки от мъжки пол от порода C57Bl/6NCrI на възраст между 9 и 11 седмица и следните методични подходи:

3.1. Светлинно-микроскопски методи за изработване на трайни обзорни препарати оцветени с хематоксилин-еозин

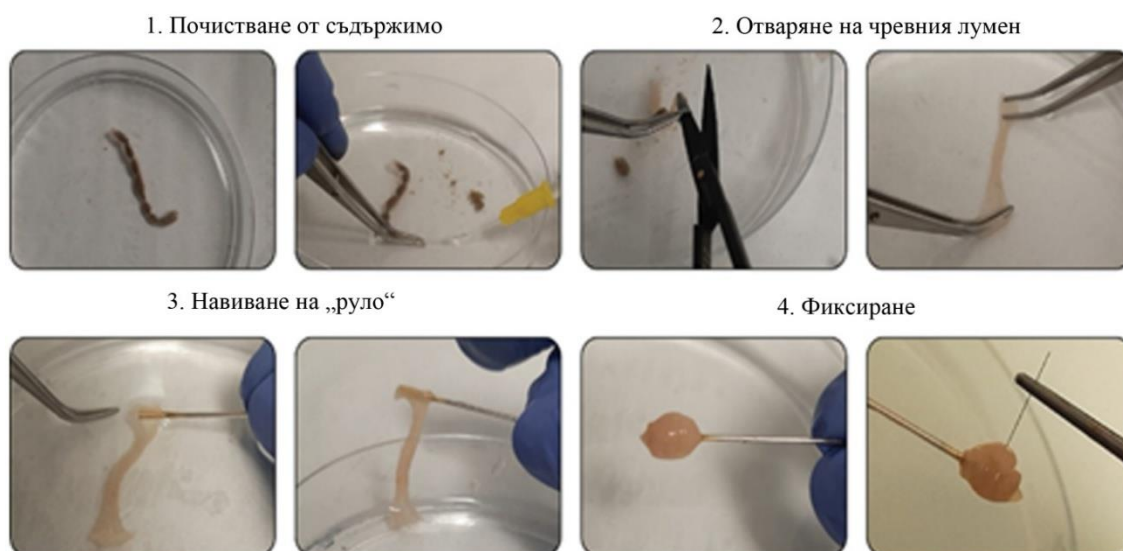
Изготвянето на хистологични препарати по Swiss roll техниката е подходящ метод за анализ на мишия ГИТ, който се отличава с деликатна структура на стената. Този подход позволява изучаването на голяма дължина по хода на храносмилателния тракт на напречни срези направени от така оформените тъканни „рулца“. В хода на изследването животните са анестезирани интраперитонеално с Кетамин 100 mg/kg и Ксилазин 10 mg/kg. На две от използваните животни се направи интракардиална перфузия със 100 ml 4% Paraformaldehyde/0.1 M PB (pH 7.4). Внимателно се извади целия ГИТ в петри с 4% парафолмалдехид и се обособиха отделните му части – стомах, дванадесетопръстник, празно черво, хълбочно и ободно черво (Фиг. 2А, Б).

Червата са почистени внимателно от съдържимо и отворени по цялата дължина чрез надлъжен разрез по мезентериалния ръб.



Фигура 2. А) Отваряне на перитонеалната кухина. Б) Дисекция на отделните сегменти по хода на ГИТ за подготовка на Swiss roll техниката за изучаване хистологията на отделните сегменти на храносмилателния канал.

С помощта на дървена пръчица са направени „рулца“ с лигавицата нагоре (Фиг. 3) и са поставени в касетки за 24 часова фиксация в 4% Paraformaldehyde. След фиксацията тъканните проби са промити под течаща вода, обезводнени във възходяща редица алкохоли, след просветляване са включени в парафин. С помощта на ротационен микротом HistoCore, BIOCUT, Leika Biosystem са направени срези с дебелина 5µm и оцветени с хематоксилин-еозин по рутинна методика.

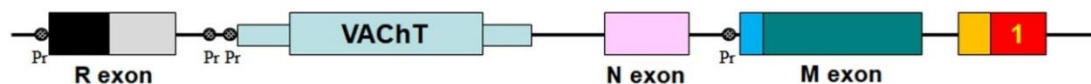


Фигура 3. Последователни стъпки на Swiss roll техниката: 1 – Всеки отпрепариран сегмент се отваря и почиства от съдържимо; 2 – Отваря се лумена с надлъжен срез; 3 – Навиването на „рулцето“ се извършва с лигавицата нагоре; 4 – Използване на игла за фиксиране на навития сегмент при изваждане на пръчицата, около която е навит материала. Фигурата е адаптирана от Le Naour et al.

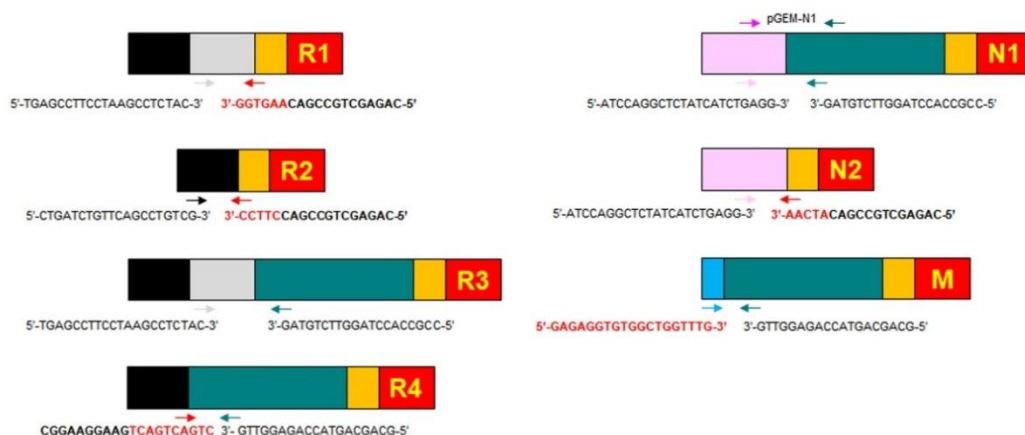
3.2. Анализ и дизайн на праймерни двойки за сплайсинг вариантите на ензима холинацетилтрансфераза

С помощта на специфичния софтуер за дизайн на праймери Primer-BLAST и в съответствие с препоръките публикувани в статията на Vanderbrouke II и съавтори са създадени прави (forward) и обратни (reverse) праймери насочени към M, N1, N2, R3, R4, pChAT и cChAT сплайсинг вариантите на иРНК на ензима холинацетилтрансфераза (Табл.1). Всички праймери отговарят на изискванията, да имат температура на топене (T_m) между 60 °C и 65 °C, както и GC съдържание, което варира между 40% и 60%. От описаните четири R изоформи на ензима, R3 варианта е единствен, съдържащ екзони Rb и Mb (Фиг. 4А), което е причина местоположението на праймерите да бъде избрано точно в тези уникални екзони. Правият праймер за R3 варианта се свързва с участък в екзон Rb, а обратният праймер хибридизира с последователност в екзон Mb. Вариантът R1 съдържа екзони Ra и Rb от некодиращата част на гена. За откриване на този вариант се използва прав праймер в екзон Rb и обратен обхващащ мястото на екзонно снаждане на екзон Rb и екзон P1. R2 варианта съдържа само екзон Ra от некодиращата част и дизайна на праймери подходящи за неговата идентификация бе неуспешен. R4 варианта съдържа екзоните Ra и Mb. За неговото откриване се използва прав праймер хибридиращ в мястото на екзонно снаждане и обратен, разположен в Mb екзона (Фиг. 4А). N1 и N2 изоформите на ензима са с почти идентична нуклеотидна последователност, като единствената разлика между тях е наличието на екзон Mb в N1 изоформата. Правият праймер, използван за откриване на N1 и N2 изоформите, е общ за двата варианта и е разположен в екзон N. Обратният праймер за N1 изоформата е избран да бъде в екзон Mb, докато обратният праймер за N2 изоформата обхваща мястото на екзонно снаждане на екзон P1 и екзон N. В 3' -края на този праймер се разполагат пет базови двойки, припокриващи се със съседния екзон (Ехон P1_N, Табл. 1, Фиг. 4А). По подобен начин, за pChAT изоформата, при която липсват кодиращите екзони от P5 до P8, правият праймер е разположен в екзон P3, докато обратният праймер обхваща с пет базови двойки мястото на екзонно снаждане между екзон P4 и екзон P9 (Екзон P9_P4, Табл. 1, Фиг. 4Б). Правият праймер използван за амплификация на M сплайсинг варианта е специфичен за участък от Ma екзона, а обратният е разположен в Mb екзона. Праймерите използвани за амплификация на cChAT изоформата на иРНК на ензима холинацетилтрансфераза са разположени в екзон 5.

А Миши геном, некодиращ участък на гена ChAT



иРНК сплайсинг варианти



Б Миши геном, кодиращ участък на гена за ChAT



иРНК сплайсинг варианти

Общ тип ChAT



Периферен тип ChAT



Фигура 4. А) Схематично представяне структурата на гена, кодиращ синтеза на ChAT при мишка, както и седемте сплайсинг варианта на иРНК в 5'-некодиращия участък, с отбелязани местата на специфичните праймери **Б)** Схематично представяне на двата сплайсинг варианта на иРНК на ChAT в 3'-кодиращия участък на гена и местата на специфичните праймери.

Леофилизираните праймери (Sigma-Aldrich) първоначално са разтворени в ТЕ буфер (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) до концентрация от 100 pmol/μl. Така приготвените стокови разтвори допълнително са разреждени в ТЕ буфер до концентрация от 10 pmol/μl и са съхранени във фризер при -20 °C.

Таблица 1. Прави (Reverse) и обратни (Forward) праймерни двойки използвани за PCR. Петте базови двойки, обхващащи местата на екзон-екзонно снаждане в обратните праймери за вариантите N2, R1 и pChAT са отразени в червен цвят.

Използвани прави (forward) и обратни (reverse) праймери	Нуклеотидна последователност 5' → 3'	Позиция на праймерите	Дължина на продукта (bp)	Температура на хибридизация (t °C)
R3 Forward (qRb_Fwd) Reverse (qMb_Rev1)	TGAGCCTTCCTAAGCCTCTAC CCGCCACCTAGGTTCTGTAG	Exon Rb Exon Mb	149	60
N1 Forward (qN_Fwd) Reverse (qMb_Rev1)	ATCCAGGCTCTATCATCTGAGG CCGCCACCTAGGTTCTGTAG	Exon N Exon Mb	170	63
N2 Forward (qN_Fwd) Reverse (qN2_Rev)	ATCCAGGCTCTATCATCTGAGG CAGAGCTGCCGACATCAA	Exon N Exon P1 N	112	65
M Forward (qMa_Fwd) Reverse (qMb_Rev2)	GAGAGGTGTGGCTGGTTTG GCAGCAGTACCAGAGGTTG	Exon Ma Exon Mb	119	65
Peripheral ChAT Forward (qPC_Fwd) Reverse (qPC_Rev)	TAGCCCTGCTGTGATCTTTG TGTTGCCTGTATCTCTGTC	Exon P3 Exon P9 P4	125	65
Common ChAT Forward (qCC_Fwd) Reverse (qCC_Rev)	CCAATCCATTCCCCTGACTG GAAGCCGGTATGATGAGAAGAG	Exon P5 Exon P5	95	63
R1 Forward (qRb_Fwd) Reverse (qR1_Rev)	TGAGCCTTCCTAAGCCTCTAC CAGAGCTGCCGACAAGTGG	Exon Rb Exon P1_Rb	91	60/ 63
R4 Forward (qR4_Fwd) Reverse (qMb_Rev2)	CGGAAGGAAGTCAGTCAGTC GCAGCAGTACCAGAGGTTG	Exon Ra_Mb Exon Mb	81	60/ 63

3. 3. De novo дизайн на двойноверижни gBlock генни фрагменти и плазмид pGEM-N1, използвани в PCR реакцията за тестване специфичността на праймерните двойки

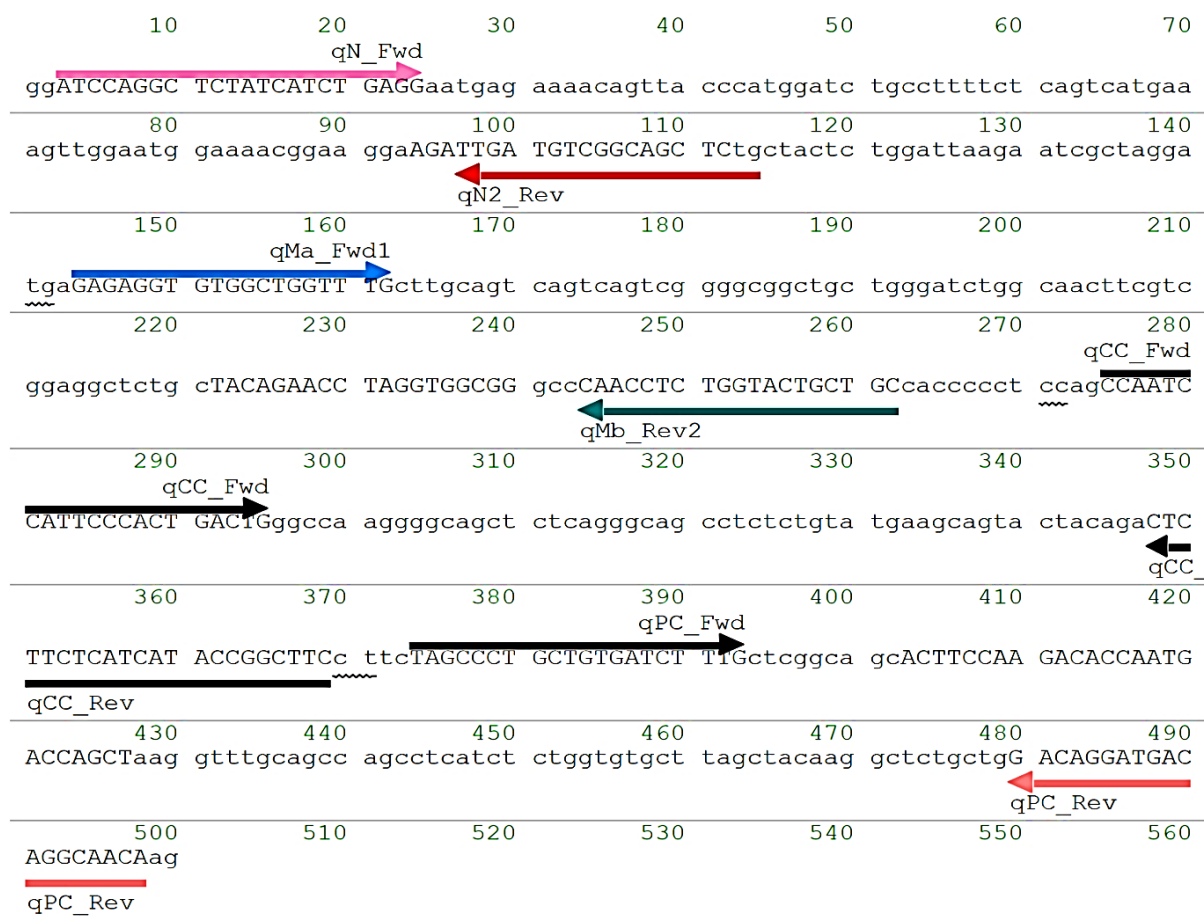
Като матрици за полимеразната верижна реакция са използвани *de novo* създадени двойноверижни gBlock генни фрагменти (Integrated DNA Technologies) и плазмид pGEM-N1(Promega, Madison, WI), съдържащи специфични за сплайсинг вариантите нуклеотидни последователности. ДНК матрицата gBlock-1 съдържа 5'-некодиращите области на вариант R3 (екзони Rb, Mb, P1 и част от P2), част от екзон P7, също така и целия екзон P8 и част от екзон P9 (Фиг. 1A) от кодиращата част. gBlock-1 е използван като шаблон за амплифициране на R3 варианта с помощта на праймери qRb_Fwd и qMb_Rev1 (Фиг. 1A). Същата матрица е използвана за проверка на специфичността на обратния праймер (qN2_Rev), обхващащ мястото на снаждане между екзон P1 и N за вариант N2 с праймер qRb_Fwd (очаквана дължина на продукта от 280 bp, Фиг. 1A). По подобен начин, матрицата gBlock-1 е използвана за проверка на

специфичността на праймера qPC_Rev. Този праймер обхваща мястото на екзонно снаждане между екзон Р9 и екзон Р4, като за прав праймер е използван qRb_Fwd с очаквана дължина на продукта от 618 bp (Фиг. 5).

10	20	30	40	50	60	70
aggctgatct	gttcagcctg	tcgcctgcaa	atcaggacgc	tcagcgtgtg	cagccctccc	ggaaggaagg
80	90	100	110	120	130	140
qRb_Fwd	TGAGCCTTCC TAAGCCTCTA →					
150	160	170	180	190	200	210
cgccactttc	agtcagtcgg	ggcgggtgct	gggatctggc	aacttcgtcg	gaggctctgC	TACAGAACCT
					← qMb_Rev1	
220	230	240	250	260	270	280
AGGTGGCGGg	ccCAACCTCT	GGTACTGCTG	Ccacccttc	cctggccctt	ctggctcacg	cagccgcctc
← qMb_Rev1		← qMb_Rev2				
290	300	310	320	330	340	350
cagccctgct	tgggtgtgaa	cagtgcgggt	tcggtgcgta	acagcccagg	agagcagGTC	GGCAGCTCTG
					← AACTA qN2_Rev	
360	370	380	390	400	410	420
ctactctgga	ttaagaatcg	ctaggATGcc	tatcctggaa	aaggtccccc	caaagatgcc	tgtacaagct
430	440	450	460	470	480	490
tctagctgtg	aggaggtgct	ggacttacct	aagttgccag	tgccccact	gcagcaaacc	ctggccacct
500	510	520	530	540	550	560
accttcagtg	ggccctccag	ctccttcatg	gtggaggctg	cagcttgaat	ggagcgaatc	gttggtatga
570	580	590	600	610	620	630
caagtccttg	cagtttgtgg	tgggccgaga	tggcacctgc	ggtgtggtgt	gtgagcactc	cccttttgat
640	650	660	670	680	690	700
ggcatcgctc	tgggtgcagt	cacggagcac	ctgctgaaac	atatGATGAC	AGGCAACAag	aagctcgtc
			← CTGTC		qPC_Rev	

Фигура 5. Нуклеотидна последователност на матрицата gBlock-1 използвана за амплифициране на изоформите R3, N2 и pChAT. Матрицата съдържа 5'-некодиращите области на вариант R3 част от екзон Р7, също така и целия екзон Р8 и част от екзон Р9. Точното местоположение на правите и обратни праймери са отбелязани със стрелки. Посочени са и петте базови двойки в 3'-края на праймерите qN2_Rev и qPC_Rev, обхващащи местата на екзон-екзонно снаждане.

Матрицата gBlock-2 съдържа последователности, специфични за сплайсинг вариантите N2, M, pChAT и cChAT (Фиг. 6) и е използвана за тестване на съответните двойки праймери (Табл. 1).



Фигура 6. Нуклеотидна последователност на матрица gBlock-2 използвана за амплифициране на изоформите N2, M, pChAT и cChAT. Точното местоположение на правите и обратни праймери е отбелязано със стрелки.

Плазмидът pGEM-N1, съдържащ част от 5'-некодиращата област на изоформа N1, е генериран в предишно проучване и е използван за тестване специфичността на праймерите, амплифициращи N1 варианта. Накратко амплифицираните фрагменти са субклонирани в плазмид pGEM-T Easy вектор (Promega, Madison, WI). Проведена е стандартна реакция на лигиране за векторна ДНК и вмъкната ДНК. Извършена е трансформация в E. coli Competent High DH5 клетки (ZYMO RESEARCH), които са култивирани върху агарови плаки, съдържащи 2% X-gal и ампицилин (50 mg/kg) при 37 °C за една нощ. Плазмидът е пречистен чрез алкално лизиране.

3. 4. PCR амплификация на изследваните сплайсинг варианти

PCR анализът е проведен с апарат qTower3 G Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany). Съставът на реакционната смес включва 0.25 µM прав и обратен праймер, 10 µl 2x Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs, USA) и 2 µl матрична ДНК (10 000 копия за gBlock-1 и gBlock-2 и 20 pg/µl за pGEM-N1). Добави се дестилирана вода до краен обем на реакционната смес от 20 µl.

PCR анализът позволи проследяване на кривата на топене след амплификацията. При използване на обратните праймери, хибридиращи с граничните области от нуклеотидните последователности в границите на екзон-екзон връзките (qN2_Rev и qPC_Rev), условията на PCR са оптимизирани чрез добавяне на 3% диметилсулфоксид (DMSO), за постигане на пълна специфичност. Приложи се следният PCR протокол: първоначална денатурация на 95 °C за 60 секунди, последвана от 40 цикъла на 95 °C за 15 секунди; анилинг на праймерите на 60 °C, 63 °C или 65 °C (специфичен за всяка двойка праймери) за 10 секунди; финално удължаване на веригата 60 °C за 30 секунди и отчитане на флуоресцентен сигнал. След последния амплификационен цикъл се проведе анализ на кривите на топене в температурен интервал 60-95 °C. Получените амплификационни продукти от PCR реакцията са визуализирани върху 2% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид за оценка качеството на PCR продукта, както и за наличието на евентуални неспецифични продукти. Като ДНК маркер се използван Hyper Ladder 25bp (Bioline). Визуализацията на резултата от електрофорезата се извърши на UV светлина с помощта на ултравиолетов трансилюминатор (BIO View UST-20 M-8E, Biostep, Germany).

3.5. Конструирание на стандартни криви за определяне ефикасността на амплификация на всяка праймерна двойка

С цел конструирание на стандартни криви е необходимо изготвяне на серийни разреждания на генните фрагменти използвани като матрици за провеждане на PCR анализа (Приложение 1). Направени са серийни разреждания 1/10 на двойноверижните gBlock фрагменти и плазмид pGEM-N1, което позволи изготвянето на стандарти с точно определен брой молекули от матриците (от 1.10^6 до 1.10^2).

Всяко от разрежданията на матриците (gBlock-1, gBlock-2 и pGEM-N1) се използва за генериране на стандартни криви чрез qPCR. Всеки стандарт се тества двукратно и се определи средната C_t стойност на съответното разреждане. Получените резултати се използваха за генериране на стандартна крива за всеки сплайсинг вариант със съответната матрица. Определи се корелационния коефициент (R^2), наклона на всяка крива, както и ефикасността на реакцията.

3.6. Изолиране на РНК от експериментални животни

За експерименталната работа са използвани пет половозрели мишки от мъжки пол на възраст между 9 и 11 седмица порода C57Bl/6NCrl. В хода на експеримента животните са предварително евтаназирани чрез интраперитонеално инжектиране на Кетамин 100 мг/кг и Ксилазин 10 мг/кг. След отваряне на коремната кухина са взети материали от отделните части от храносмилателния канал – стомах, тънко и дебело черво. Материалите са съхранени в RNase инактивиращ буфер RNeasy lysis buffer (SIGMA) във фризер на -20 °C. Екстракцията на тотална РНК се проведе с помощта на EXTRACTME total RNA kit (BLIRT S.A). Китът осигурява утвърдена методика за пречистване на РНК от биологичен материал чрез използване на колонкови мембрани за екстракция.

Хомогенизацията с предоставените в кита bead-beating tubes се оказва незадоволителна, затова за пълното хомогенизиране на материала се използва лабораторен хомогенизатор Cole-Parmer SamplePrep HG-400 MiniG Tissue Homogenizer and Cell Lyser (Cole-Parmer, USA). Изолирането на тотална РНК от тъканите се проведе съгласно протокол на производителя (Приложение 2).

Концентрацията и чистотата на изолираната тотална РНК от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишка са определени със спектрофотометър (NanoDrop One, Thermo Scientific) (Табл. 2). За целта се използва 2 µl обем от всяка проба и 2 µl свободна от РНК-аза вода за калибрация. Определи се оптичната плътност на разтвора при 260 nm (A260) и 280 nm (A280). Определи се коефициента (К) на чистота на РНК в пробата: $K = A260/A280$. Измереното съотношение е в границите от 1.8 до 2, което показва, че изолираното количество РНК от стомах, дуоденум, празно, хълбочно и дебело черво е с качество, подходящо за последващ синтез на комплементарна ДНК и количествен анализ.

Таблица 2. Концентрация и чистота на изолираната РНК от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво определени със спектрофотометър.

Животно	Участък от ГИТ	Количество изолирана РНК	Съотношение A260/A280
Мишка 1	Стомах	111,90 ng/µl	1,99
	Дуоденум	1240,80 ng/µl	2,05
	Празно черво	513,60 ng/µl	2,11
	Хълбочно черво	307 ng/µl	2,12
	Дебело черво	103,7 ng/ µl	1,9
Мишка 2	Стомах	78,8 ng/µl	2,08
	Дуоденум	180,3 ng/µl	2,06
	Празно черво	72 ng/µl	2,02
	Хълбочно черво	67,7 ng/µl	1,80
	Дебело черво	45,0 ng/µl	1,97
Мишка 3	Стомах	493 ng/µl	2,16
	Дуоденум	235,3 ng/µl	2,15
	Празно черво	399,7 ng/µl	2,11
	Хълбочно черво	83,2 ng/µl	2,16
	Дебело черво	20,5 ng/µl	1,93
Мишка 4	Стомах	369 ng/µl	1,95
	Дуоденум	428,9 ng/µl	2,00
	Празно черво	239,2 ng/µl	1,97
	Хълбочно черво	135,6 ng/µl	1,87
	Дебело черво	98,9 ng/µl	2,01
Мишка 5	Стомах	302,6 ng/µl	2,11
	Дуоденум	609,4 ng/µl	2,03
	Празно черво	564,7 ng/µl	2,10
	Хълбочно черво	265,6 ng/µl	2,09
	Дебело черво	663,5 ng/µl	2,20

3.7. Синтез на комплементарна ДНК (cDNA)

Синтеза на комплементарна ДНК се извърши съгласно протокола на TRANSCRIPTME, RNA Kit с 1 µg от изолираната тотална РНК в общ обем от 20 µl. Инкубацията се проведе при 25 °C за 10 min, 50 °C за 30 min и 85 °C за 5 min, последвана от третиране с 1 µl RNaseH. Така получената cDNA се разрежи 1/50 с цел използването ѝ като матрица в количествения анализ.

3.8. Количествен PCR със специфичните праймерни двойки и cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl

Количественият PCR със специфични праймерни двойки и съответната cDNA от различните части на ГИТ се проведе по следния протокол, представен в Табл. 3.

Таблица 3. Компоненти и условия на qPCR със cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl.

Компоненти на реакционната смес	Етап на qPCR реакцията	Температура	Време и повтораемост на циклите	
Luna qPCR 10µl	начална денатурация	95 °C	60 секунди	
прав праймер 0,5µl	денатурация	95 °C	15 секунди	40 цикъла
обратен праймер 0,5µl	анийлинг (вариант специфичен)	60 °C , 63 °C, 65 °C	10 секунди	
cDNA 2 µl	елонгация		30 секунди	
dH ₂ O 7 µl	melt curve analysis	60-95 °C		
Краен обем 20µl				

Подготви се реакционната смес (Master mix), като в епруветката се добави първо dH₂O, следват вариант-специфичната двойка праймери, DMSO (за вариантите N2 и pChAT) и накрая Luna Universal qPCR Master Mix. Така приготвеният Master mix се вортексира с апарат Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia) за 5-10 секунди и центрофугира за кратко с апарат Centrifuge-Vortex CVP-2 (Biosan, Latvia) при 1200 rpm. Всеки от проучваните сплайсинг варианти – R3, N1, N2, M, pChAT и cChAT в съответния материал от отделните части на ГИТ се изследва едновременно в три ямки. С цел избягване на фалшиво положителни резултати при qPCR анализа за всеки един от сплайсинг вариантите са използвани отрицателни контроли (в които липсва cDNA), накапани трикратно. С цел относително количествено определяне на сплайсинг вариантите в храносмилателен тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl се проведе експеримент за сравнителен анализ на генната експресия по метод $\Delta\Delta C_t$, модифициран спрямо метода на Pfaffl, като се взема предвид реалната ефикасност на реакцията за всеки сплайсинг вариант. За всеки вариант бе калкулирана промяната в експресията (fold change) в стомах, празно, хълбочно и дебело черво. С цел коректно провеждане на анализа се изследва експресията и на референтния ген

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). За амплификация на GAPDH се използва двойка праймери, представени в Табл. 4.

Таблица 4. Прав (*Fwd1*) и обратен праймер (*Rev1*) използвани за амплификация на GAPDH в хода на qPCR.

Праймери	Нуклеотидна последователност 5' → 3'	Дължина на продукта (bp)
mGAPDH_Fwd1	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	21
mGAPDH_Rev1	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23

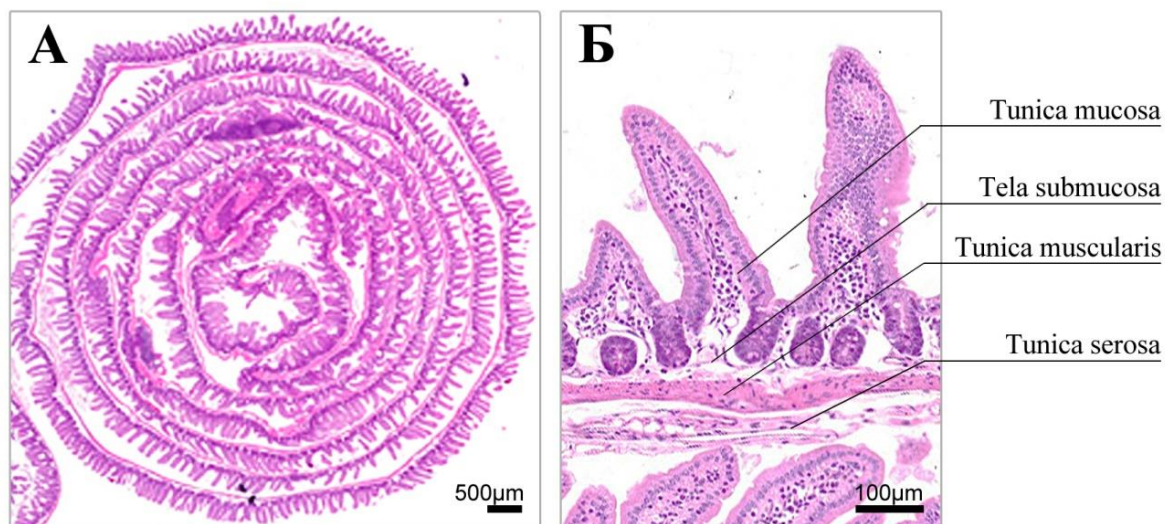
3.9. Статистически анализ

Всички данни от qPCR експериментите на изследваните сплайсинг варианти са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM) от петте изследвани животни. Статистическият анализ се извърши със SigmaPlot 11 (Systat Software, USA). За сравнение на експресията на отделните варианти се използва еднофакторен дисперсионен анализ (One-Way ANOVA). При неспазване на предпоставките за равенство на дисперсиите (Equal Variance) и нормално разпределение (Normality) разликите в експресията се оценяваха чрез ANOVA on Ranks и Kruskal–Wallis One-Way ANOVA on Ranks. Резултатите се считаха за статистически значими при $p \leq 0.05$. За статистически анализ на експресията на M, cChAT и pChAT в отделните органи се приложи еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA), последван от множествен пост-хок тест по Tukey за оценка на статистически значимите разлики между вариантите в рамките на всеки отделен орган спрямо стомаха. Резултатите се считаха за статистически значими при $p \leq 0.05$.

III. Резултати

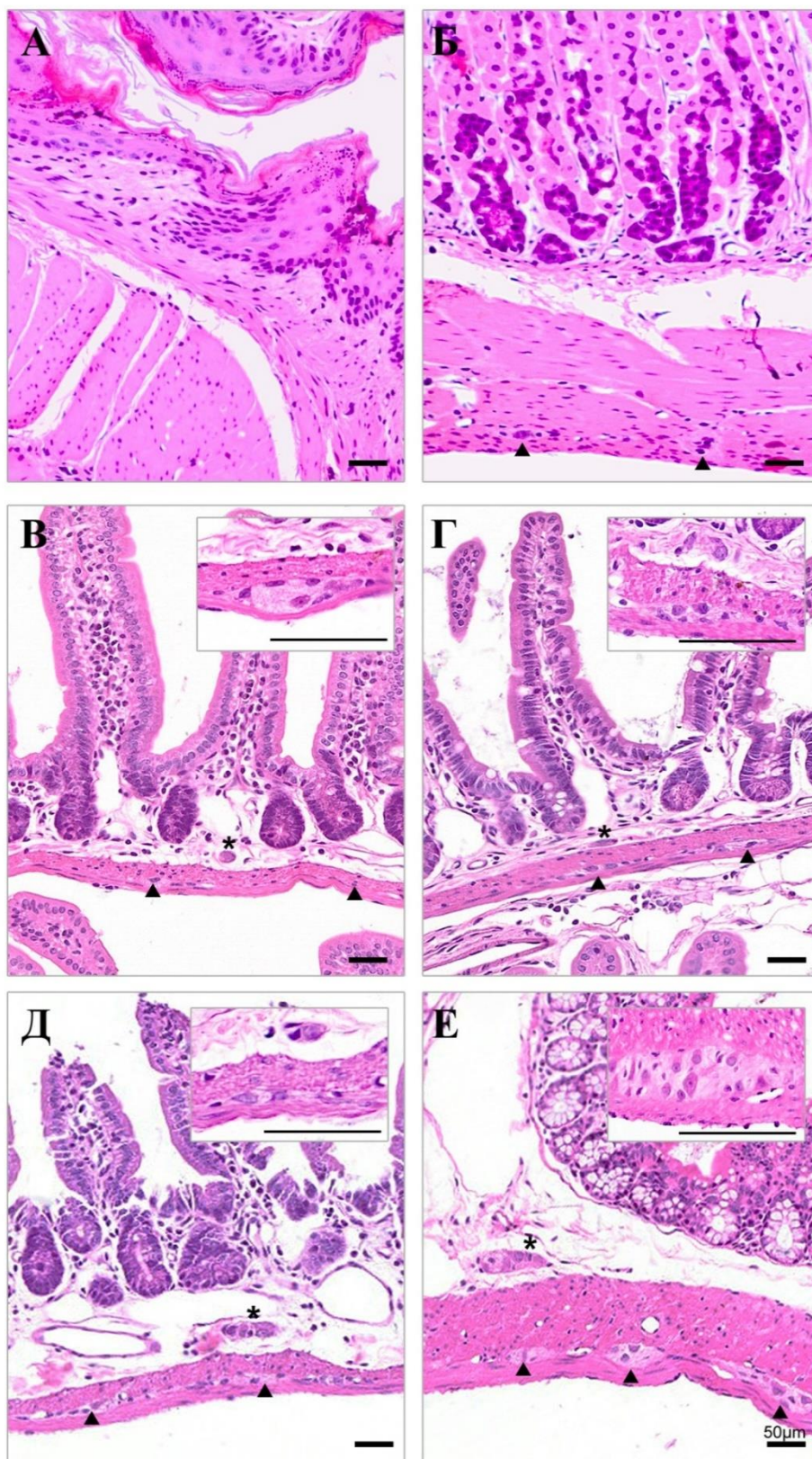
1. Хистологично устройство на стената на храносмилателния тракт на мишки порода C57Bl/6NCrI

За демонстриране на нормалната морфология на мишия стомашно-чревен тракт се използва Swiss roll хистологична техника и оцветяване с хематоксилин и еозин (ХЕ) (Фиг. 7. А, Б).



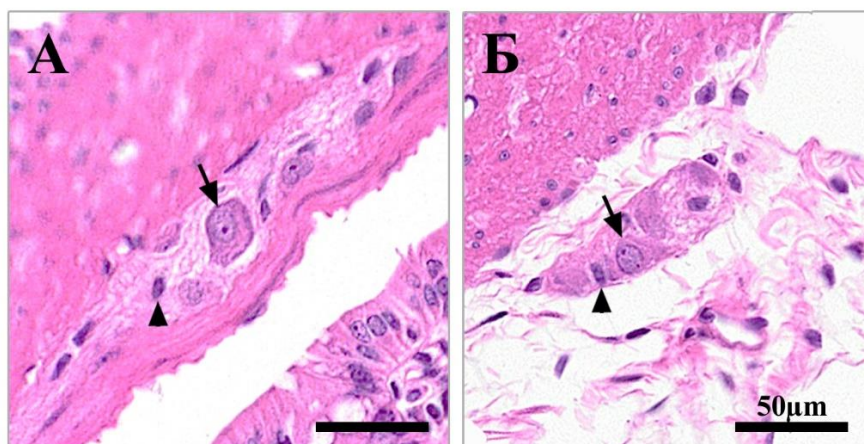
Фигура 7. А) Оцветяване с ХЕ на Swiss roll срези от тънко черво на мишки порода C57Bl/6NCrI. **Б)** Принципно устройство на чревната стена. Мащабна скала = 500 и 100µm.

Най-вътрешния слой на храносмилателния тракт е представен от лигавичната пластинка, tunica mucosa и прилежащите към нея екзокринни жлези. Под лигавицата се визуализира по-слабо оцветената подлигавична обвивка, tela submucosa. В нея се разполага субмукозното ентерално сплетение, представено от ганглии и нервни структури, заобиколени от съединителната тъкан на субмукозата. В различните участъци на храносмилателния тракт субмукозното сплетение е различно представено, като най-отчетливо се наблюдава в тънкото черво (Фиг. 8В-Д). Следват силно еозинофилните гладкомускулни влакна на tunica muscularis, организирани във вътрешен и външен подслой. Между двата слоя се очертава миентералното нервно сплетение (Фиг. 8Б-Е), състоящо се от добре оформени ганглии и взаимосвързани нервни структури. Във всеки от ганглиите се откриват няколко неврона. Отделните неврони притежават силно базофилни ядра, в които често се наблюдават едно или няколко ядърца.



Фигура 8. Оцветяване с ХЕ на Swiss roll срези от различните части на ГИТ на мишки порода C57Bl/6NCrI. Визуализират се предстомашие (А); същински стомах (Б); дванадесетопръстник (В); празно черво (Г); хълбочно черво (Д) и дебело черво (Е). Наблюдават се ганглии на plexus myentericus (връх на стрелка) и plexus submucosus (звезда). Мащабна скала = 50 μ m.

В периферията на ганглиите, около невроните се разполагат малки глиални клетки (Фиг. 9А и Б). На повечето от хистологичните срези съединително-тъканна обвивка около ганглиите не се наблюдава. Наред с овалните по форма ганглии се наблюдават и такива със силно издължени краища.

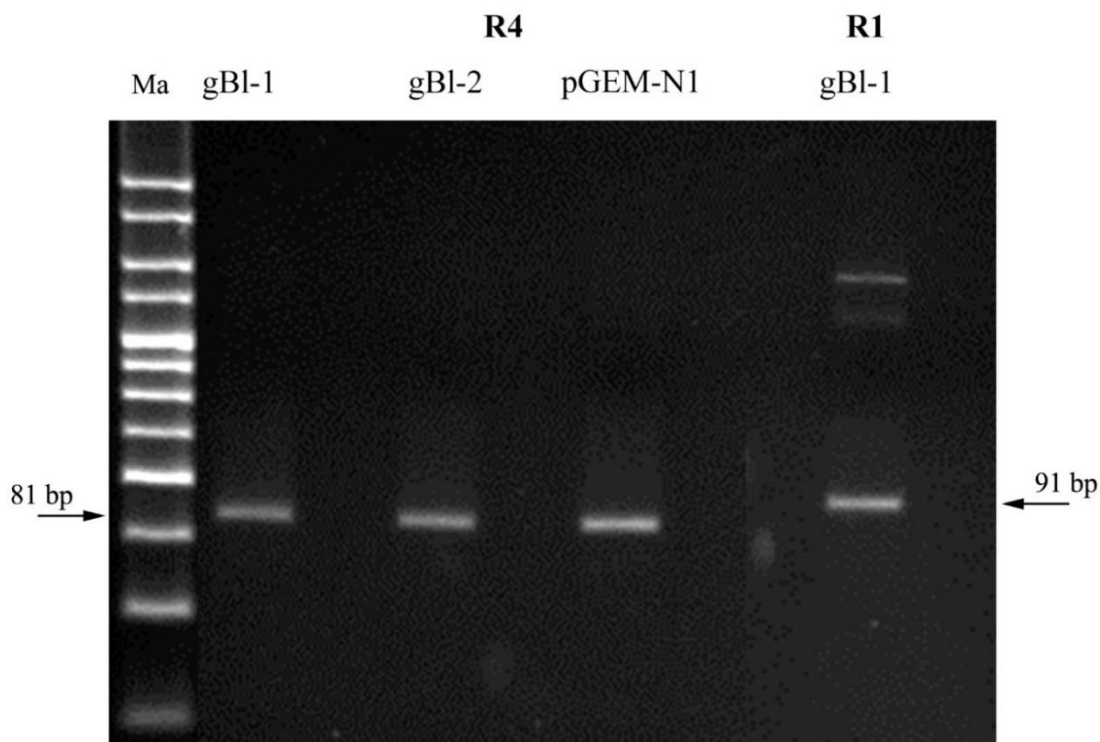


Фигура 9. Оцветяване с ХЕ на Swiss roll срези от дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. А) наблюдават се ентерални неврони (означени със стрелки) и глиални клетки (означени с връх на стрелка) в границите на plexus myentericus Б) plexus submucosus с разположените в него ентерални неврони и глиални клетки. Машабна скала = 50 μ m.

2. Тестване специфичността на *de novo* синтезираните праймерни двойки и ДНК матрици в конвенционален PCR в реално време

Като матрици за полимеразната верижна реакция бяха използвани *de novo* създадени двойноверижни gBlock генни фрагменти – gBlock-1, gBlock-2 и плазмид pGEM-N1 съдържащи специфични за сплайсинг вариантите нуклеотидни последователности. Плазмидът pGEM-N1 е използван за тестване на специфичността на праймери, амплифициращи N1 варианта. Матрицата gBlock-1 е използвана в контролни реакции за доказване специфичността на обратните и граничните праймери, използвани за амплифициране на вариантите R1, R4 (Фиг. 10) и N2 (Фиг. 12Б). Същата матрица се използва като шаблон за амплифициране на R3 варианта. Матрицата gBlock-2 е използвана за тестване на специфичните двойки праймери за вариантите N2, M, pChAT и cChAT. С помощта на разработените ген-специфични праймери и съответните ДНК матрици в хода на количествения PCR в реално време са амплифицирани фрагментите с очакван размер за R3 (149 bp), N1 (170 bp), N2 (112 bp), M (119 bp), pChAT (125 bp) и cChAT (95 bp) иРНК сплайсинг вариантите на ChAT. За вариантите R3, N1, M и cChAT иРНК бе възможно проектирането на уникални двойки праймери, тъй като те притежават поне един уникален екзон, който бе избран за място на хибридация. R1 варианта показва висока хомоложност с вариант R3. За неговата идентификация беше използван прав праймер qRb_Fwd1 и обратен qR1_Rev (Фиг. 4А). Правият праймер е общ за двата варианта, докато обратния е специфичен за R1. За тестване специфичността на обратния праймер беше проведена контролна реакция с матрицата gBlock-1. При специфичност на

праймера за R1 варианта не се очакваше амплификация в съответната реакция. При наличен продукт, очакваната му дължина е 280 bp. При температура 60 °C бяха получени неспецифични амплификационни продукти, което демонстрира неспецифичността на използвания обратен праймер. След повишаване на температурата до 63 °C резултата остана същият. Резултатите от контролната реакция бяха демонстрирани чрез гел електрофореза (Фиг. 4А, Фиг. 10). При R3 варианта правия праймер qRb_Fwd се свързва с участък от Rb екзона, който е уникален за този сплайсинг вариант. Като обратен праймер беше използван qMb_Rev1, хибридиращ с последователност в Mb екзона. При R4 варианта беше използван специфичен прав праймер qR4_Fwd, хибридиращ в областта на екзонната връзка между екзоните Ra и Mb. Като обратен праймер беше използван qMb_Rev1, хибридиращ в Mb екзона (Фиг. 4А). Вариантът R4 демонстрира висока хомоложност с вариантите R3, N1 и M. За неговото валидиране също бяха проведени контролни реакции със съответните матрици – gBlock-1, pGEM-N1 и gBlock-2. При специфичност на правия праймер не се очакваше амплификационен продукт в съответните реакции. В трите контролни реакции бяха наблюдавани амплификационни продукти с дължина 81 bp, потвърдени чрез гел електрофореза (Фиг. 10). Повишаването на температурата на хибридизация не доведе до оптимален резултат по време на PCR амплификацията, което демонстрира неспецифичността на правия праймер и невъзможността той да бъде използван за идентифициране на R4 варианта.



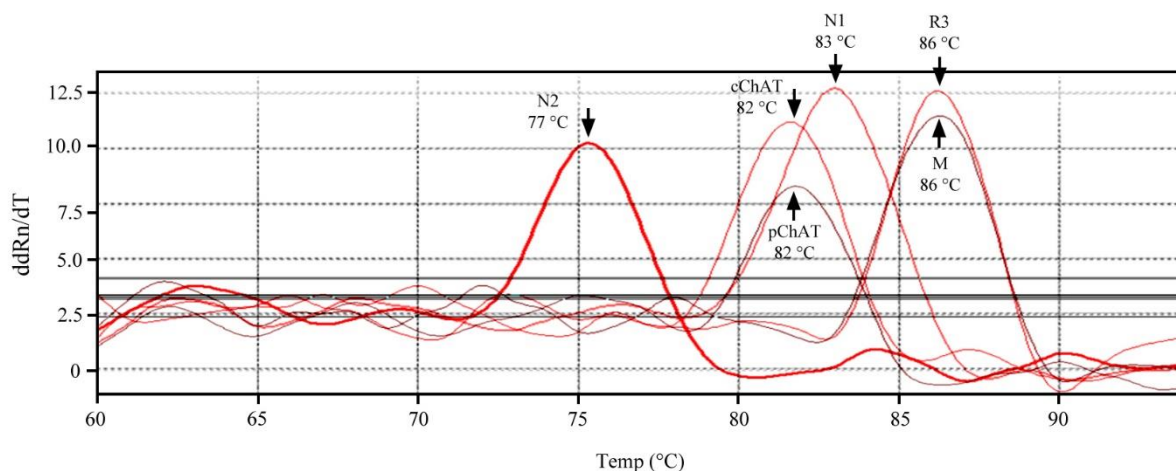
Фигура 10. Гел електрофореза на контролни реакции на амплификация на праймерните двойки за вариант R4 с матриците gBlock-1, gBlock-2 и pGEM-N1, потвърждаваща неспецифичност на използваните праймери. Контролна реакция за тестване специфичността на обратния праймер за вариант R1 с матрицата gBlock-1 на 60 °C демонстрираща неспецифични амплификационни продукти. За молекулен маркер е използван HyperLadder™ 25 bp (Bioline).

Правият праймер, използван за откриване на N1 и N2 вариантите е qN_Fwd. Този праймер е общ за двата варианта и е разположен в екзон N. Обратният праймер за варианта N1 е qMb_Rev, който е избран да бъде в екзон Mb. Липсата на уникални екзони във вариантите N2 и pChAT наложи прилагането на гранични обратни праймери с 5 базови двойки, хибридиращи в границите на уникалните екзон-екзон връзки на тези сплайсинг варианти. Обратният праймер за N2 варианта е qN2_Rev. Той обхваща мястото на екзонно снаждане на екзон P1 и екзон N (Ехон P1_N). В 3'-края на този праймер се разполагат пет базови двойки, припокриващи се с екзон N. Правият праймер използван за амплификация на M варианта е qMa_Fwd, специфичен за участък от Ma екзона. Обратният праймер е qMb_Rev2, разположен в Mb екзона. Праймерите използваните за амплификация на cChAT варианта са qCC_Fwd и qCC_Rev. Двата праймера са разположени в екзон 5, който е уникален за този вариант. За pChAT варианта, при който липсват кодиращите екзони от P5 до P8, правият праймер qPC_Fwd е разположен в екзон P3. Обратният праймер qPC_Rev, подобно на N2 сплайсинг варианта обхваща с пет базови двойки мястото на екзонно снаждане между екзон P4 и екзон P9 (Екзон P9_P4). Матрицата gBlock-1 е използвана отново в контролна PCR реакция за проверка на специфичността на тези обратни праймери хибридиращи в местата на екзонно снаждане. За прав праймер и в двете реакции е използван qRb_Fwd.

Подходящата температура на хибридизация, която дава достатъчна специфичност за всяка тествана двойка праймери, е както следва: R3 – 60 °C; N1 – 63 °C; N2 – 65 °C; M – 65 °C; cChAT– 63 °C и pChAT – 65 °C. Оптималната температура на хибридизация на праймерите е тази, при която ефективността на PCR амплификацията е максимална без наличие на неспецифични продукти. Оптимизирането на температурата на хибридизация на праймерите включва понижаване на реакционната температура, за да се свържат праймерите с тяхната комплементарна ДНК. В зависимост от резултатите от PCR реакцията се достига до оптималната температура на хибридизация. Ако резултатите показват липса на амплификация или ниско количество на амплифицирания продукт е необходимо стъпаловидно понижаване на температурата с 2-3 °C. При наличие на неспецифични амплификационни продукти е необходимо повишаване на температурата с 2-3 °C. Поради високата хомоложност в 3'-края на екзон N и Mb за сплайсинг варианта N2, както и екзон P4 и P8 за pChAT, температурата на хибридизация се повиши до 65 °C. Тази температура доведе до липса на неспецифична амплификация в контролната реакция с праймер qRb_Fwd и gBlock-1 като матрица.

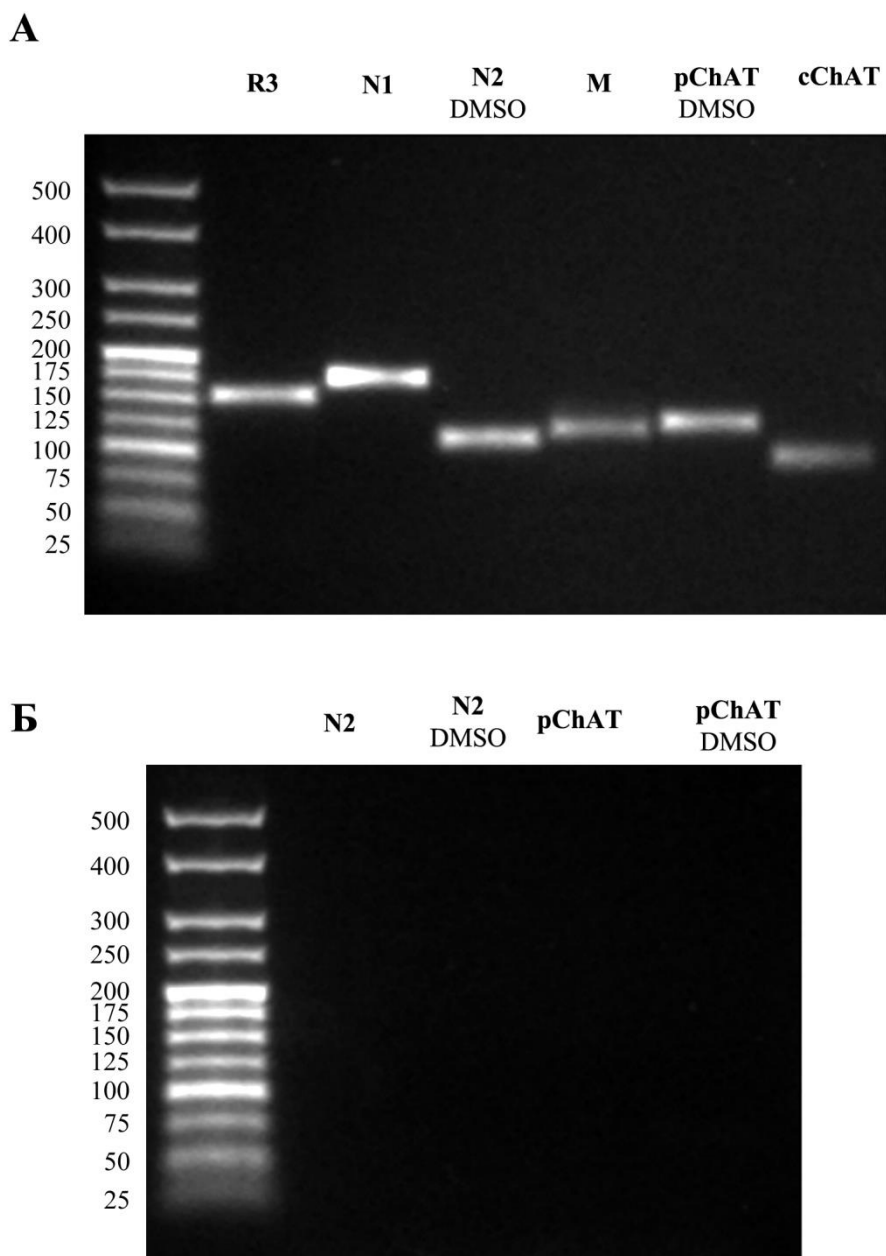
За тестване специфичността на получените амплификационни продукти се използва анализ на кривите на денатурация. След последния цикъл на денатурация, анийлинг на праймерите и екстензия на дъщерната ДНК верига беше приложен анализ на кривите на топене в следния температурен интервал: 60-95 °C. За кривата на всяка положителна проба се отчете броят на пиковете и температурата на денатурация. Анализът на кривите на денатурация от проведените PCR експерименти демонстрира висока специфичност на амплификация получена с *de novo* синтезираните праймерните двойки използвани за последващ анализ на изследваните сплайсинг варианти в ГИТ на

мишки. При всички варианти се наблюдава отчетлив пик в кривите на денатурация, което еднозначно говори за специфичността на получените ампликони (Фиг. 11).



Фигура 11. Анализ на кривите на топене (melt curve analysis) на амплификационните продукти от PCR реакцията с *de novo* синтезираните праймерни двойки и ДНК матрици.

Отсъствието на допълнителни неспецифични продукти се визуализира и върху 2% агарозен гел оцветен с етидиев бромид (Фиг. 12А). При наблюдение на амплификацията в реално време, в контролните реакции с gBlock-1 беше отчетено увеличение на флуоресцентния сигнал през последните няколко цикъла и малък втори пик бе забелязан на кривата на топене заедно с желанния продукт. Това предполага неспецифично свързване на праймерите. За достигане на желаната специфичност към реакционната смес се добави 3%DMSO, което даде пълна специфичност, без да се намесва в амплификацията (Фиг. 12Б).



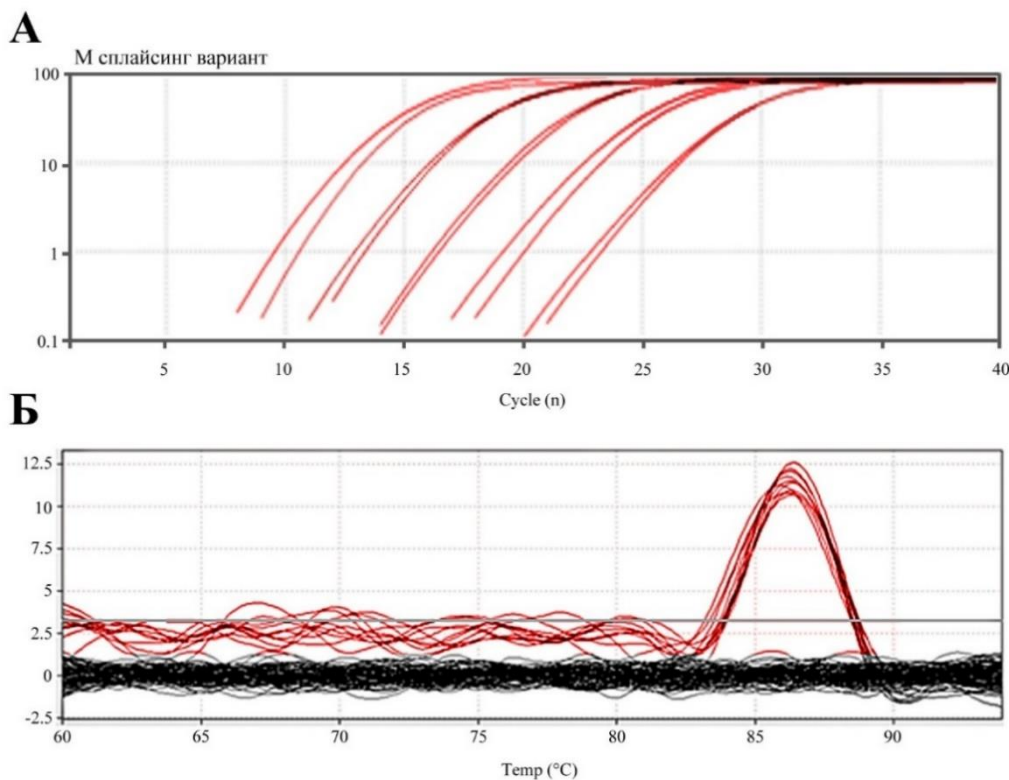
Фигура 12. А) Гел електрофореза на амплифицираните фрагменти със съответна дължина за R3 (149 bp), N1 (170 bp), N2 (112 bp), M (119 bp), pChAT (125 bp) и cChAT (95 bp) изоформите на иРНК на ензима ChAT. Като матрици за амплифициране на изоформите са използвани: gBlock-1 за амплифициране на изоформата R3; съответно gBlock-2 за амплифициране на изоформите N2, M, pChAT и cChAT. Плазмидът pGEM-N1 е използван за тестване специфичността на праймерите, амплифициращи N1 варианта.

Б) Гел електрофореза на контролна реакция на амплификация с общ прав праймер qRb-Fwd и съответен вариант-специфичен обратен праймер с матрицата gBlock-1 за вариантите N2 и pChAT без и с добавяне на DMSO. За молекулен маркер е използван HyperLadder™ 25 bp (Bioline).

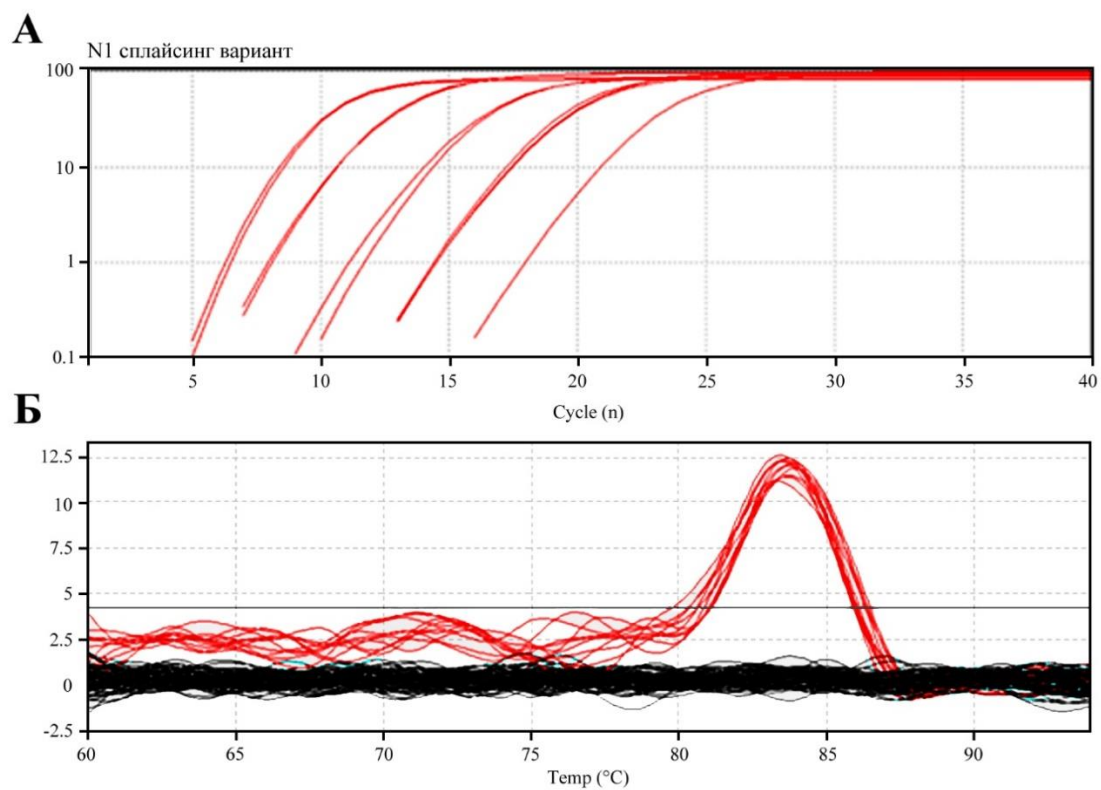
3. Относителен количествен анализ на експресията на сплайсинг вариантите на ензима ChAT

3.1. Изготвяне на стандарти за генериране на стандартни криви

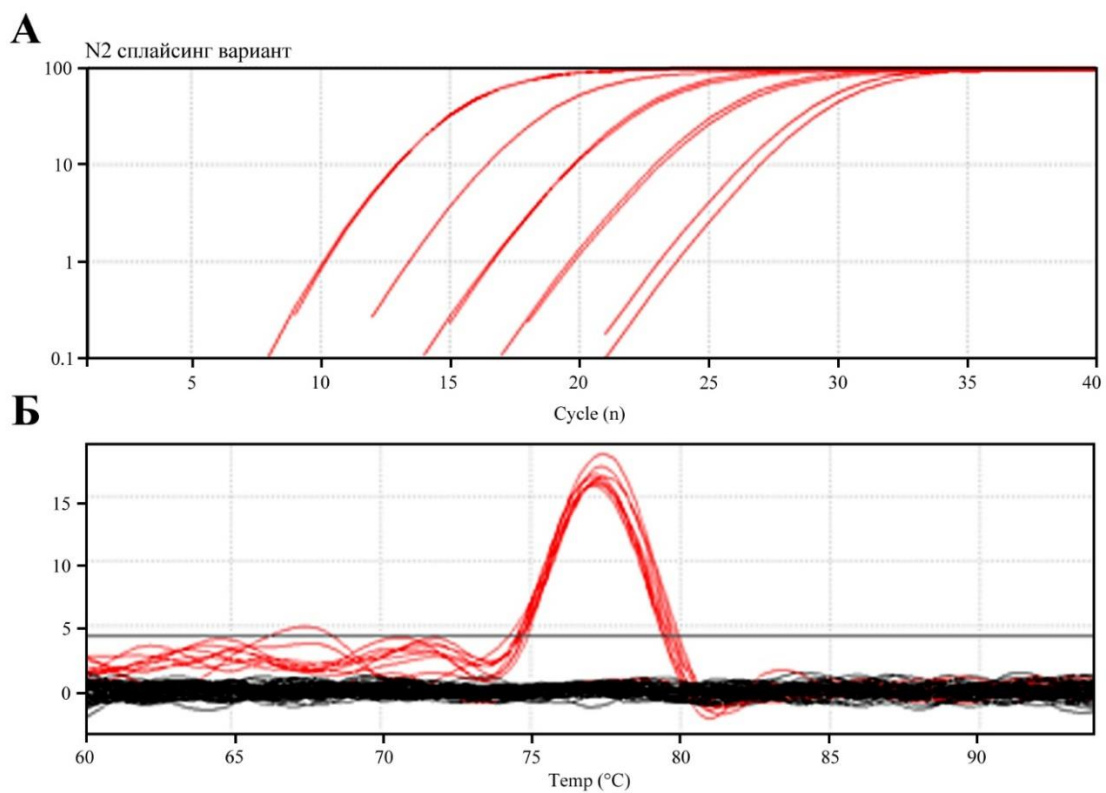
Всяко от направените 1/10 разреждания на матриците (gBlock-1, gBlock-2 и pGEM-N1) се използва за генериране на стандартни криви чрез qPCR. Всеки стандарт се тества двукратно и се определи средната C_t стойност на съответното разреждане. В хода на PCR реакцията се направи анализ на генерираните амплификационни криви и криви на денатурация (Фиг. 13-18).



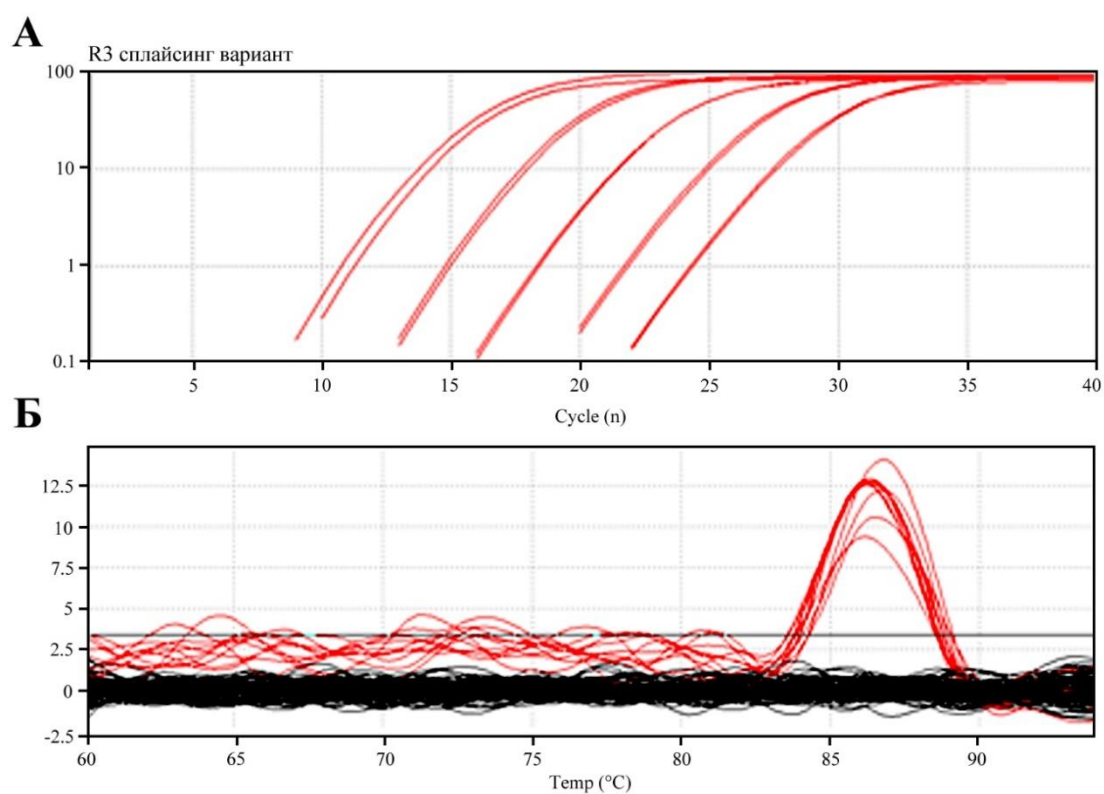
Фигура 13. А) крива на амплификация Б) крива на денатурация на вариант М демонстриращи специфични ампликони и пикове на денатурация при 86 °C.



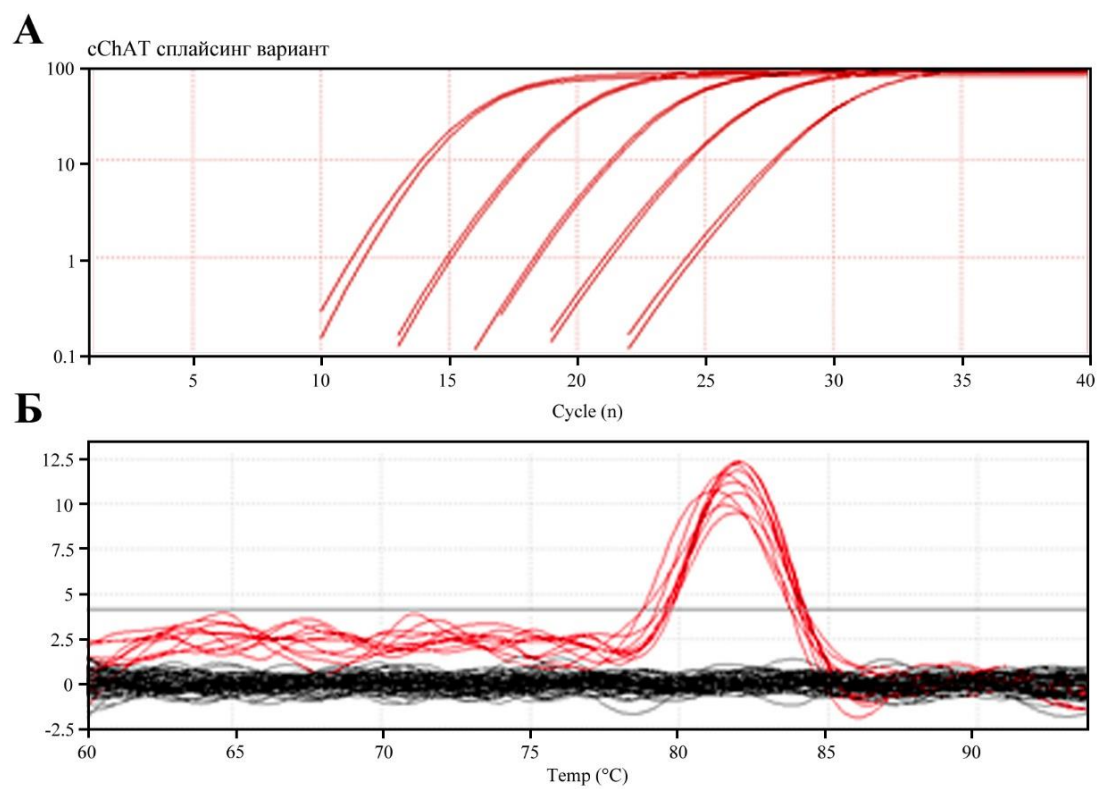
Фигура 14. А) крива на амплификация Б) крива на денатурация на вариант N1 демонстриращи специфични ампликони и пикове на денатурация при 83°C.



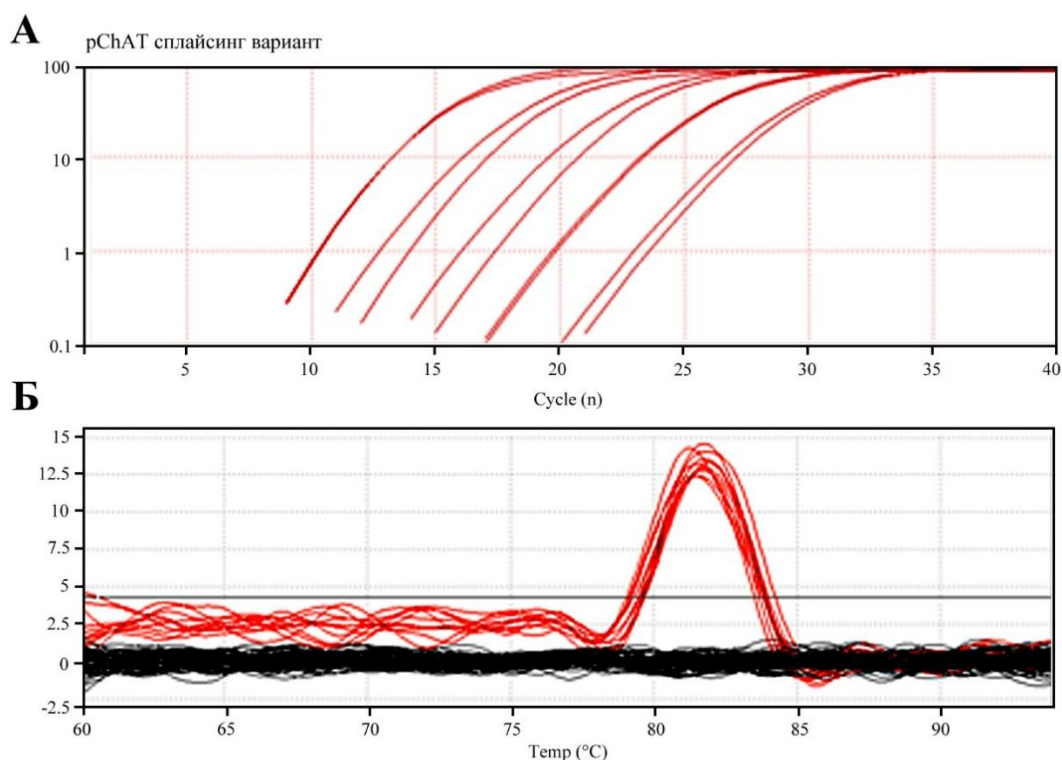
Фигура 15. А) крива на амплификация Б) крива на денатурация на вариант N2 демонстриращи специфични ампликони и пикове на денатурация при 77°C.



Фигура 16. *А) крива на амплификация Б) крива на денатурация на вариант R3 демонстриращи специфични ампликони и пикове на денатурация при 86°C.*



Фигура 17. *А) крива на амплификация Б) крива на денатурация на вариант cChAT демонстриращи специфични ампликони и пикове на денатурация при 82°C.*



Фигура 18. А) крива на амплификация Б) крива на денатурация на вариант pChAT демонстриращи специфични ампликони и пикове на денатурация при 82°C.

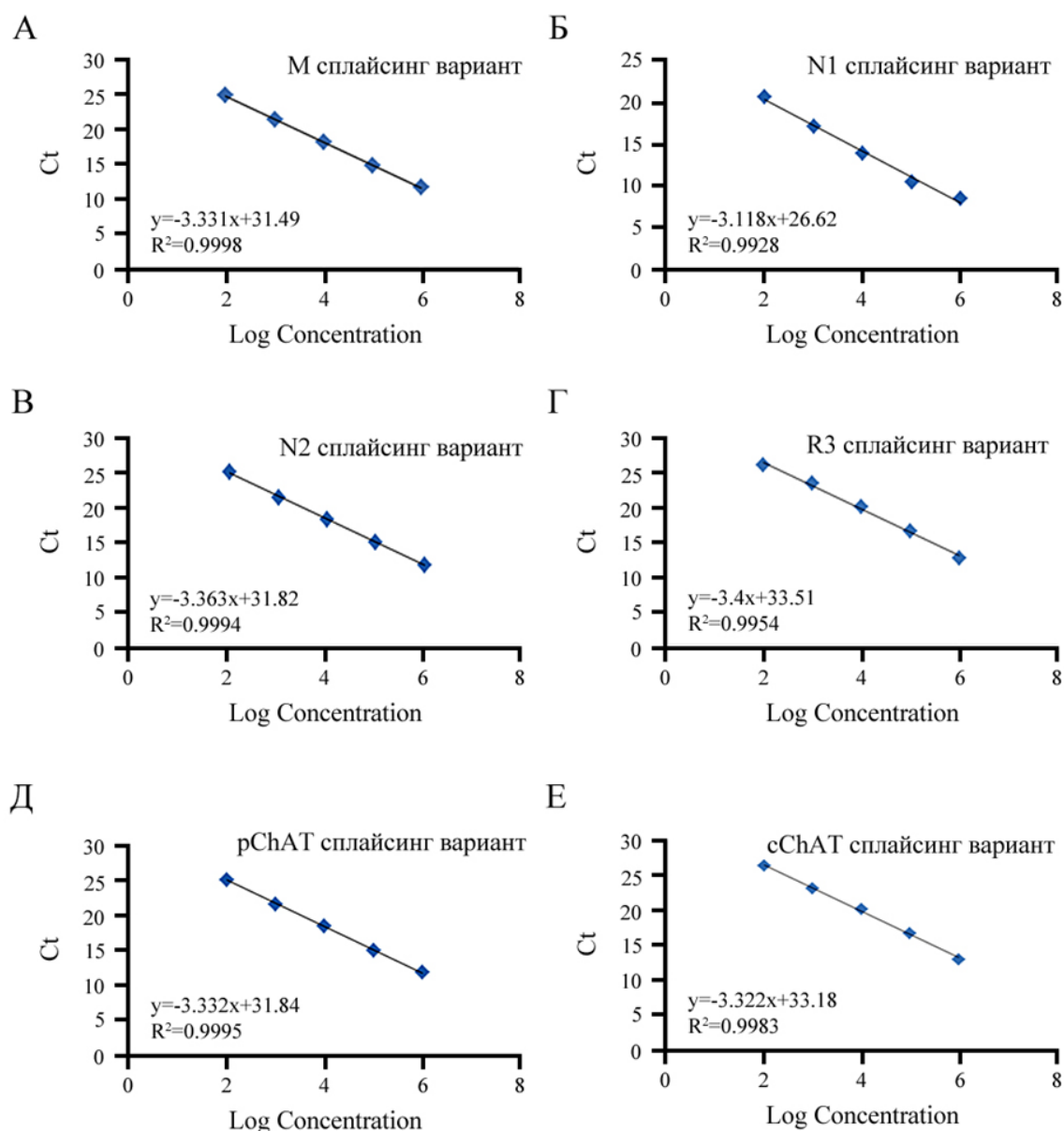
3.2. Определяне ефикасността на амплификация на всяка праймерна двойка

Получените резултати от количествения PCR, проведен с разрежданията на използваните ДНК матрици бяха използвани за генериране на стандартна крива за всеки от сплайсинг вариантите. За всяка крива бяха изчислени наклонът (slope), корелационният коефициент (R^2) и ефикасността на реакцията (efficiency) (Табл. 5). Наклонът на стандартната крива при real-time PCR се използва за определяне на ефективността на амплификация, като стойности между -3.1 и -3.6 съответстват на ефективност между 90-110%, което се счита за оптимален диапазон при qPCR анализа. Стандартната крива графично се представи като полулогаритмична регресионна линия на C_t стойността срещу логаритъм на съответния вариант. Ефективността на реакцията се определи чрез формулата $E = (10^{-1/\text{наклон}} - 1) \times 100$. Сто процента ефективност на реакцията се получава при 10-кратно увеличение на PCR продукта на всеки 3,32 цикъла по време на експоненциалната фаза на амплификация ($\log 2^{10} = 3,3219$). Стандартна крива с наклон $-3,32$, показва 100% ефективност на PCR реакцията. Друга характеристика на стандартната крива е корелационният коефициент (R^2), показващ до каква степен данните отговарят на стандартната крива. Стойността на R^2 отразява линейността на стандартната крива. При генерирането на стандартните криви на проучените сплайсинг варианти на ензима ChAT беше отчетен висок корелационен коефициент и ефективност на проведените PCR реакции от 96,8% до 109,3% (Фиг. 19А-Е). Ефикасността на праймерната двойка амплифицираща

референтния ген GAPDH е определена като 99% в предишно проучване при температура на хибридизация 60/63/65.

Таблица 5. Характеристики на генерираните стандартни криви.

Сплайсинг вариант	Наклон/slope	Корелационен коефициент (R^2)	Ефективност на реакцията (E)
M сплайсинг вариант	-3,331	0,9998	99. 6%
N1 сплайсинг вариант	-3,118	0,0028	109. 3%
N2 сплайсинг вариант	-3,363	0,9994	98. 3%
R3 сплайсинг вариант	-3,4	0,9954	96. 8%
cChAT сплайсинг вариант	-3,322	0,9983	99. 6%
pChAT сплайсинг вариант	-3,332	0,9995	100%



Фигура 19. А) Стандартна крива на М сплайсинг вариант с ефективност на реакцията 99. 6%; Б) Стандартна крива на N1 сплайсинг вариант с ефективност на реакцията 109. 3%; В) Стандартна крива на N2 сплайсинг вариант с ефективност на реакцията 98. 3%; Г) Стандартна крива на R3 сплайсинг вариант с ефективност на реакцията 96. 8%; Д) Стандартна крива на pChAT сплайсинг вариант с ефективност на реакцията 99. 6% и Е) cChAT сплайсинг вариант с ефективност на реакцията 100%.

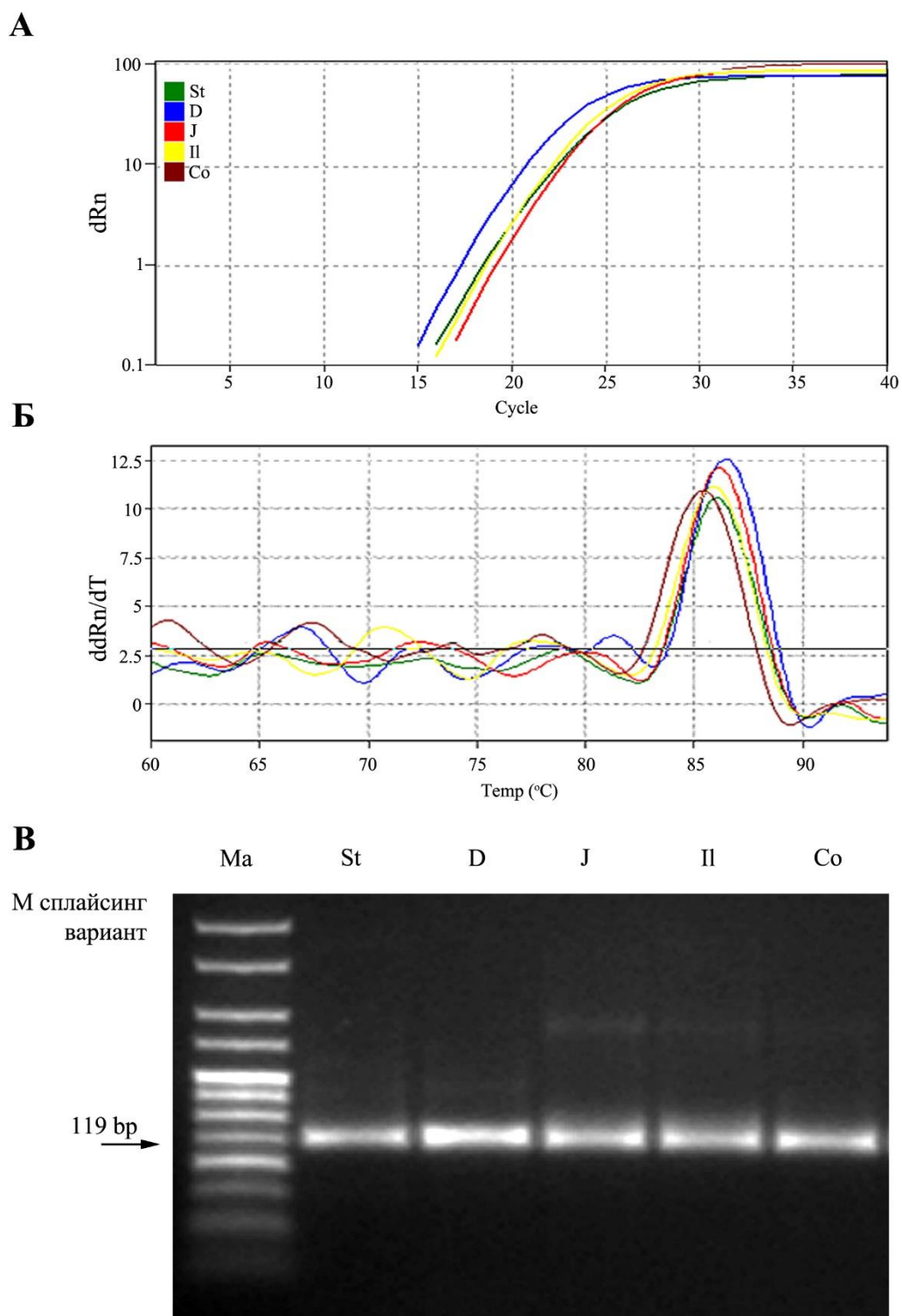
3.3. PCR в реално време със специфичните праймерни двойки за M, cChAT, pChAT, R3, N1 и N2 варианти и cDNA от различните отдели на ГИТ на мишки порода C57Bl/6NCrI

За вариантите, за които бяха успешно валидирани специфични праймерни двойки, беше проведен анализ на кривите на амплификация и кривите на топене в хода на qPCR с тъкан от експерименталните мишки. Анализът демонстрира висока специфичност на амплификация получена с *de novo* синтезираните праймерни двойки за вариантите M, cChAT и pChAT и съответната cDNA (Фиг. 20, 21, 22А). В стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки от породата C57Bl/6NCrI тези сплайсинг варианти демонстрират отчетлив пик в кривите на денатурация на получените ампликони и липса на допълнителни амплификационни продукти (Фиг. 20, 21, 22Б). Гел електрофорезата еднозначно потвърждава специфичността на получените ампликони, продуктите на които са с големина 119 bp (M вариант), 95 bp (cChAT вариант) и 125 bp (pChAT) (Фиг. 20, 21, 22В). Потвърди се наличието на специфичен амплификационен продукт отговарящ и на GAPDH, използван при нормализиране на резултатите.

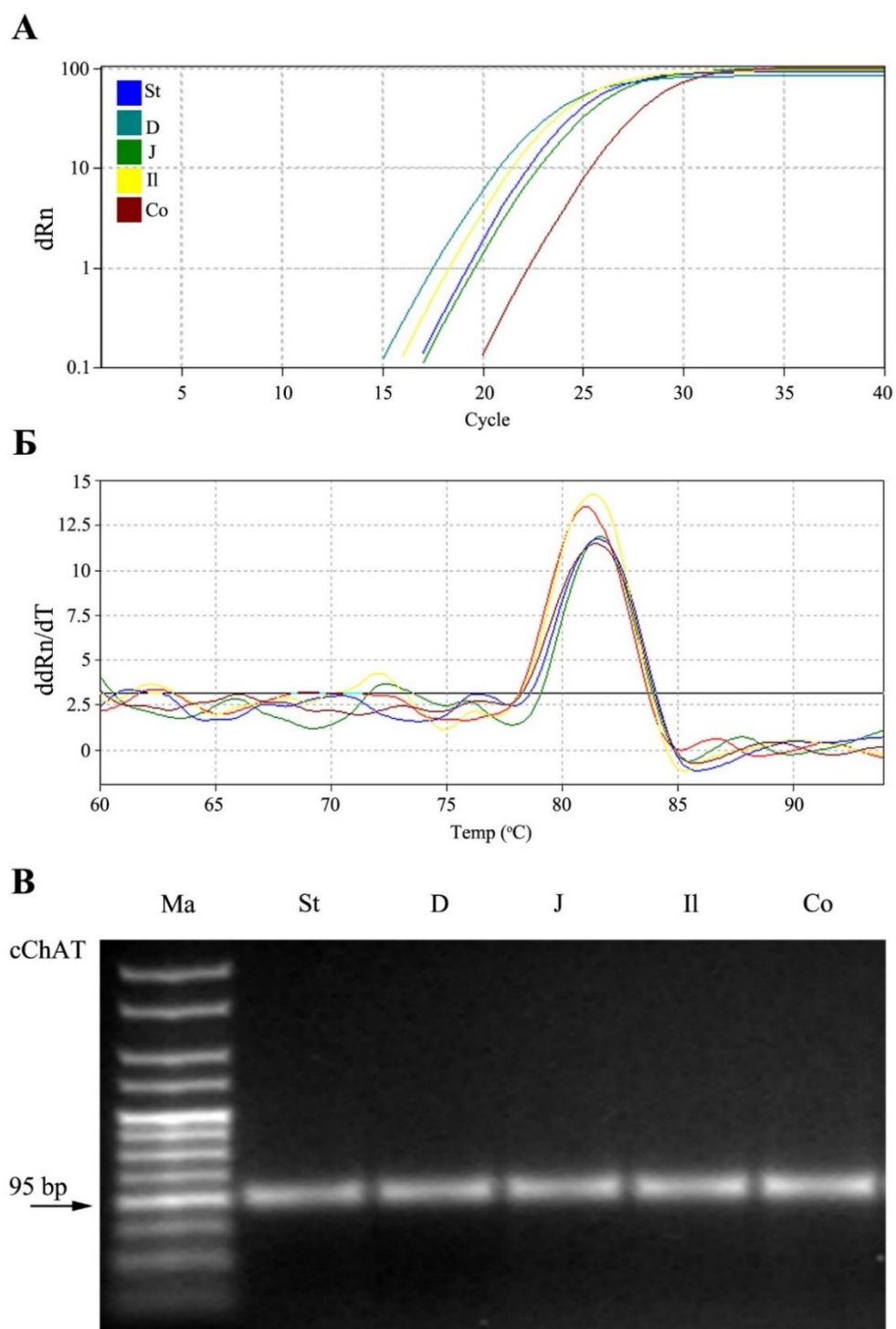
При PCR анализ на M сплайсинг варианта на ензима ChAT във всички изследвани участъци на ГИТ беше наблюдавана една амплификационна крива. Анализът на температурата на топене детектира единствена крива с температурен пик при 86 °C. Електрофоретичният анализ показва наличието на очаквания продукт с големина 119 bp, което потвърждава специфичността на получените резултати (Фиг. 20).

PCR анализът на cChAT сплайсинг варианта на ензима във всички изследвани участъци на ГИТ показва една амплификационна крива. Анализът на температурата на топене детектира единствена крива с температурен пик при 81 °C. Електрофоретичният анализ потвърди наличието на очаквания продукт с големина 95 bp, което демонстрира експресията на общия вариант на ензима ChAT в храносмилателния тракт на изследваните от нас мишки (Фиг. 21).

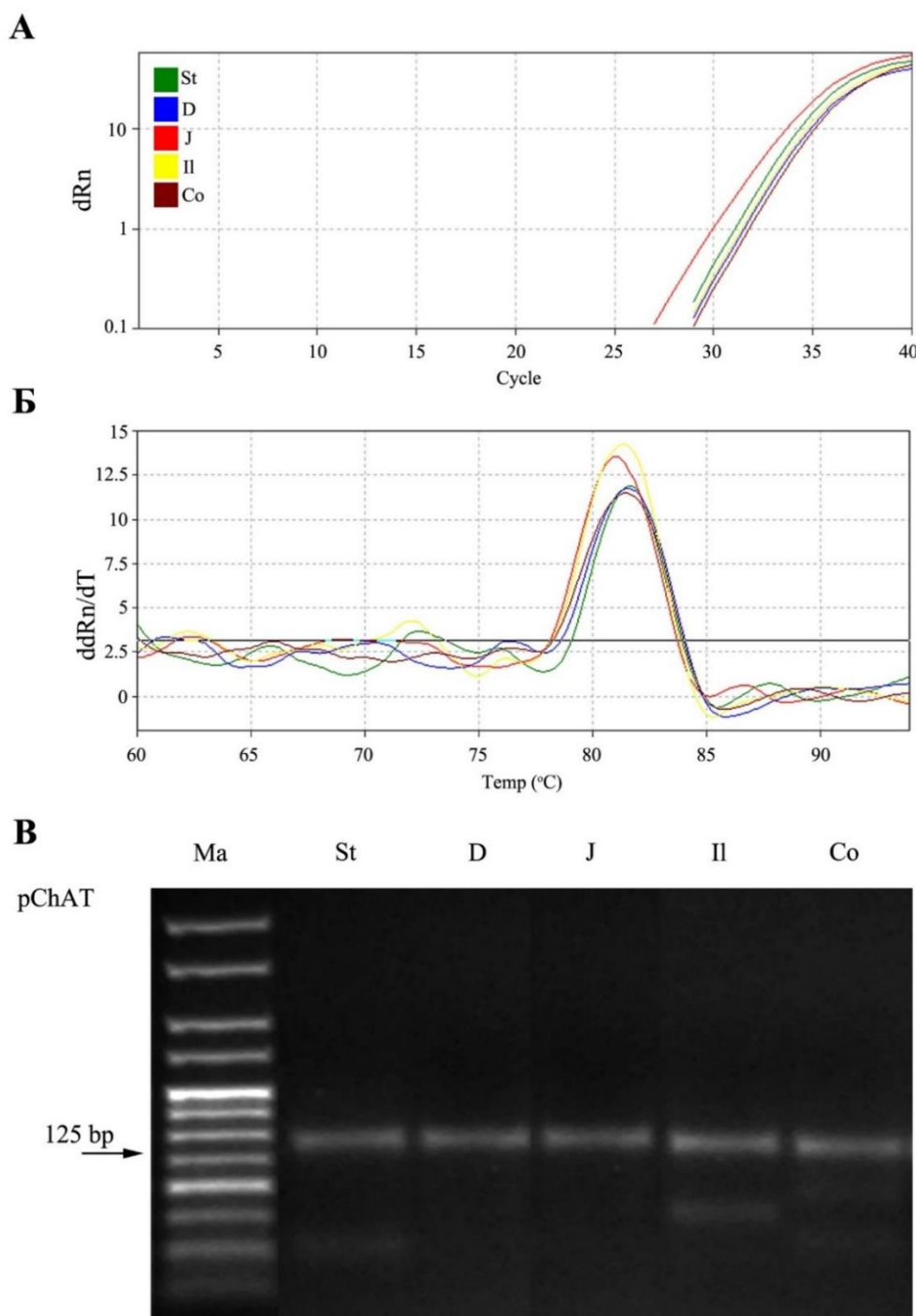
При PCR анализ на pChAT сплайсинг варианта на ензима в различните проби беше наблюдавана също така една амплификационна крива. Анализът на температурата на топене визуализира единствена крива с температурен пик при 82 °C. Електрофоретичният анализ потвърди наличието на очаквания продукт с размер 125 bp, индикиращ експресията на периферния вариант в ГИТ (Фиг. 22).



Фигура 20. Репрезентативен qPCR със cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. **А)** qPCR амплификация; **Б)** температура на топене на специфичните продукти; **В)** получения продукт с размер 119 bp, съответства на М варианта, който се експресира във всички проучени участъци.



Фигура 21. Репрезентативен qPCR със cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. **A)** qPCR амплификация; **Б)** температура на топене на специфичните продукти; **В)** получения продукт с размер 95bp, съответства на cChAT варианта, който се експресира във всички проучени участъци.

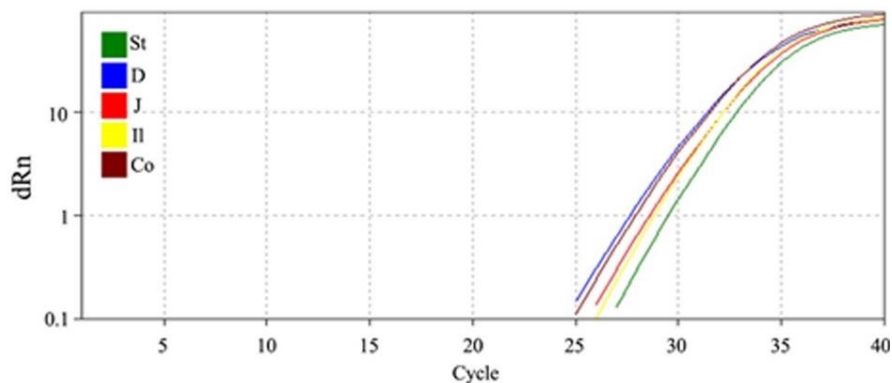


Фигура 22. Репрезентативен *qPCR* със *cDNA* от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. **A)** *qPCR* амплификация; **Б)** температура на топене на специфичните продукти; **В)** получения продукт с размер 125bp, съответства на *pChAT* варианта, който се експресира във всички проучени участъци.

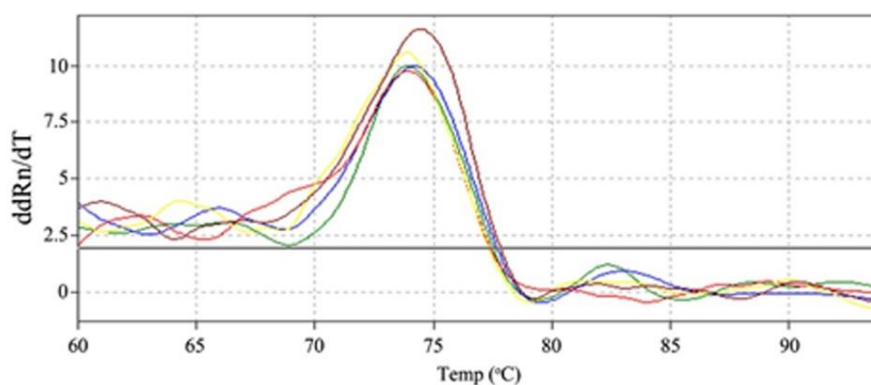
Експресионният анализ на R3 варианта показва наличието на една амплификационна крива и една крива на топене във всеки от изследваните участъци. Температурният пик на кривата на топене при използване на *cDNA* от различните части на ГИТ не съвпадна с данните от *PCR* анализа, проведен с *de novo* създадената матрица (gBlock-1). От Фиг. 23Б се видя, че разликата в температурата на топене при изследване на R3 варианта с gBlock-1 и *cDNA* надвишава 10 °C. Средната температурна стойност на R3 варианта с gBlock-1

беше 86 °C, докато средната температура с cDNA от стомах, дуоденум, йейунум, илеум и колон 74 °C. Чрез гел електрофореза бяха визуализирани продукти с еднаква дължина във всички изследвани проби, чиито размери бяха по-малки от очаквания амплификационен продукт (Фиг. 23В). Наблюдаваната неспецифична амплификация се дължи на образуването на праймерни димери в условия на отсъствие на матрица и висока концентрация на праймерната двойка. Липсата на специфични амплификационни продукти предполага, че R3 вариантът не се експресира в ГИТ на изследваните мишки, поради неактивност на съответния промотор.

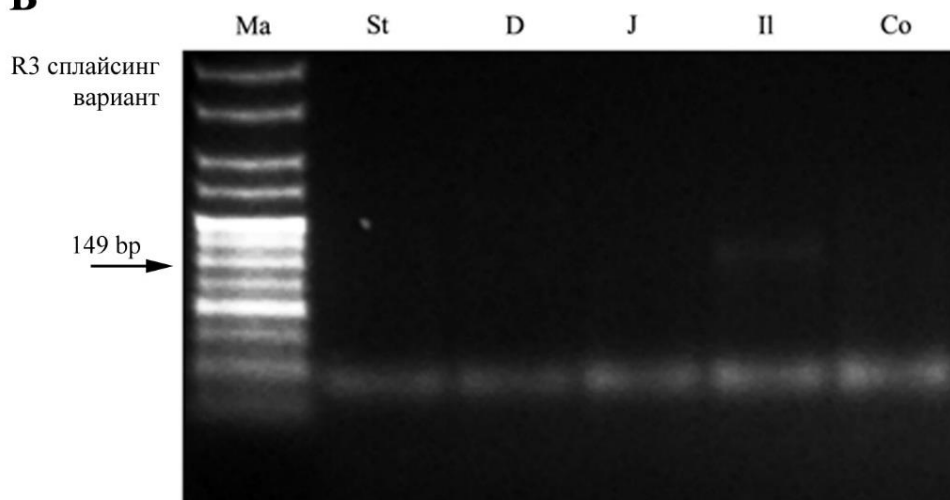
А



Б

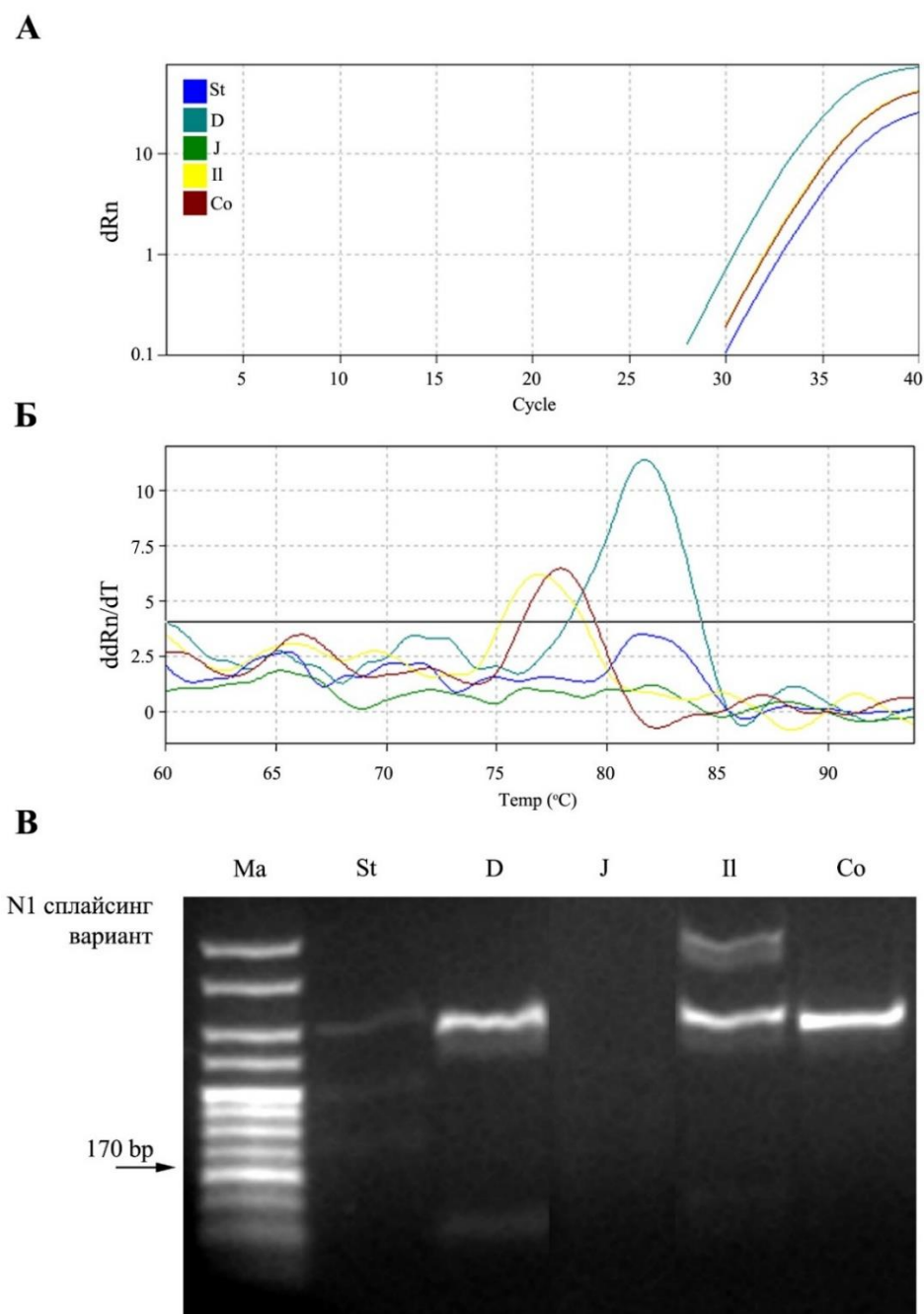


В



Фигура 23. Репрезентативен qPCR със cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. **А)** qPCR амплификация; **Б)** температура на топене на получените неспецифични продукти; **В)** получения продукт е с размер около 50 bp, който не съответства на R3 варианта.

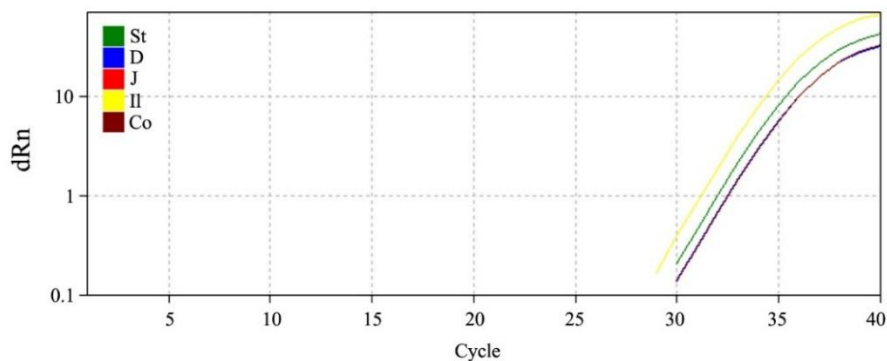
Експресионният анализ на вариант N1 показва отсъствие на амплификация в стомах и йейунум, както и неспецифични продукти в останалите изследвани отдели. Чрез гел електрофореза бяха визуализирани продукти с размер над 300 bp (Фиг. 24). Отсъствието на очакваните специфични амплификационни продукти с дължина 170 bp предполага евентуалното отсъствие на този вариант в ГИТ на полово зрелите мишки.



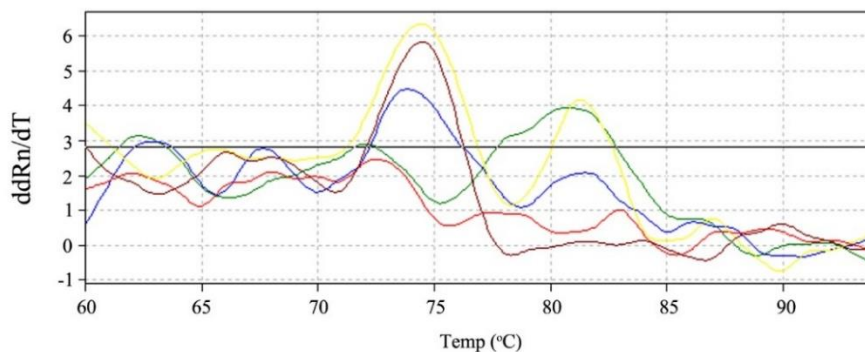
Фигура 24. Репрезентативен qPCR със cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. **A)** qPCR амплификация; **Б)** температура на топене; **В)** амплификационни продукти с размер над 300 bp.

Експресионният анализ на вариант N2 показва наличието на неспецифични пикове в кривите на топене и дълговерижни амплификационни продукти с размер, различен от очаквания 112 bp. В почти всички проби бяха наблюдавани праймерни димери и допълнителни неспецифични продукти. Тези резултати вероятно се дължат на изключително ниската или липсваща експресия и на N2 варианта в ГИТ на изследваните мишки (Фиг. 25).

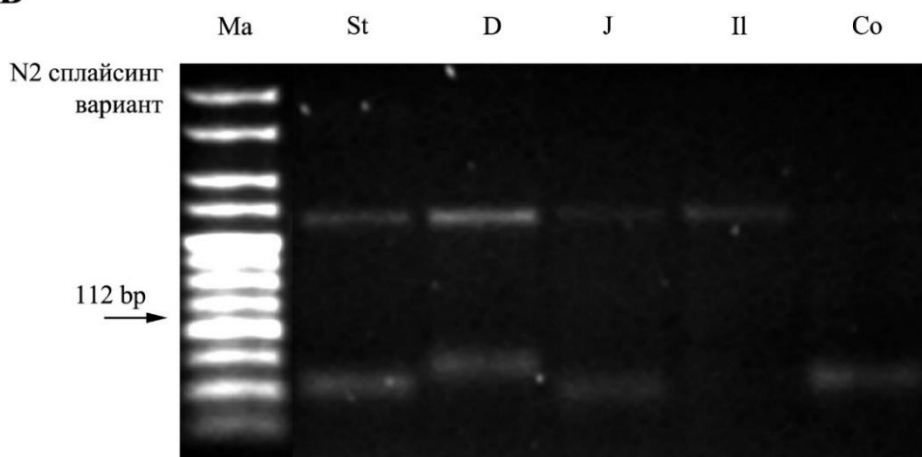
А



Б



В



Фигура 25. Репрезентативен qPCR със cDNA от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки порода C57Bl/6NCrl. **А)** qPCR амплификация; **Б)** неспецифични пикове в температура на топене; **В)** неспецифични амплификационни продукти и праймерни димери.

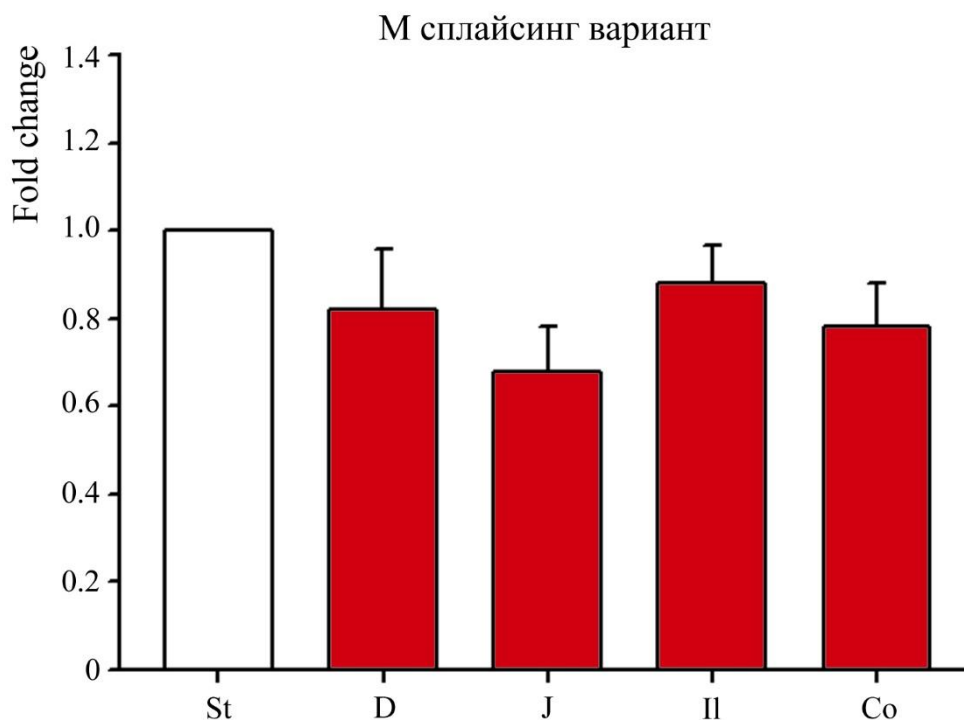
3.4. Относителен количествен PCR анализ на експресията на сплайсинг вариантите на ензима ChAT в различните части на ГИТ на мишки порода C57Bl/6NCrI

За целите на относителния количествен анализ на експресията на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT в храносмилателен тракт на мишки C57Bl/6NCrI се проведе относителен количествен анализ с използване на модифицирания $\Delta\Delta C_t$ метод спрямо Pfaffl. При този подход беше отчетена реалната ефикасност на PCR реакцията за всеки конкретен сплайсинг вариант, както и на използвания референтен ген (GAPDH). Относителното количество на сплайсинг вариантите беше изчислено като съотношение между нивото на експресия на таргетния ген (съответния вариант) и GAPDH, сравнено със съответна контрола. Крайната стойност на експресията беше изчислена чрез следната формула:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}}$$

Количественият PCR беше проведен в три технически повторения за всеки орган (стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво). За всеки амплификационен продукт, C_t стойностите са осреднени, като по този начин беше изчислена ΔC_t – разликата между средната C_t стойност на сплайсинг вариант и съответната средна C_t стойност на GAPDH за тъканната проба от всеки орган. За контрола, спрямо която се изчисли относителната експресия (ratio или fold change) беше избран стомаха. E_{target} и E_{ref} са ефективностите на PCR реакцията за проучвания сплайсинг вариант и GAPDH. Ефективността на всяка PCR реакция беше определена предварително чрез изготвяне на стандартни криви (Фиг. 19А-Е).

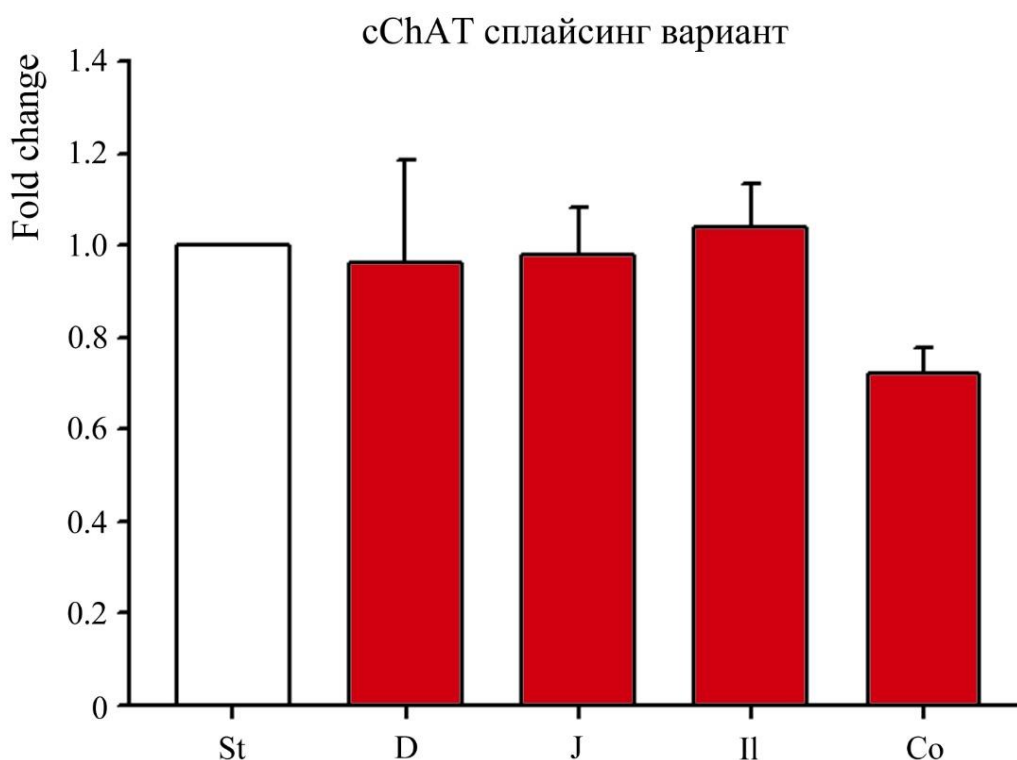
Относителната експресия на М, сChAT и рChAT сплайсинг вариантите беше изчислена спрямо стомаха, приет за референтен орган (експресия = 1.0). Експресията на М-сплайсинг варианта показва относително запазване по хода на ГИТ. В дуоденума тя беше $80\% \pm 0,14$ спрямо стомаха, в йейунума – $68\% \pm 0,10$, а в илеума и колона – съответно $88\% \pm 0,09$ и $78\% \pm 0,10$. Най-голяма вариабилност в експресията беше наблюдавана в дуоденум (Фиг. 26).



Орган	Брой животни	Средна стойност	Стандартно отклонение	SEM
St	5	1,000	0,000	0,000
D	5	0,820	0,311	0,139
J	5	0,680	0,228	0,102
Il	5	0,880	0,192	0,086
Co	5	0,780	0,228	0,102

Фигура 26. Промяна в експресията на М сплайсинг варианта спрямо GAPDH в последователните участъци на ГИТ (St-стомах, D-дуоденум, J-йейунум, Il-илеум и Co-колон). Резултатите са представени като относителна промяна (fold change) с включени стандартни отклонения и стандартна грешка на средната (SEM).

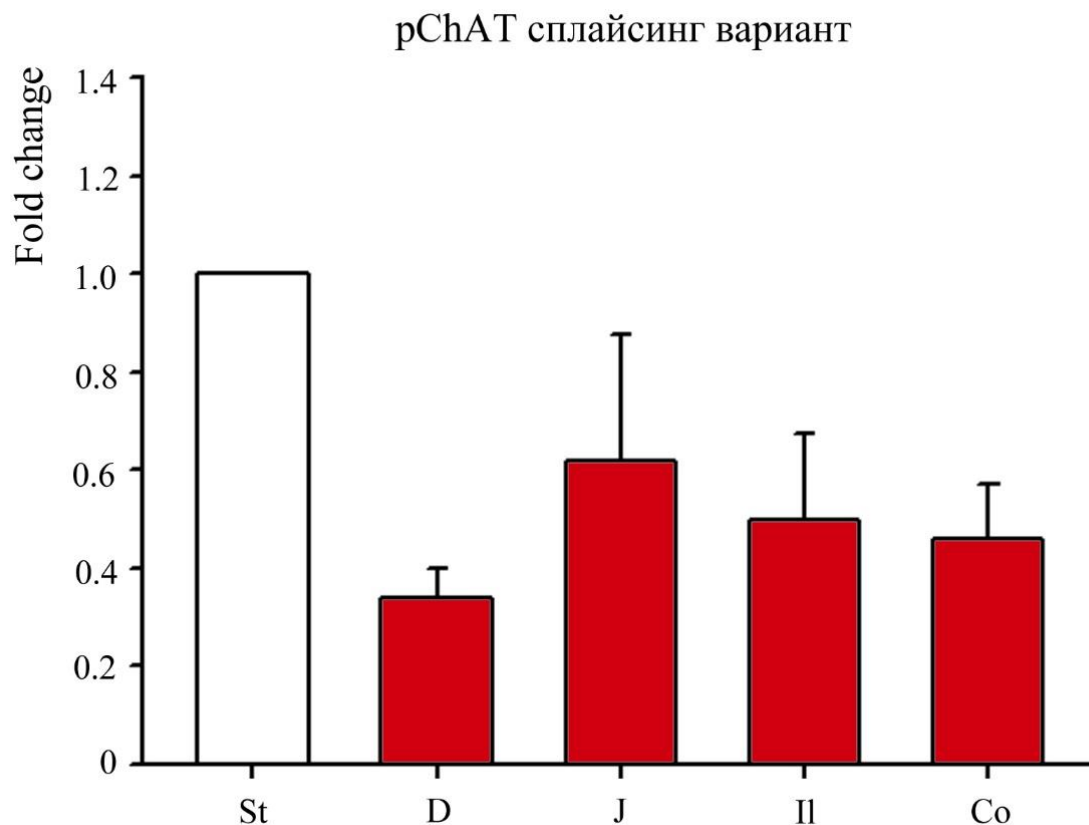
Анализът на експресията на сChAT сплайсинг варианта показва относително постоянни нива, близки до тези на стомаха. В дуоденума експресията е $96\% \pm 0,18$, в йейунума – $98\% \pm 0,09$, а в илеума беше наблюдавано леко повишение – $104\% \pm 0,07$. В колона се установи тенденция към понижаване на експресията със стойности $72\% \pm 0,04$ (Фиг. 27).



Орган	Брой животни	Средна стойност	Стандартно отклонение	SEM
St	5	1,000	0,000	0,000
D	5	0,960	0,340	0,182
J	5	0,980	0,220	0,098
Il	5	1,040	0,160	0,072
Co	5	0,720	0,180	0,040

Фигура 27. Промяна в експресията на сChAT сплайсинг варианта спрямо GAPDH в последователните участъци на ГИТ (St-стомах, D-дуоденум, J-йейунум, Il-илеум и Co-колон). Резултатите са представени като относителна промяна (fold change) с включени стандартни отклонения и стандартна грешка на средната (SEM).

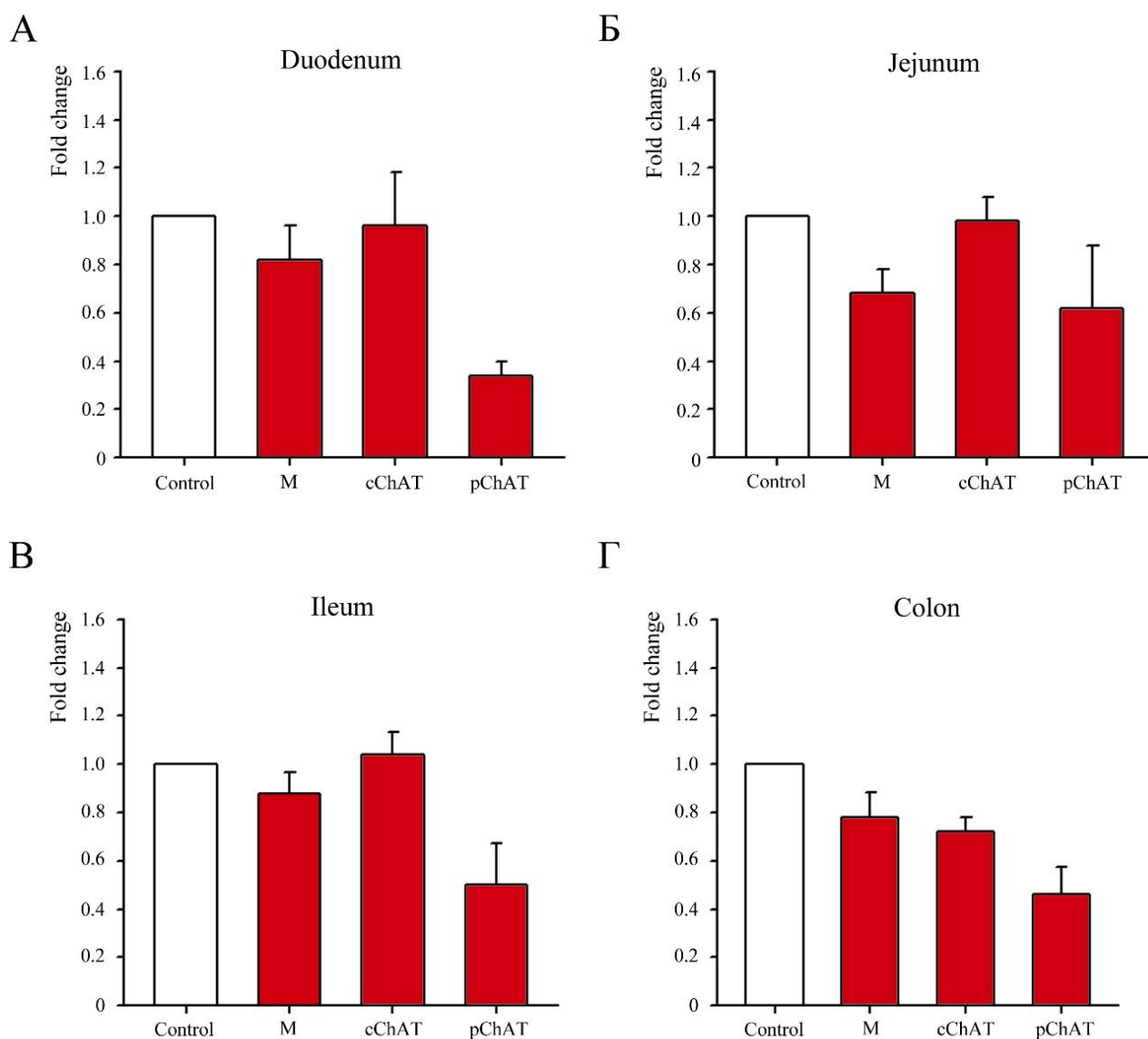
Статистическият анализ на експресията на pChAT показва значителни различия спрямо предходните два сплайсинг варианта. В дуоденума се установи значително по-ниска експресия ($34\% \pm 0,06$) спрямо контролата. В йейунума беше отчетено значително повишение на експресията ($62\% \pm 0,27$). В илеума ($50\% \pm 0,13$) и колона ($46\% \pm 0,18$) нивата са сходни и без отчетлива тенденция за промяна (Фиг. 28).



Орган	Брой животни	Средна стойност	Стандартно отклонение	SEM
St	5	1,000	1,000	1,000
D	5	0,340	0,160	0,062
J	5	0,620	0,600	0,268
И	5	0,500	0,300	0,184
Co	5	0,460	0,240	0,107

Фигура 28. Промяна в експресията на pChAT сплайсинг варианта спрямо GAPDH в последователните участъци на ГИТ (St-стомах, D-дуоденум, J-йейунум, И-илеум и Co-колон). Резултатите са представени като относителна промяна (fold change) с включени стандартни отклонения и стандартна грешка на средната (SEM).

При сравнение на експресията на трите сплайсинг варианта на ChAT в отделните органи не се установиха статистически значими разлики (ANOVA, Tukey тест). В дуоденум експресията на М варианта е 82%, на cChAT – 96%, а на pChAT – 34%, като всички стойности са сравнени със стомаха, използван като контрола (Фиг. 29А).



Фигура 29. Промяна в експресията на М, cChAT и pChAT сплайсинг вариантите спрямо GAPDH в дуоденум (А), йейунум (Б), илеум (В) и колон (Г). Резултатите са представени като относителна промяна (fold change) с включена стандартна грешка на средната стойност (SEM). Като референтен орган отново е използван стомаха.

При проследяване на експресията на вариантите в йейунум беше установена експресия на М варианта от 68%, на cChAT – 98%, а на pChAT – 62% спрямо стомаха. И тук, въпреки отчетените разлики в стойностите, статистически значима разлика между вариантите не бе установена (ANOVA, Tukey тест) (Фиг. 29Б).

Анализът на експресията на вариантите в илеум демонстрира експресия на М варианта от 88%, на cChAT – 104%, а на pChAT – 50% спрямо стомаха (Фиг. 29B).

В колон беше демонстрирана експресия на М варианта от 78%, на cChAT – 72%, а на pChAT – 46% (Фиг. 29Г). И тук, въпреки отчетените различия между отделните варианти, статистически значими разлики не бяха установени (ANOVA, Tukey тест).

IV. Обсъждане на резултатите

1. Особености в хистологичното устройство на стената на храносмилателния тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl

Стената на храносмилателния тракт при мишка следва общия структурен план, характерен за тръбестите органи. Този план включва четири основни обвивки: вътрешна лигавична обвивка (*tunica mucosa*), съдържаща собствена мускулна пластинка (*lamina muscularis mucosae*), тънка подлигавична съединителнотъканна пластинка (*tela submucosa*), мускулна обвивка, съставена от вътрешен циркулярен (*stratum circulare*) и външен надлъжен (*stratum longitudinale*) мускулен слой, както и външна съединителнотъканна обвивка – *tunica adventitia* или *tunica serosa*. Мишият стомах се характеризира с наличие на две функционално и морфологично различни части – предстомашие и същински стомах. Тънкото черво се състои от три части, които имат своите функционални особености. Първата му част е дванадесетопръстника, който обхваща задстомашната жлеза и на нивото на пъпа оформя буквата U, насочвайки се наляво за да продължи с празно черво. Характерно за мишия дуоденум е наличието на субмукозни, Брунерови жлези само в първите 2 мм от дължината на червото. Празното черво представлява основната част от дължината на тънкото черво, след което то прехожда в къс сегмент от хълбочно черво, което е крайния отдел на тънкото черво. Дебелото черво води началото си дистално от илеоцекалната клапа. Сляпото черво като начало на дебелото черво е много добре представено при гризачи. То заема значителна част от коремната кухина, като размера и разположението му зависят от начина на хранене на животното. При гризачи липсва апендикс. Ободното черво започва като проксимален колон, следван от средна част и дистален колон, завършващ с характерния за мишките къс ректум и анус. Метод на избор за детайлно изучаване хистологичното устройство на чревния тракт е въведената от Reilly и Kirsner методика *Swiss roll*, която дава възможност за проследяване дължината на сравнително голям участък по хода на червото. Moolenbeek и Ruitenberg препоръчват използването на методиката при изследване хистологичната структура на тънкото черво при гризачи. Julie Le Naour и съавтори представят модифициран протокол, базиран на оригиналната *Swiss roll* техника, с цел подобряване на визуализацията на CD3-позитивни лимфоидни структури в дебелото черво на мишки C57Bl/6J. Те подчертават значителните предимства на метода, особено при използването на свежи тъкани, което позволява прецизно представяне на клетъчните популации по протежение на цялата дължина на дебелото черво.

В настоящото изследване, използвайки техниката *Swiss roll*, са проследени хистологичните особености на стената на храносмилателния тракт при мишки от порода C57Bl/6NCrl. Проучването започна с изследване на предстомашието, което се характеризира с наличието на многослоен плосък невроговяващ епител и добре оформена мускулна обвивка (Фиг. 8А). Същинският стомах се характеризира с жлезист епител с цялото разнообразие от клетки изграждащи

кардиачните, фундусните и пилорните жлези (Фиг. 8Б). Лигавицата на тънкото черво се характеризира с добре изразени, високи чревни власинки, чийто клетъчен състав е представен от резорбтивни ентероцити, чашковидни слюзни клетки и ентероендокринни клетки (Фиг. 8В-Д). Епителът на тънкото черво притежава особености, свързани с имунната защита на локално ниво – това е чревно-асоциираната лимфна тъкан (GALT), която играе ключова роля в лигавичния имунен отговор. Чревните жлези се разполагат дълбоко в собствената пластинка на лигавицата. В техния клетъчен състав са включени призматични стриирани и нестрирани ентероцити, чашковидни слюзни клетки, клетки на Панет и ентероендокринни клетки. Разположена под лигавицата, оскъдната подлигавична обвивка показва наличие на жлези само в началото на дванадесетопръстника. Техните отводни канали прекосяват слоя и се отварят в дъното на Либеркюновите крипти. В дебелото черво основен клетъчен тип, особено в чревните жлези са чашковидните слюзни клетки, чиито брой в дистална посока намалява (Фиг. 8Е). Особеност на мишия дебелочревен епител е липсата на клетки на Панет, което определя спецификата на локалния имунитет. Характерно за лигавицата на дебелото черво е наличието на вълнообразни лигавични гънки, чиито размер намалява постепенно в дистална посока.

ENS представлява ключов структурен и функционален компонент на всички отдели на храносмилателната система. В изготвените от нас хистологични препарати ясно се визуализира *plexus myentericus* (Auerbach) – основното нервно сплетение, локализирано между вътрешния циркулярен и външния надлъжен мускулен слой на мускулната обвивка (Фиг. 8В-Е). Миентералните ганглии, изграждащи *plexus myentericus*, варират по размер, форма и ориентация в различните отдели на ГИТ. Наблюдава се тенденция към по-големи и по-добре организирани ганглии в дуоденум и йейунум (Фиг. 8В, Г), в сравнение с илеум (Фиг. 8Д), където ганглиите са по-оскъдни и с по-малки размери. Най-големи по размер миентерални ганглии се откриват по хода на дебелото черво (Фиг. 8Е, Фиг. 9А). Дебелочревните ганглии притежават от овална до силно удължена форма и са ориентирани паралелно на чревната стена, което съответства на съществуващите данни в научната литература. Посредством имунохистохимична демонстрация и оцветяване с купролиново синьо Karaosmanoglu T и съавтори сравняват гъстотата на миентералните неврони в препарати от дуоденум, йейунум-илеум и колон. Авторите показват по-голям брой неврони в дуоденум и колон в сравнение с йейунум-илеум. При приложено разтягане те отчитат намаляване броя на невроните. По отношение на заеманата площ от миентералните ганглии те наблюдават по-голяма площ заемана от ганглиите в дуоденум-йейунум в сравнение с дуоденум, което корелира с разликата в тяхната дължина. Площта на ганглиите е независима от прилагането на разтягане върху чревната стена. Според проучването най-голяма площ по хода на чревния тракт заемат миентералните ганглии в колон. Zhiling Li и съавтори използвайки имунохистохимични методи и електрическа стимулация измерват по-висока активност на ентeралните неврони в проксимален колон на мишка, в сравнение с дистален колон. Техните експерименти доказват, че ентeралните нервни вериги се различават в различните области на чревния тракт. По-комплексни вериги

авторите описват в проксималната част на дебелото черво, където съществуват по-разнообразни моторни модели и прецизен контрол от страна на ENS. Посредством съвременни генетични методики и РНК секвениране Nestor-Kalinoski и съавтори, сравняват площта на единичен ганглий и броя неврони в него в *plexus myentericus* по хода на мишия колон. Проучването им доказва намаляване броя на ганглиите и броя на невроните на mm^2 по хода на дебелото черво на изследваните от тях мишки. Авторите правят сравнение с човешко дебело черво. Те описват значително по-голям брой неврони на mm^2 при мишка в сравнение с човек. В същото проучване се съобщават еквивалентни резултати между проксимален и дистален миши колон и възходящо и низходящо ободно черво на човек. В морфометрично проучване отново при хора се демонстрира разлика в броя на невроните в миентералните ганглии по хода на ГИТ. Авторите посочват тенденция за намаляване плътността на невроните и техния размер в дистална посока. В правото черво, подобно на стомаха те описват малко по-висок среден брой неврони на cm^2 в сравнение с мезентериалното тънко и ободното черво. Тази особеност на правото черво авторите свързват с моторните механизми, лежащи в основата на перисталтиката и пропульсията.

На изготвените хистологичните препарати *pl. submucosus* се разполага в деликатния за мишия чревен тракт слой между лигавицата и мускулната обвивка (Фиг. 8В-Е). Сплетението се отличава с по-малки по размер ганглии, пръснати сред съединително-тъканните влакна на субмукозата. Броят на невроните в ганглиите корелира с техния размер (Фиг. 9Б).

Организацията на ENS се основава на различния ѝ ембрионален произход, както и на особеностите в миграцията, пролиферацията и диференциацията на нейните компоненти по хода на ГИТ. Ентералните неврони и глиални клетки произхождат от вагалния и сакралния участък на нервния гробен. Вагалният гробен, разположен в областта на сомитите 1–7, осигурява основната популация от прекурсорни клетки за ENS. Тези клетки мигрират в росто-каудална посока и колонизират целия ГИТ в периода между 4-та и 10-та гестационна седмица. В дисталните отдели на чревния тракт компонентите на ENS произхождат от сакралния нервнен гробен (разположен каудално от 28-мия сомит). Миграцията на тези клетки започва по-късно и се осъществява в каудо-роstralна посока. Скорошни проучвания разкриват нови аспекти от организацията на ENS, като описват наличието на периферни ивици, ориентирани специфично по хода на гастроинтестиналния тракт. Чрез имунохистохимична визуализация Hamnett R и съавтори демонстрират миентералните ганглии в миши модели, организирани в ивици с циркулярна ориентация спрямо надлъжната ос на червото. Тази организация се запазва по цялата дължина на чревния тракт. За разлика от миентералното, субмукозното сплетение в тънкото черво не показва такава ивичеста структура. Липсва корелация между разположението на субмукозното сплетение и локализацията на интраепителиалните жлези. В проксималния отдел на колон авторите описват субмукозни ганглии, организирани в диагонални ивици, ориентирани успоредно на лигавичните гънки и разположени срещуположно на мезентериалния ръб. В дисталния колон подобна структурна организация на субмукозното сплетение не се наблюдава. Тези нови данни променят досегашните

разбирания за морфологията на ENS и отварят възможности за нови изследвания, свързани с патофизиологията на стомашно-чревния мотилитет.

2. Функционална организация на ENS

Ентералните сплетения се състоят от мрежа от взаимосвързани неврони, техните израстъци и сложни рефлексни дъги, които осигуряват интегрирана информация за състоянието на храносмилателната система и контролират всички локални физиологични процеси. Този комплексен нервен апарат функционира относително независимо от централната нервна система. На това основание в съвременната научна литература ENS често се определя като „втори мозък“ – поради високата плътност на нервни клетки в нейния състав и способността ѝ да регулира автономно двигателната активност на червата, чревната секреция и локалния кръвен ток. ENS направлява лигавичния транспорт, ендокринната и имунна функция на стомашно-чревния тракт. Познаването на морфологичните особености на ENS и комуникацията с чревния микробиом предоставя ключови насоки за разкриване етиологията на множество стомашно-чревни и системни заболявания. В основата на функционални нарушения в ГИТ, като ахалазия, гастропареза, чревна обструкция, болест на Крон и болест на Хиршпрунг стоят изменения в нормалната структура и функция на ENS. Дискутира се ролята на ENS в етиологията на злокачествените заболявания на дебелото черво. Нарастващ брой изследвания свързват нарушения по оста черва–микробиом–мозък с развитието на невродегенеративни заболявания като болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и мултиплена склероза.

Според литературните данни ENS включва около 20 различни типа неврони, класифицирани в зависимост от техните морфологични характеристики (неврони тип Dogiel и Stach), електрофизиологични свойства (типове S и AN), използвани невротрансмитери и тяхната функционална роля в чревната регулация. Един от основните функционални класове ентерални неврони са мотоневроните, които инервират гладката мускулатура на ГИТ, стените на кръвоносните съдове, ентероендокринните клетки и жлезистите структури. Те играят ключова роля в контрола на моториката на чревната стена, регулацията на секрецията и локалния кръвоток. Невроните, които реагират на химични и механични стимули в чревната стена, са класифицирани като вътрешни първични аферентни неврони – IPANs. Те представляват първата стъпка в локалните рефлексни дъги на ENS и играят основна роля в сензорната детекция на промените в химичната среда и механичното напрежение на лигавицата и мускулатурата на ГИТ. Von Haller е първият учен, който демонстрира, че изолирани черва могат да запазят способността си да реагират на сензорни стимули, въпреки прекъснатата им връзка с главния и гръбначния мозък. Убедителни доказателства за сетивната функция на ентералните неврони са представени едва в средата на 90-те години на XX век от Furness. Изследванията на Furness JB и Kunze WA показват, че ентералните неврони с морфология тип Dogiel II отговарят за възприемането както на химични, така и на механични стимули. Предполага се, че и невроните с

морфология тип Dogiel I притежават механосетивни функции, но за разлика от невроните тип Dogiel II, техните проекции не достигат до лигавицата.

В ГИТ се описва участието на множество невротрансмитери и биологично активни молекули, които могат да бъдат съвместно съхранявани и освобождавани в отговор на специфични стимули. Тези медиатори играят ключова роля в модулацията на перисталтиката, секреторната активност и локалния имунен отговор. Всички невроактивни субстанции, действащи на ниво ENS, допринасят за поддържането на чревната хомеостаза. Субстанция Р участва директно в болковите механизми, докато VIP регулира пролиферацията на чашковидните клетки и стимулира секрецията на муцин от чревната лигавица. Освен това, VIP упражнява модулиращ ефект върху функциите на имунните клетки в рамките на ENS и участва в релаксацията на гладката мускулатура. Серотонинът (5-HT) контролира активността на множество ентeрални неврони, глиални и имунни клетки. ACh е основният възбуждащ медиатор в ENS, участващ в контрола и регулацията на множество физиологични процеси в ГИТ. Той представлява основен невротрансмитер, използван от преганглионарните вагусови и пелвични неврони. На ниво ГИТ е широко използван от ентeралните мотоневрони, интерневроните, част от секретомоторните неврони и IPANs. Освен невроналната си функция, ацетилхолинът изпълнява роля и като сигнална молекула в различни ненеvронални клетки, които също експресират ACh и го използват за регулация на широк спектър от клетъчните си функции. Данни от последните години предполагат, че този ненеvронален ACh може да действа и като медиатор, участващ в развитието и пролиферацията на туморни образувания, включително и при колоректален карцином при човека. Основният ензим, ангажиран в биосинтезата на ACh е ChAT. Изследването на различните сплайсинг варианти на иРНК, кодираща синтеза на ензима и тяхната експресия е от ключово значение за разкриването на молекулярните механизми, свързани с редица заболявания.

3. Генетичен анализ на ChAT. Молекулярно-генетични методи за визуализация на сплайсинг вариантите на ензима ChAT при мишка

Ензимът ChAT се кодира от един ген във всички проучени до момента животински видове. В мишки генът, кодиращ ChAT, включва седемнадесет екзона. Има три 5'-некодиращи екзона (R, N и M), следвани от четиринадесет последователни кодиращи екзона (Фиг. 1А, Б). Цялата отворена рамка за четене на иРНК за VACHT е локализирана в първия интрон на ChAT гена, в зоната между R и N-некодиращите екзони. Между N екзона и първият 3'-терминален кодиращ ChAT екзон се намира третият M некодиращ екзон (Фиг. 1А). Наличието на няколко места за инициация (вероятни промоторни участъци) на транскрипцията увеличава вероятността да се експресират различни типове иРНК за ChAT в различните холинергични неврони и ненеvронални клетъчни типове. Misawa H и съавтори описват наличието на седем различни сплайсинг варианта на ChAT иРНК при мишка – M, N1, N2, R1, R2, R3 и R4. Всички тези варианти се различават в 5'-некодиращите си участъци, затова кодират синтеза на еднакъв

протеин с молекулно тегло 67 kD, общ тип ChAT (cChAT). От всички описани сплайсинг варианти М-вариантът е най-често срещан в мишия гръбначен мозък. В изследването са изолирани общо 21 транскрипта, от които 19 съдържат екзон М. От тези 19 транскрипта 4 на брой са М-варианти, а останалите 15 включват част от екзон М, което се наблюдава при N1, R3 и R4 вариантите. Използвайки трансфекционен анализ, авторите демонстрират наличието на високоефективен промотор, разположен пред екзон М, което подкрепя преобладаващата роля на М-варианта в експресията на ChAT при мишка. С това свое проучване авторите добавят вариантите R3 и R4 към вече описаните от Mineko Kengaku пет варианта при плъх – R1, R2, N1, N2 и М.

Проведеният от Kengaku М генетичен анализ на сплайсинг вариантите при плъх отново потвърждава М-варианта като най-разпространен сред изследваните транскрипти в гръбначния мозък. От изолираните 29 копия cDNA от гръбначен мозък авторите идентифицират 6 копия от М-варианта, 4 копия R1, 2 копия R2, 1 копия N и 16 копия са класифицирани като М или N1 варианти.

Анализът на човешкия геном и описаните сплайсинг варианти на ChAT при хора показва наличието на различен старт кодон в началото на кодиращата част на гена. Докато при гризачи и прасе началният кодон е класическият ATG, при човешкия ген на това място се намира нуклеотидната последователност ACG, която не функционира като старт кодон за инициране на транслацията. Всички сплайсинг варианти описани в човешкия мозък се транслират до протеин с молекулно тегло от 69 kDa. Проведеният от Misawa и съавтори PCR анализ на иРНК на ензима ChAT в човешки главен и гръбначен мозък демонстрира експресия на R вариант с дължина 277 bp. Според модела на сплайсинг този вариант кореспондира с R2 варианта, описан при гризачи. Авторите не успяват да идентифицират описаните при гризачи R3 и R4 варианти. С помощта на N-специфична праймерна двойка са детектирани три амплификационни продукта, съответстващи на N1 и N2 вариантите. Третият дълговерижен продукт съдържа идентични 9bp повтарящи се нуклеотидни последователности. При амплифициране с праймерите за М варианта е получен един продукт с дължина 458 bp както в главен, така и в гръбначен мозък. В този М вариант на иРНК на ензима са описани два ATG кодона, ограждащи ACG кодона. При останалите описани варианти – R, N1 и N2 се наблюдава един ATG кодон, разположен след ACG. Последващият ин витро транслационен анализ установява два транслационни продукта на М варианта на иРНК – един с молекулна маса 69 kDa, аналогичен на продуктите на всички описани сплайсинг варианти, и втори с маса 82 kDa. Транслационната ефективност на всички сплайсинг варианти е ниска, най-вече при М варианта. В заключение, авторите демонстрират висока експресия на М варианта в ЦНС при човек, което съответства на експресионния модел при гризачи. Въпреки това, в контраст с високата транскрипционна активност, транслационната ефективност при човека остава ниска. Това несъответствие между количеството иРНК и реалната синтеза на ензима ChAT предполага наличието на посттранскрипционни или транслационни механизми за контрол специфични за човека. Понижената транслационна ефективност на човешките иРНК за ChAT в сравнение с тази при гризачи вероятно отразява

еволюционно обусловена адаптация на холинергичната система към специфичните функционални изисквания.

Структурата на мишия ген за ChAT и неговите регулаторни елементи са обект на интензивни научни изследвания през последните десетилетия. Въпреки това, познанията относно различните модели на експресия на алтернативните сплайсинг варианти на иРНК за ChAT и активността на различните промотори по дължината на гена остават непълни и недостатъчно проучени. До момента само някои от сплайсинг вариантите на иРНК за ChAT са демонстрирани чрез техники като *in situ* хибридизация, обратно транскрипционен PCR и имунохистохимия. В проучване на Trifonov S, чрез нерадиоактивна *in situ* хибридизация е анализирана експресията на сплайсинг вариантите на иРНК за ChAT – N1, R1, R2, R3 и R4 в ЦНС на мишка. Авторите установяват различни нива на експресия на тези варианти в холинергични структури, включващи базалния комплекс на предния мозък, понтомезенцефалния тегментум, стриатума, както и моторни и автономни ядра в мозъчния ствол и гръбначния мозък. Най-висока експресия на вариантите R1 и R2 наблюдават в базалния комплекс на предния мозък и в ядрата на мозъчния ствол. В моторните и автономните ядра на мозъчния ствол установяват умерено до високо ниво на експресия на вариантите R3, R4 и N1, докато в холинергичните структури на предния мозък те показват слаба експресия. В невроните от мозъчната кора, хипокампус и медиалното хабенуларно ядро не установяват експресия на нито един от изследваните варианти (N1, R1–R4), което предполага, че в тези области преобладава М-вариантът на иРНК за ChAT. Полуколичественият RT-PCR анализ потвърждава наличието на регионално специфичен експресионен профил. В стриатум авторите описват висока експресия на вариантите R1, R2 и R4, по-ниска експресия на R3 и най-слаба на N1. В продълговатия мозък, за разлика от стриатум, е отчетена почти еднаква експресия на N1, R3 и R4, както и по-висока експресия на R1 и R2. Не е амплифициран продукт, съответстващ на N2 варианта, което предполага липса или много ниско ниво на експресия на този вариант в изследваните структури.

Литературните данни, отнасящи се до експресията на сплайсинг вариантите в ENS, са ограничени предимно до имунохистохимична визуализация на pChAT в ентeралните сплетения на мишка, морско свинче, плъх, прасе, маймуна и човек. Тези морфологични методи осигуряват важна информация за локализацията на холинергичните неврони, но не позволяват количествена оценка на експресията на различните сплайсинг варианти. Ето защо е необходимо надграждане на морфологичния анализ чрез прилагане на молекулярно-генетични подходи, които да позволят количествено и възпроизводимо определяне на експресионния профил на ChAT в ENS. С помощта на специфичния софтуер за дизайн на праймери Primer-BLAST за целите на настоящето проучване са създадени прави (forward) и обратни (reverse) праймери насочени към R3, N1, N2, М, cChAT и pChAT сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT (Табл.1). При дизайна на праймерите са спазени основните параметри за ефективна PCR амплификация: температура на топене (T_m) в интервала 60–65 °C, както и GC съдържание, вариращо между 40% и 60% с цел осигуряване на специфичност и стабилност на хибридизацията. Флуоресцентно базираната PCR реакция е метод на избор за

измерване на ниско експресирани, алтернативно сплайсирани иРНК варианти. RT-PCR в реално време е чувствителен метод, позволяващ прецизно определяне нивата на генна експресия. За получаване на надеждни резултати, е важно да се приложи контрол и оптимизация при избора на праймери, процеса на обратно транскрибиране и условията на PCR реакцията. Създаването и валидирането на достоверни абсолютни или относителни стандарти е от изключителна важност. Един от начините да се изготвят стандарти е чрез използване на кръгови или линейни плазмиди, съдържащи уникални фрагменти от всеки сплайсинг вариант. Друг подход е използването на синтетични двойноверижни линейни ДНК фрагменти, съдържащи желаната последователност за всеки от сплайсинг вариантите и референтен фрагмент, за създаване на високо специфични стандарти за абсолютно количествено измерване. В настоящата работа като матрици за полимеразната верижна реакция са използвани *de novo* създадени двойноверижни gBlock генни фрагменти (gBlock-1 и gBlock-2) и плазмид pGEM-N, съдържащи специфични за сплайсинг вариантите нуклеотидни последователности. Всяка от матриците е използвана за валидиране на съответните праймерни двойки, предназначени за откриване на различните форми на сплайсинг вариантите. Поради високата степен на сходство в нуклеотидните последователности между различните сплайсинг варианти на иРНК за ChAT, разработването на специфичен и надежден метод за количествено измерване на тяхната експресия представлява сериозно предизвикателство. Това изисква внимателен и прецизен дизайн на праймерни двойки, насочени към уникални екзони за всеки вариант, както и допълнителна верификация на получените ампликони чрез електрофореза. Количественият PCR притежава редица предимства, включително висока чувствителност, специфичност и възпроизводимост, което го прави особено подходящ метод за анализ на експресията на сплайсинг вариантите. Методиката позволява прилагането на три подхода за количествено определяне на експресията на различните сплайсинг варианти на иРНК за ChAT: 1) използване на специфичен праймер или чифт праймери, насочени към уникални екзони или нуклеотидни последователности, характерни за даден сплайсинг вариант; 2) дизайн на праймери, хибридиращи в границите на екзон-екзон връзките с противоположен праймер в общ екзон; 3) използване на флуоресцентна сонда, хибридираща в границите на екзон-екзон връзките и общи праймери.

Използването на общи праймери в комбинация с уникални гранични сонди се счита за ненадежден подход, тъй като при ниски нива на експресия на даден алтернативен вариант и едновременно висока експресия на друг, коамплификацията на преобладаващия транскрипт чрез общите праймери може да възпрепятства точната и количествено достоверна детекция на слабо експресирания вариант. В случаите, когато поради висока хомоложност между отделните сплайсинг варианти не е възможно създаването на специфични праймери или праймерни двойки, се препоръчва използването на праймери, насочени към уникалните екзон-екзонни свързвания. Този подход е особено ефективен при значителни разлики в нивата на експресия между вариантите, тъй като повишава специфичността на амплификация и позволява надеждно разграничаване на отделните сплайсинг варианти.

В своето проучване Wong YW разработва методика за PCR в реално време за определяне нивата на експресия на трите сплайсинг форми на GFR α -2 – GFR α -2a, GFR α -2b и GFR α -2c, които се различават в своите 5'-некодиращи участъци. GFR α -2 е предпочитан рецептор за невротрофичния фактор неуртурин (NTN), участващ в протекцията на допаминергичните неврони. Поради високото сходство и липсата на уникални нуклеотидни последователности между трите варианта, авторите използват праймери, насочени към граничните области на екзон-екзонните връзки, с противоположен праймер в общ екзон. Валидираният по този начин метод е използван от Too HP за количествен анализ на експресията на GFR α -2 сплайсинг вариантите в мозък, тънко черво, бъбреци, черен дроб и тестиси на мишка. Поради липсата на уникални екзони в сплайсинг вариантите N2 и pChAT, изследвани в настоящото проучване, се наложи използването на гранични обратни праймери, съдържащи 5 нуклеотидни двойки, хибридиращи към специфичните екзон-екзонни връзки на съответните варианти. Този подход е доказано ефективен при откриването на алтернативни сплайсинг форми с висока степен на хомоложност, тъй като предотвратява неспецифичното амплифициране, дори при наличие на доминиращ основен транскрипт.

По отношение на R вариантите, в хода на експеримента не са създадени подходящи праймери за идентифициране на R2 варианта поради липса на уникални участъци за свързване на праймерите в сплайсинг варианта. Праймерите за вариантите R1 и R4 са избрани да хибридизират в екзон-екзонната връзка, но подобно на R2 варианта има голяма хомоложност с варианти R3, N1 и M. При тестване на създадените праймери за R1 и R4 вариантите с тест-матриците са получени амплификационни продукти, които отговарят на участъци от вариантите, с които R1 и R4 демонстрират висока хомоложност. От петте гранични нуклеотида в 5'-края на R1 варианта, само 3 са специфични, което обяснява получената неспецифична амплификация. Относно вариант R3, се създаде успешно специфична праймерна двойка. При тестване с матрицата gBlock-1 се получи амплификационен продукт с очакваната дължина от 149 bp. При последващо тестване с тъканни проби от експерименталните животни обаче се демонстрира амплификационен продукт с по-малък размер (~50 bp) и по-ниска температура на топене (T_m 72–73 °C) във всички изследвани отдели на ГИТ. Тези резултати не съответстват на данните от предварителния анализ с контролната ДНК матрица. Получените продукти са праймерни димери и тяхната амплификация се дължи на липсата на матрица, с която да хибридизират праймерите. Липсата на експресия на R вариантите в ENS на полово зрели мишки, наблюдавано в нашето проучване, корелира с липсата на експресия на тези сплайсинг варианти в кръвни клетки. Fujii и Ogawa съобщават за отсъствие на експресия на R сплайсинг варианта на иРНК на ензима ChAT в две Т-клетъчни линии – CEM и MOLT-3. В CEM клетките основните експресирани варианти са N2 и M, а в по-малка степен – N1, докато MOLT-3 клетките експресират единствено N2 варианта. Чрез RT-PCR се установява също и липса на експресия на иРНК, кодираща VACHT и в двете клетъчни линии. Тези резултати подкрепят хипотезата, че механизмите регулиращи експресията на иРНК на ChAT в Т-лимфоцитите, се различават съществено от тези в холинергичните неврони на

централната нервна система. За разлика от Т-лимфоцитите, в спиналните ганглии на 15-дневни Wistar плъхове наличието на иРНК за VACht и съответния протеин е потвърдено чрез RT-PCR и Western blot анализ. В отделно проучване при плъх Corsetti V и съавтори изследват експресията на двата основни холинергични маркера – ChAT и VACht в хода на развитие на спиналните ганглии. Авторите провеждат експресионен анализ на 18-ия ембрионален ден, както и на 2-рия, 15-ия и 60-ия постнатален ден. С помощта на селективни праймери те демонстрират експресията на няколко сплайсинг варианта на ChAT (R1, R2, N1, N2 и M) и на VACht (R1, R2, V1 и V2). Резултатите от qRT-PCR анализа показват прогресивно намаляване на експресията на всички изследвани сплайсинг варианти в хода на онтогенетичното развитие. Най-високи нива на експресия в ембрионалния период са установени за R1 и R2 вариантите, докато M-вариантът се открива единствено в ембрионалния период. N1 и N2 вариантите присъстват във всички анализирани възрастови групи, но техните нива значително намаляват след раждането. В контраст с тези резултати, Western blot анализът показва нарастваща експресия на ChAT и VACht протеините с възрастта. Разликата между експресионния профил на иРНК транскриптите и съответните им протеинови продукти предполага наличие на посттранскрипционно регулиране на двата холинергични маркера. Според авторите е възможно намалените нива на сплайсинг вариантите да представляват адаптивен механизъм за компенсиране на натрупването на съответните протеини, особено в сетивните неврони, където ACh не е основен медиатор.

В тестис на плъх са установени високи нива на два транскрипта на ChAT иРНК с приблизителна дължина съответно 3.5 kb и 1.3 kb. Проведеният Northern blot анализ с РНК от тестис, при който са използвани последователни фрагменти, обхващащи цялата кодираща област на cDNA за ензима показва идентичност в 5'-краищата на двата транскрипта. Въпреки това, по-късият транскрипт съдържа само първите 800 нуклеотида от кодиращата последователност, което изключва възможността той да кодира функционален ChAT протеин. Отново в тестис на плъх Lönnerberg P и съавтори, установяват експресия на късоверижния вариант на ензима, който няма холинацетилтрансферазна активност. Тези резултати показват, че тестисите при бозайниците не съдържат истински функционален ChAT ензим, но експресират по-къси варианти на ChAT, които вероятно изпълняват специфична функция, характерна за тестисите. Наличието на алтернативен сплайсинг вариант на иРНК за ChAT, при който липсва последователност, съответстваща на кодиращите екзони от 6 до 9 е описано за първи път при плъх. Yasunaga O и съавтори демонстрират експресията на късоверижния сплайсинг вариант в холинергични неврони в ganglion trigeminale и ganglion ciliare при плъх. В проведения амплификационен анализ с cDNA от striatum и ganglion pterygopalatinum, Tooyama използва три праймерни двойки, амплифициращи съответно 5'-края, средната част и 3'-края на cDNA на ензима. Електрофоретично те доказват наличие на продукт с очаквана дължина от 1935 bp (cChAT) в двете тъканни проби. В пробата от ganglion pterygopalatinum е открит и допълнителен продукт с по-малка дължина. Анализът на последователността на цялата кодираща област на получения продукт разкрива

липса на 630 нуклеотида от средната част на cDNA на ензима, като 5' и 3' фланговете са напълно идентични. Според геномната структура на ChAT при плъх, която включва 15 екзона, в този новооткрит вариант липсват екзони 6, 7, 8 и 9. Тъй като броят на липсващите нуклеотиди е точно кратен на 3, алтернативния сплайсинг на тези екзони запазва отворената четяща рамка. Продуктът от транслацията на този сплайсинг вариант има молекулно тегло от 49 kDa и е наречен периферен тип ChAT (pChAT), поради откриването му в структури извън централната нервна система. Особената структура на късоверижния вариант и наличието на сплайсинг връзка между екзон 5 и 10 позволяват на Тооуама и Kimura да създадат заешки антисерум, насочен срещу рекомбинантен пептид от 41 аминокиселини, обхващащ екзон-екзонната връзка. Този серум е използван в Western blot и имунохистохимичен анализ, които потвърждават, че периферният вариант е локализиран в телата и израстъците на неврони само в ganglion pterygopalatinum. За да докажат наличието на pChAT и в други периферни тъкани, авторите използват черва на плъх, прилагайки двойно оцветяване с антисерума за pChAT и хистохимично оцветяване с NADPH-диафораза. Резултатите ясно показват кафяви холинергични и сини NADPH-диафораза-позитивни неврони в ентералните сплетения на дуоденума и дебелото черво. Чрез флуоресцентно имунохистохимично изследване, Elnasharty и Shoeib идентифицират pChAT-имунореактивни неврони в ganglion trigeminale на морско свинче. Двойната имунохистохимична методика, визуализираща сетивните неврони в ganglion trigeminale доказва участието на периферната форма на ензима ChAT в болковата сетивност заедно с CGRP и субстанция Р. До откриването и визуализацията на pChAT от Тооуама и Kimura, различните изоформи на ChAT са оставали непознати.

ENS като основен дял на периферната нервна система е представена от неврони и техните израстъци, които експресират широко pChAT. В своя експеримент с морски свинчета Roberto Chiocchetti визуализира силна имунореактивност спрямо pChAT на IPANs невроните в субмукозното и миентералното нервно сплетение. Тези неврони са calbindin позитивни и демонстрират слаба имунопозитивност спрямо cChAT. Силна имунопозитивност спрямо cChAT в миентералното сплетение показват calretinin позитивните неврони, сред които са моторните неврони и интерневроните. Демонстрирайки различна имунопринадлежност на ентералните неврони Chiocchetti доказва, че двете сплайсинг форми на ензима ChAT са функционално различни и се използват от различни класове ентерални неврони. Невроните, които не показват реактивност за cChAT, основен ензим катализиращ синтеза на Ach в тях е късоверижната форма.

С помощта на създадения от Тооуама и Kimura антисерум за pChAT става възможно допълването на получените данни от ganglion pterygopalatinum с резултати от имунохистохимично проследяване на структури, положителни за pChAT по цялата дължина на ГИТ при плъх и морско свинче. За първи път Nakajima демонстрира присъствието на pChAT-положителни неврони и израстъци в миентералното и субмукозно сплетение от хранопровод до ректум. Прилаганото двойно оцветяване показва, че при плъх почти всички

имунопозитивни pChAT неврони демонстрират и хистохимична активност за AchE, но не и за NADPH-диафораза. В субмукозното сплетение в горните отдели на ГИТ при плъх авторите описват pChAT-положителните неврони с морфология на Dogiel I тип, докато в долните отдели положителните неврони са с морфология на Dogiel II тип. При морско свинче са описани неврони, притежаващи както pChAT, така и NADPH-диафоразна позитивност. Описани са единични неврони, положителни за AchE, но не и за pChAT. Резултатите от PCR експеримента с праймерна двойка, амплифицираща pChAT с дължина 124 bp, доказват присъствието на този сплайсинг вариант в ganglion pterygopalatinum и duodenum.

Нашият генетичен анализ потвърди експресията на сплайсинг варианта pChAT по хода на ГИТ, което е в съответствие с публикуваните литературни данни. Установената експресия на сплайсинг вариантите – M, cChAT и pChAT свидетелства за наличието на разнообразие от транскрипционни форми на ензима в ENS. Съпътстващата експресия на тези три изоформи предполага функционална хетерогенност на холинергичните неврони в ГИТ и вероятно различна роля на всяка от формите в регулацията на моторната и секреторната активност. Потвърждението на експресията на M варианта, доминиращ в структури на ЦНС при гризачи, подкрепя хипотезата за структурна и функционална припокриваемост между централната и ентералната холинергична инервация. Едновременното наличие на cChAT и pChAT подчертава необходимостта от по-задълбочено изследване на тяхната индивидуална регулаторна роля в условия на физиологично и патологично състояние.

В настоящото изследване за оценка на експресията на алтернативните сплайсинг варианти на ензима ChAT се прилага относителен количествен анализ чрез qPCR. Този подход позволява сравнение на нивата на експресия на таргетните гени спрямо стабилно експресиран вътрешен референтен ген, като по този начин се контролира евентуалната вариабилност в количеството и качеството на изходната РНК и ефективността на обратната транскрипция. Най-често използваният метод за относителна количествена оценка е $\Delta\Delta C_t$ методът (или методът на Livak и Schmittgen), при който се изчислява промените в експресията между различни експериментални условия или тъкани чрез сравнителен анализ на цикличните прагови стойности (C_t) на таргетния и референтния ген. За да бъде приложим този метод, PCR ефективностите на амплификацията при двата гена трябва да са сходни и близки до 100%, като допустимото отклонение не трябва да надвишава 5%.

Основните стъпки в приложението на $\Delta\Delta C_t$ метода включват:

1. Нормализиране на C_t стойностите на таргетния ген спрямо референтния ген (изчисляване на ΔC_t);
2. Сравнение на ΔC_t стойностите със съответна контролна проба (изчисляване на $\Delta\Delta C_t$);
3. Изчисляване на относителното количество на експресия чрез формулата $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

В случаите, когато амплификационните ефективности на таргетния и референтния ген се различават значително от 100%, за анализ се използва алтернативен подход, предложен от Pfaffl. Този метод отчита индивидуалните

PCR ефективности за всеки ген, като коригира резултатите съобразно тях. В настоящото изследване се използва именно формулата на Pfaffl, която позволява точно представяне на относителните нива на експресия на изследваните сплайсинг варианти. Този подход е приложим за сравнение на експресията на сплайсинг вариантите в различните отдели на ГИТ без необходимостта от абсолютното им количествено измерване. Това ни дава възможност да оценим тъканно-специфичните разлики в експресията на сплайсинг вариантите на ChAT в контекста на функционалните особености на отделните участъци от ГИТ. В хода на статистическия анализ успешно са детектирани трите сплайсинг варианта на ChAT (M, cChAT и pChAT) по хода на ГИТ на изследваните от нас мишки. Анализът на експресията показва, че M-вариантът се характеризира с относително постоянни нива във всички изследвани отдели, близки до тези в контролния орган (стомаха). Експресията на cChAT също е близка до контролата в проксималните сегменти на тънкото черво (дуоденум и йейунум), като в илеум се наблюдава леко повишение, докато в колон се отчита понижение на експресията на варианта. Най-съществено отклонение в експресионния профил се установява при pChAT – в дуоденум се регистрира значително по-ниска експресия, докато в йейунум се наблюдава изразено повишение с голямо стандартно отклонение, дължащо се на индивидуална вариабилност при едно от животните; в илеум и колон нивата остават междинни и сравнително близки помежду си. Характерно за M варианта и cChAT е, че най-голямо стандартно отклонение се отчита в дуоденум, което показва съществена междуиндивидуална вариабилност и предполага участие на локални регулаторни механизми или физиологични различия. Въпреки липсата на статистически значими разлики, резултатите очертават тенденция към намаляване експресията на вариантите по хода на ГИТ в дистална посока, най-отчетливо в дебелото черво. Тази тенденция може да има биологично значение, като отразява различната функционална роля на ENS в отделните сегменти. В проксималните отдели (дуоденум и йейунум) по-високата експресия на ChAT вероятно е свързана с по-интензивна холинергична регулация на моторната и секреторната активност, която е критична за началните етапи на храносмилането. От друга страна, понижената експресия в дисталните части на храносмилателния тракт, особено в колон, може да се интерпретира като отражение на различен модел на невронална регулация, при който в по-голяма степен участват алтернативни медиаторни системи (например серотонинергична или пептидергична сигнализация). Тези наблюдения подчертават необходимостта от бъдещи изследвания за уточняване на механизмите, свързани с наблюдаваната междуиндивидуална вариабилност и регионалните различия в експресията на ChAT сплайсинг вариантите.

V. Заключение

Ацетилхолинът е основен невромедиатор контролиращ разнообразни процеси както в соматичната така и в автономната нервна система. Холинергичната система има ключова роля в осъществяването на моторика, емоционално поведение, съвършени когнитивни процеси, като обучение и памет. Промените в холинергичната невротрансмисия на ниво ENS са асоциирани с функционални нарушения по хода на ГИТ, както и с невродегенеративни заболявания.

Надежден маркер за визуализация на холинергичните структури е ензима ChAT. Нови молекулярни подходи използвани за визуализиране на холинергичните структури използват сплайсинг вариантите на иРНК за ChAT, които се транскрибират от гена за холинацетилтрансфераза. Наличието на множество сплайсинг варианти на даден ген увеличава кодиращия потенциал на генома и функционалното разнообразие на синтезираните белтъци. Седем различни сплайсинг варианта на иРНК се транскрибират от 5'-некодиращия участък на мишия ген за ChAT – M, N1, N2, R1, R2, R3 и R4. Два варианта са резултат на алтернативен сплайсинг в 3'-кодиращия участък на мишия ген – cChAT и pChAT. Нашето проучване успя да детектира експресията на M, cChAT и pChAT вариантите на ензима в ENS по хода на мишия храносмилателен тракт.

Изучаването на сплайсинг вариантите на ензимите участващи в синтезата на ACh и опознаването на точните механизми, чрез които ENS се включва в патогенезата на заболяванията биха ускорили развитието на холинергични фармакологични и генни терапевтични подходи за тези състояния, които са свързани с холинергичен излишък или недостатъчност.

И накрая, въпреки че мишката не представлява напълно съвършен модел за изучаване на човешката биология, ние вярваме, че нашият подход базиран на използване на минимален брой експериментални животни в съчетание с наличните високоспецифични генетични ресурси представлява ефективна и етична стратегия за получаване на значими биомедицински знания.

VI. Изводи

В изпълнение на поставените задачи, свързани с реализирането на основната цел на дисертационния труд – а именно проследяване хистологичното устройство на стената на ГИТ и проучване експресията на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT са формулирани следните основни изводи:

1. Методът “Swiss roll” се утвърди като ефективен и оптимален подход за хистологично проучване на големи участъци по хода на мишия ГИТ. Техниката позволява представяне на хистологичните особености на стената на храносмилателния канал чрез поредица от напречни срезове в един хистологичен препарат, улеснявайки едновременно визуализацията и сравнителния анализ.
2. В хода на проведения генетичен анализ дизайнът на праймери за вариант R2 се оказва невъзможен поради високата му хомоложност с останалите R варианти и липсата на уникални участъци за свързване на праймерите в сплайсинг варианта. За вариантите R1 и R4 са създадени праймерни двойки, но поради голямото сходство в нуклеотидните последователности с вариант R3 (за R1) и R3, N1 и M (за R4) при контролните реакции на тези праймери с матриците отговарящи на хомоложните им варианти също се отчете амплификация, която доказва неспецифичността на генерираните праймери.
3. Създадените *de novo* праймерни двойки за откриване на сплайсинг вариантите M, cChAT и pChAT успешно амплифицират специфични PCR продукти с очакваната дължина. Резултатите от електрофоретичния анализ потвърждават специфичността на амплификационните криви, получени чрез qPCR. Установи се пълно съответствие между резултатите, получени със синтетични матрици (gBlock1 и gBlock2) и тези от реакциите с изолираната тъканна cDNA. При анализа на варианта R3, въпреки използваните специфични праймери, бяха получени единствено праймерни димери, което потвърждава отсъствието на този вариант в ENS на полово зрели мишки от породата C57Bl/6NCrl. Извършеният относителен количествен анализ на експресията на сплайсинг вариантите M, cChAT и pChAT в последователните сегменти на мишия ГИТ не показва статистически значими разлики в нивата на експресия. Това предполага относително равномерно разпределение на тези варианти по протежение на ENS. Неуспешната идентификация на N, и R-сплайсинг вариантите предполага, че те отсъстват или са с изключително ниска експресия в тъканите на ГИТ на полово зрели мишки, което контрастира с повишената им експресия в хода на ембрионалното развитие.

VII. Приноси

Приноси с оригинален характер

1. За първи път е извършен систематичен анализ на експресията на сплайсинг вариантите на ChAT във всички анатомични сегменти на ГИТ на мишка, чрез прилагане на молекулярно-генетични методи.
2. Потвърдена е експресията на общия вариант на ChAT (cChAT) в ENS, типично асоцииран с ЦНС, което разширява разбирането за локализацията и възможните функции на този вариант извън ЦНС.
3. Потвърдена е експресията на периферния сплайсинг вариант на ChAT (pChAT) в ENS в съответствие с неговата установена локализация в структури извън централната нервна система, като по този начин се допринася за утвърждаване на ENS като отделна холинергична система.

Приноси с приложен характер

1. Направен е оптимален дизайн на праймерни двойки за детекция на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT, при наличие на висока степен на сходство в нуклеотидната последователност между отделните варианти.
2. Оптимизиран е протокол за количествен qPCR анализ, включително условията на хибридизация, концентрацията на използваните праймери и количеството на ДНК матрицата, с цел постигане на висока чувствителност и специфичност на реакцията.
3. За първи път е създаден и верифициран qPCR протокол, специфично насочен към детекция на различните сплайсинг варианти на ChAT в ENS на мишка.
4. Създадена е Excel-базирана формула за автоматизирано изчисляване на *fold change*, която минимизира риска от грешки при ръчни изчисления. Този инструмент има приложен характер, тъй като улеснява обработката на експериментални данни и повишава точността на анализа.
5. Извършен е относителен количествен анализ на експресията на ChAT сплайсинг вариантите в ENS на мишка.

VIII. Бъдещи насоки и перспективи

Проследяването на експресионния профил на различните сплайсинг варианти на ChAT в ентeралната нервна система разкрива значим потенциал за задълбочаване на познанията относно холинергичната регулация в периферната нервна система. Резултатите от настоящото проучване поставят основата за бъдещи научни направления, които могат да допринесат за разработването на нови диагностични маркери и терапевтични подходи при заболявания, свързани с нарушена холинергична функция.

В тази връзка могат да бъдат формулирани следните научни насоки за продължаване на изследователската работа:

1. Разработване на нови праймерни двойки и/или оптимизиране на PCR условията за специфична амплификация на R сплайсинг вариантите на ChAT, с цел повишаване на чувствителността и специфичността на тяхната детекция.
2. Перспективно направление на бъдещи изследвания е изясняването на експресията на R- и N-сплайсинг вариантите по време на ембрионалното развитие на мишки, тъй като в настоящото проучване върху полово зрели животни тяхната експресия не беше установена.
3. Имунохистохимичен и *in situ* хибридационен анализ за локализация на ChAT сплайсинг вариантите на иРНК в последователните отдели на ГИТ, което ще даде по-точна представа за тяхната тъканна и клетъчна специфичност.
4. Потвърждаване на сплайсинг вариантите на протеиново ниво чрез Western blot анализ, позволяващ разграничаване на различните варианти на база молекулна маса или чрез специфични антитела.
5. Секвениране на PCR продуктите, с цел потвърждаване на изоформите и идентифициране на потенциално нови транскрипционни варианти на ChAT в ENS.

Осъществяването на посочените бъдещи насоки би допринесло за по-пълното разбиране на посттранскрипционната регулация на ChAT и ролята на ензима в нормалната и патологична функция на холинергичната сигнализация в ENS.

IX. Публикации, участия в научни форуми и научен проект във връзка с дисертационния труд

Публикации

1. **Marinova, D.**, Dobrev, M., Rashev, T., Gerasimov, I., Nankov, V., & Trifonov, S. (2022). Acetylcholine and its synthesizing enzyme choline acetyltransferase in the enteric nervous system. *Journal of IMAB*, 28(4), 4671–4675. <https://doi.org/10.5272/jimab.2022284.4671> ISSN: 1312-773X.
2. **Marinova, D.**, & Trifonov, S. (2024). Design of primers and optimization of PCR conditions for the detection of alternatively spliced isoforms of mouse ChAT mRNA. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 17, 95-105. ISSN: 1313-6917.
3. Glomus Coccygeum – anatomical overview. Diagnostic and therapeutic significance, **Desislava M. Marinova**, Tihomir R. Rashev, Lyubomira D. Angelova, Nikola Gizdashki, Stefan V. Trifonov, Двадесет и първа национална научна сесия за студенти и преподаватели „С визия към бъдещето”, посветена на 75-годишнината от създаването на МК към МУ – Плевен, 27-28.10.2023г. 978-954-756-324-7 (CD/DVD).

Участия

1. **Desislava M. Marinova**, S. Trifonov, T. Rashev, V. Nankov, I. Gerasimov, M. Dobrev. *In silico* PCR primer designing for specific identification of alternatively spliced isoform of ChAT mRNA in mice, Jubilee Scientific Conference, 31.10-02.11. 2019, Pleven.
2. **Desislava M. Marinova**, K. Velikov, M. Dobrev, T. Rashev, S. Trifonov. The “Swiss roll – a simple technique for histological visualization of the murine intestinal tract, XXV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, 28-30.05. 2021, Pleven.
3. **Desislava M. Marinova**, T. Rashev, S. Trifonov, Testing of primers and optimization of PCR for the detection of alternatively spliced variants of mouse ChAT mRNA, XXVI National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, 29.09-01.10. 2023, Sofia.
4. **Desislava M. Marinova**, C. Popov, T. Raschev, S. Trifonov, Diabetes-related alternations in the enteric nervous system, Jubilee Scientific Conference with International Participation, 1-3 November 2024, Pleven.

Проект № 25/2019 МУ – Плевен „Разработване и приложение на специфичен количествен PCR метод за измерване експресията на алтернативните сплайсинг варианти на иРНК за ензима холинацетилтрансфераза при мишка “.

Приложение 1

I. Real-time PCR – метод със стандартна крива

A. Изготвяне на стандартна крива за количествен анализ – необходимо е да се знае точният брой копия на стандарта. Извършва се 10-кратно серийно разреждане с крайни концентрации 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 .

Последователност на олигонуклеотида, използван като шаблон за изграждане на стандартната крива за количествения анализ:

gBl-1_ChAT, 699 bp

Начален работен разтвор $1 \text{ ng}/\mu\text{l} = 1 \times 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{l}$ от gBl-1.

1. Изчисляване масата на една молекула

$$m = \frac{\text{MW g/mol}}{6.023 \times 10^{23} \text{ molecules/mol}}$$

6.023×10^{23} – число на Авогадро

MW – молекулна маса на фрагмента в g/mol.

gBl-1 MW=431850.8 g/mol

$$m = \frac{431850.8 \text{ g/mol}}{6.023 \times 10^{23} \text{ molecules/mol}} = 7.170028225 \times 10^{-19} \text{ g/molecule}$$

2. Изчисляване масата на gBl-1 съдържаща броя копия от интерес от 1×10^6 до 1×10^2 копия.

Брой копия		Маса на gBl-1 (g)
1 000 000	$\times 7.170028225 \times 10^{-19}$	$7.170028225 \times 10^{-13}$
100 000		$7.170028225 \times 10^{-14}$
10 000		$7.170028225 \times 10^{-15}$
1 000		$7.170028225 \times 10^{-16}$
100		$7.170028225 \times 10^{-17}$

3. Изчисляване концентрацията на gBl-1, необходима за получаване на желан брой копия. Получената маса се разделя на обема, който ще бъде пипетиран във всяка реакция (2 μl).

Брой копия	Маса на gBl-1 (g)		Final concentration of gBl-1 (g/ μl)
1 000 000	$7.170028225 \times 10^{-13}$	$\div 2 \mu\text{l}$	$3.585014113 \times 10^{-13}$
100 000	$7.170028225 \times 10^{-14}$		$3.585014113 \times 10^{-14}$
10 000	$7.170028225 \times 10^{-15}$		$3.585014113 \times 10^{-15}$
1 000	$7.170028225 \times 10^{-16}$		$3.585014113 \times 10^{-16}$
100	$7.170028225 \times 10^{-17}$		$3.585014113 \times 10^{-17}$

4. Изготвяне на серийни разреждания на gBl-1.

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Разреждане #	Източник на gBl-1 за разреждането	Стартова концентрация (g/μl)	Обем на gBl-1 (μl)	Обем на разредител (μl)	Краен обем (μl)	Крайна концентрация (g/μl)	Брой копия gBl-1/2μl
S	stock	1.10^{-9}	1 μl	99μl dH ₂ O	100 μl	1×10^{-11}	NA
1	#S	1.10^{-11}	3.59 μl	96.41 μl TE buffer	100 μl	$3.585014113 \times 10^{-13}$	1×10^6
2	#1	3.59×10^{-13}	10 μl	90 μl TE buffer	100 μl	$3.585014113 \times 10^{-14}$	1×10^5
3	#2	3.59×10^{-14}	10 μl	90 μl TE buffer	100 μl	$3.585014113 \times 10^{-15}$	1×10^4
4	#3	3.59×10^{-15}	10 μl	90 μl TE buffer	100 μl	$3.585014113 \times 10^{-16}$	1×10^3
5	#4	3.59×10^{-16}	10 μl	90 μl TE buffer	100 μl	$3.585014113 \times 10^{-17}$	1×10^2

gBl-2_ChAT, 500 bp

Начален работен разтвор $1 \text{ ng}/\mu\text{l} = 1 \times 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{l}$ of gBl-2.

5. Изчисляване масата на една молекула

gBl-2 MW=308844.1.8 g/mol.

$$m = \frac{308844.1 \text{ g/mol}}{6.023 \times 10^{23} \text{ molecules/mol}} = 5.12774531 \times 10^{-19} \text{ g/molecule}$$

6. Изчисляване масата на gBl-2 съдържаща броя копия от интерес от 1×10^6 до 1×10^2 копия.

Брой копия	$\times 5.12774531 \times 10^{-19}$	Маса на gB-2 (g)
1 000 000		$5.12774531 \times 10^{-13}$
100 000		$5.12774531 \times 10^{-14}$
10 000		$5.12774531 \times 10^{-15}$
1 000		$5.12774531 \times 10^{-16}$
100		$5.12774531 \times 10^{-17}$

7. Изчисляване концентрацията на gBl-2, необходима за получаване на желания брой копия. Получената маса се разделя на обема, който ще бъде пипетиран във всяка реакция (2 µl).

Брой копия	Маса на gBl-2 (g)	÷ 2 µl	Final concentration of gBl-2 (g/µl)
1 000 000	$5.12774531 \times 10^{-13}$		$2.563872655 \times 10^{-13}$
100 000	$5.12774531 \times 10^{-14}$		$2.563872655 \times 10^{-14}$
10 000	$5.12774531 \times 10^{-15}$		$2.563872655 \times 10^{-15}$
1 000	$5.12774531 \times 10^{-16}$		$2.563872655 \times 10^{-16}$
100	$5.12774531 \times 10^{-17}$		$2.563872655 \times 10^{-17}$

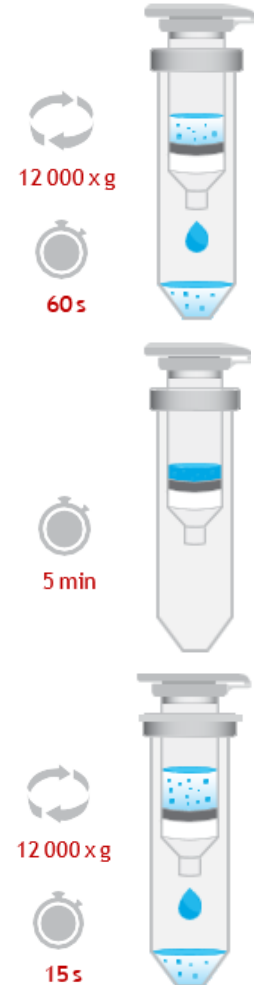
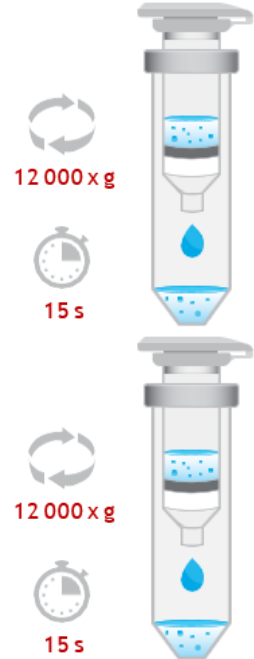
8. Изготвяне на серийни разреждания на gBl-2.

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Разреждане#	Източник на gBl-2 за разреждане то	Стартова концентрация (g/µl)	Обем gBl-2 (µl)	Обем на разредителя (µl)	Краен обем (µl)	Крайна концентрация (g/µl)	Брой копия gBl-2 /2µl
S	stock	1×10^{-9}	1 µl	99 µl dH ₂ O	100 µl	1.10^{-11}	NA
1	#S	1×10^{-11}	2.56 µl	97.44 µl TE buffer	100 µl	$2.563872655 \times 10^{-13}$	1×10^6
2	#1	2.56×10^{-13}	10 µl	90 µl TE buffer	100 µl	$2.563872655 \times 10^{-14}$	1×10^5
3	#2	2.56×10^{-14}	10 µl	90 µl TE buffer	100 µl	$2.563872655 \times 10^{-15}$	1×10^4
4	#3	2.56×10^{-15}	10 µl	90 µl TE buffer	100 µl	$2.563872655 \times 10^{-16}$	1×10^3
5	#4	2.56×10^{-16}	10 µl	90 µl TE buffer	100 µl	$2.563872655 \times 10^{-17}$	1×10^2

Приложение 2

Стъпка 1	
	Фрагментирания биологичен материал се постави в микроцентрифужна епруветка и се добави 600 μl RLysis Buffer и 20 μl Antifoam Reagent. Вортексира се за 60 сек.
Стъпка 2	
  	Центрофугира се за 120 сек. на 12000 x g.
Стъпка 3	
	Към супернатанта се добави 600 μl 70% етилов алкохол приготвен с 0,1 % DEPC третирана вода. Миксира се чрез вортексиране.
Стъпка 4	
  	700 μl от получения разтвор се прехвърли в РНК-колонка, поставена в събирателна центрофужна епруветка. Следва центрофугиране за 15 сек. на 12000 x g. Филтратът се отстрани, РНК-колонката и епруветката се използва отново. Същата процедура се повтори за оставащите 500 μl от лизата.

Стъпка 5	
	Третиране с ДНКаза. Започва се с предварително промиване с 500 μl RW2 Buffer и центрофугиране за 60 сек. на 12000 x g. За всяка изолирана проба се подготвят 90 μl 10x DNase I Reaction Buffer и 10 μl reconstituted DNase I. От така приготвеният разтвор се добавят 95 μl внимателно в центъра на колонката. Инкубира се за 5 мин. на стайна температура. Добави се 600 μl RW1 Buffer и се центрофугира за 15 сек. на 12000 x g.
Стъпка 6	
	Добави се 500 μl RW2 Buffer и се центрофугира за 15 сек. на 12000 x g. Стъпката се повтори след отстраняване на филтратата.

Стъпка 7	
	Центрофугира се за 90 сек. на 12000 x g, след което РНК-колонката се прехвърли внимателно в стерилна RNA free микроцентрифужна епруветка.
Стъпка 8	Елуиране
	Добави се 65µl RNA Elution Buffer и се центрофугира за 90 сек. на 12000 x g до получаване на пречистена РНК.