

**ПРОФИЛЬ И СОПРЯЖЁННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОБРАЗЦАХ СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ  
ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА У ПАЦИЕНТОВ С КОКСАРТРОЗОМ III СТАДИИ**Родионова Л.В.<sup>1,2</sup>, Леонова С.Н.<sup>1</sup>, Самойлова Л.Г.<sup>1</sup>, Небезина А.В.<sup>1</sup>(I Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия; <sup>2</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия)

**Резюме.** При лечении тяжёлых остеоартрозов широко применяется эндопротезирование, при выполнении которого возможен отбор образцов синовиальной оболочки для исследования. При остеоартрозе поражаются все компоненты, формирующие сустав. Однако если роль хрящевой ткани активно изучалась, то исследованию роли синовиальной оболочки не уделялось достаточного внимания. В связи с этим была поставлена цель исследования: выявить профиль экспрессии генов по содержанию транскриптов в интраоперационных образцах синовиальной ткани пациентов с остеоартрозом тазобедренного сустава III стадии. Во время операции тотального эндопротезирования тазобедренного сустава отбирали фрагменты синовиальной оболочки в раствор, предотвращающий гидролиз нуклеиновых кислот. После дегградации и гомогенизации полученных биоптатов выделяли РНК с ставили real-time ПЦР со специфичными праймерами. Определён профиль экспрессии выборки генов, участвующих в метаболизме соединительной ткани, в интраоперационно взятых 10 образцах синовиальной оболочки пациентов с остеоартрозом тазобедренного сустава III стадии. Наиболее активно в образцах синовиальной оболочки при коксартрозе экспрессируются следующие гены: FGFR1, PDGFA, NAA20, PDGFB, Dio1, ESR1, ESR2. Средний уровень экспрессии отмечен для CALCR, Dio2, AANAT, PTH2R, NAT2. Значительно меньше транскриптов в синовиальной ткани содержалось для генов FGFR3, Dio3, NAT1, PTH1R, GDF5. Данные проведённого корреляционного анализа свидетельствуют о тесной взаимосвязанности метаболических путей, в которых участвуют выбранные для исследования гены-кандидаты. Выявленная напряжённость сетевых взаимодействий свидетельствует о снижении метаболической «гибкости» процессов, протекающих в синовиальной ткани в условиях патологии.

**Ключевые слова:** синовиальная оболочка; остеоартроз; коксартроз; тотальное эндопротезирование тазобедренного сустава; ПЦР; экспрессия генов.

**PROFILE AND ASSOCIATION OF GENE EXPRESSION IN THE SAMPLES OF THE HIP JOINT  
SYNOVIAL MEMBRANE IN PATIENTS WITH COXARTHROSIS STAGE III-IV**Rodionova L.V.<sup>1,2</sup>, Leonova S.N.<sup>1</sup>, Samoilova L.G.<sup>1</sup>, Nevezhina A.V.<sup>1</sup>(Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia; <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia)

**Summary.** In the treatment of severe osteoarthritis, endoprosthesis replacement is widely used. This method makes it possible to select samples of synovial membrane for the research. In osteoarthritis, all components that form the joint are affected. However, if the role of cartilage tissue has been actively studied for many years, the study of the role of synovial membrane has not been given enough attention. In this regard, the aim of the study was to identify the gene expression profile by transcript content in intraoperative samples of synovial tissue of patients with stage III osteoarthritis of hip joint. During total hip replacement surgery, the fragments of synovial membrane were collected into solution that prevents hydrolysis of nucleic acids. After degradation and homogenization of the obtained biopsies, RNA was isolated using real time PCR with specific primers. The expression profile of a sample of genes involved in connective tissue metabolism in intraoperatively taken 10 samples of synovial membrane of patients with stage III osteoarthritis of hip joint was determined. The following genes are most actively expressed in the samples of synovial membrane in osteoarthritis of hip joint: FGFR1, PDGFA, NAA20, PDGFB, Dio1, ESR1, ESR2. The average expression level was registered for CALCR, Dio2, AANAT, PTH2R, NAT2. Significantly fewer transcripts in the synovial tissue were kept for the FGFR3 gene, Dio3, NAT1, PTH1R, and GDF5. The data of the correlation analysis indicates the close interconnection of metabolic pathways which include selected candidate genes. Identified tension of a network interactions indicates a decline in metabolic “flexibility” processes in the synovial tissue in terms of pathology.

**Key words:** synovial membrane; osteoarthritis; coxarthrosis; total hip replacement; PCR; gene expression.

Остеоартроз – одно из самых распространённых и социально значимых заболеваний опорно-двигательного аппарата, при котором поражаются все компоненты, формирующие сустав. Однако при активном изучении хрящевой ткани довольно долго игнорировалось исследование других структур, в частности синовиальной оболочки. В настоящее время известно, что патология синовиальной ткани может способствовать усилению боли и дегградации хряща, показано, что синовиопатия коррелирует со степенью разрушения хрящевых структур сустава [6]. Роль синовиита в патофизиологии и выраженности клинических симптомов не подвергается сомнению [7].

Традиционные патоморфологические методы исследования часто дают противоречивые и вызывающие трудности в интерпретации результаты. Так, при одинаковой рентгенологически верифицированной стадии заболевания может быть обнаружена значительная вариативность структуры синовиальной оболочки. Кроме того, гетерогенность остеоартроза на структурном уровне проявляется в том, что часто наблюдается несо-

ответствие между стадией остеоартроза и ожидаемой морфологической картиной [3].

В последние десятилетия с внедрением новых лабораторных технологий с использованием полимеразной цепной реакции стало возможным получение новой ценной информации для уточнения патогенеза различных заболеваний. Определение профиля экспрессии различных генов, принимающих участие в метаболизме тканевых структур, формирующих патологический очаг, может выявить потенциально критические моменты, связанные с формированием осложнений, а также дать ценную информацию для анализа молекулярных механизмов патогенеза. При лечении тяжёлых остеоартрозов широкое развитие получило эндопротезирование, при выполнении которого возможен отбор образцов синовиальной оболочки для исследования.

Цель исследования: Выявить профиль экспрессии генов по содержанию транскриптов в интраоперационных образцах синовиальной ткани пациентов с остеоартрозом тазобедренного сустава III стадии.

**Материалы и методы**

Исследования были проведены у 10 пациентов с остеоартрозом тазобедренного сустава III стадии (мужчин – 6, женщин – 4), средний возраст 58,3±10,61 года (от 42 до 71 года). Всем пациентам выполнялась операция: эндопротезирование тазобедренного сустава конструкцией «ЭСИ». Забор образца синовиальной оболочки у пациентов выполнялся во время операции эндопротезирования.

Все лица, участвующие в исследовании, в соответствии с законами РФ подписали необходимые документы о добровольном информированном согласии на медицинское вмешательство и публикацию полученных данных (без идентификации личности). Исследование одобрено комитетом по этике ИНИЦХТ.

Интраоперационно в раствор, предотвращающий гидролиз нуклеиновых кислот, отбирали биоптаты синовиальной оболочки тазобедренного сустава с последующим замораживанием в жидком азоте до момента выделения РНК. Замороженные с помощью жидкого азота образцы деградировали, гомогенизировали и выделяли общую РНК реагентами фирмы Promega (США). Затем проводили обратную транскрипцию (Promega) и с кДНК ставили real time ПЦР (Promega; CFX96, Biorad) со специфичными праймерами (RealTimePrimers.com) для выбранных генов-кандидатов, предположительно участвующих в метаболизме соединительной ткани. Контроль специфичности проводили по кривым плавления ампликонов. В качестве генов домашнего хозяйства применяли ACTB (Actin beta), GADP (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), RPL13A (Ribosomal protein L13a). Для стандартизации использовали оказавшийся наименее вариабельным для этих образцов GADP.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10 (№ лицензии AXAR402G263414FA-V), различия считали значимыми при  $p < 0,05$ , корреляцию оценивали по Спирмену.

**Результаты и обсуждение**

В ткани синовиальной оболочки на момент проведения оперативного вмешательства выявлены различные количества матричной РНК исследуемых генов. Данные представлены в порядке убывания на рис. 1. Весь диапазон полученных значений был разбит на три равных

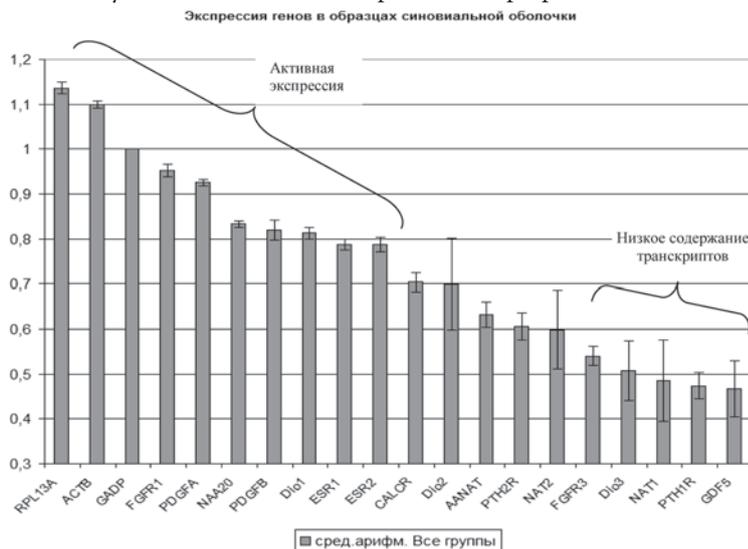


Рис. 1. Экспрессия генов в образцах синовиальной оболочки пациентов с коксартрозом III стадии, выраженная в кратных величинах к экспрессии GADP в качестве гена «домашнего хозяйства».

отрезка, соответствующих активной (кратность C(t) соответствующей величине GADP = 1–1,38), средней (1,39–1,76) и низкой экспрессии (1,77–2,14).

Наиболее активно в образцах синовиальной оболочки больных с остеоартрозом тазобедренного сустава III стадии экспрессируются следующие гены: FGFR1, PDGFA, NAA20, PDGFB, Dio1, ESR1, ESR2. Средний уровень экспрессии отмечен для CALCR, Dio2, ANAT, PTH2R, NAT2. Значительно меньше транскриптов в синовиальной ткани содержалось для генов FGFR3, Dio3, NAT1, PTH1R, GDF5.

Тот факт, что ген FGFR1 «работал» в среднем в 1,76 раза активнее в синовиальной оболочке пациентов с

Доля ошибки от среднего значения экспрессии генов

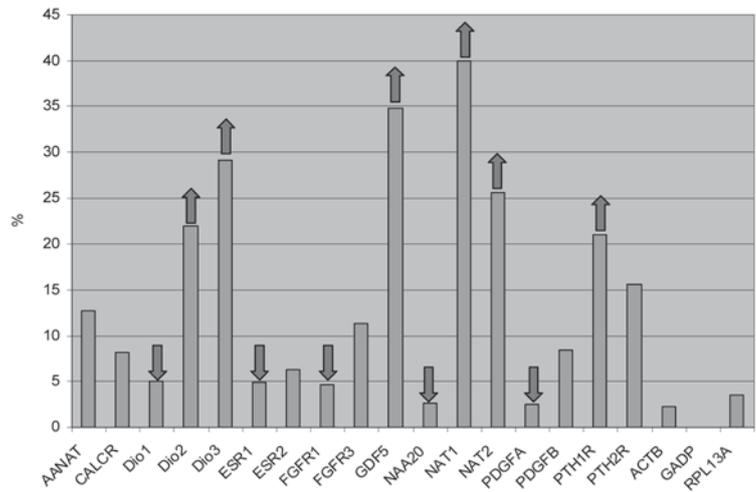


Рис. 2. Вариативность экспрессии генов в образцах синовиальной оболочки пациентов с коксартрозом III стадии, в процентах от среднего значения.

коксартрозом по сравнению с FGFR3 (1,05±0,02 против 1,85±0,07), может свидетельствовать о том, что наибольшее количество в синовиальной ткани содержится рецепторов к фактору роста фибробластов 1 типа (FGFR1). Тромбоцитарный фактор роста как альфа-, так и бета-полипептиды синтезировались активно с некоторым преобладанием альфа-формы (1,08±0,01 PDGFA против 1,22±0,03 PDGFB). Интересно отметить активное считывание генов рецепторов к эстрадиолу (ESR1 и ESR2). Очевидно это связано с выраженностью воспалительных реакций, поскольку недавно обнаружено, что половые гормоны играют активную роль в процессах воспаления, причём если андрогены являются противовоспалительными, то эстрогены обладают как про-, так и противовоспалительным действием [5].

Наибольший процент внутригрупповой вариации выявлен для экспрессии NAT1, GDF5, Dio3, NAT2, Dio2 и PTH1R (в порядке убывания) (рис. 2). Наименьшая ошибка наблюдалась (не считая гены «домашнего хозяйства») для PDGFA, NAA20, FGFR1, ESR1 и Dio1. Очевидно, что большой разброс данных экспрессии генов может быть связан с гетерогенностью тканевых субстратов и вариантов адаптивных реакций у каждого конкретного пациента.

При проведении корреляционного анализа из 190 возможных связей статистически значимыми оказались 86 (45,3%), что может свидетельствовать о тесной взаимосвязанности метаболических путей, в которых участвуют выбранные гены-кандидаты. Напряжённость сетевых взаимодействий подтверждается также тем, что подавляющее большинство из выявленных коррелятивных связей были по-

ложительными (95,3%). Считается, что наличие отрицательных связей свидетельствует о большей метаболической гибкости [2].

Таким образом, при рассмотрении взаимосвязей между изучаемыми параметрами обращает на себя внимание большое количество связей и то, что среди всех значимых взаимосвязей большая их часть – положительные, то есть связанные параметры возрастают или уменьшаются однонаправленно. В соответствии с существующим подходом к интерпретации корреляционных взаимоотношений это обстоятельство может свидетельствовать о неблагоприятных условиях функционирования клетки как единой системы, не имеющей возможности выбора вариантов работы своих подсистем [1,4].

Наиболее активно в образцах синовиальной оболочки больных с остеоартрозом тазобедренного сустава III стадии экспрессируются следующие гены: FGFR1, PDGFA, NAA20, PDGFB, Dio1, ESR1, ESR2. Средний уровень экспрессии отмечен для CALCR, Dio2, AANAT, PTH2R, NAT2. Значительно меньше транскриптов в синовиальной ткани содержалось для генов FGFR3, Dio3, NAT1, PTH1R, GDF5.

Данные корреляционного анализа свидетельствуют о тесной взаимосвязанности метаболических путей, в которых участвуют выбранные для исследования гены-кандидаты. Выявленная напряженность сетевых

взаимодействий свидетельствует о снижении метаболической «гибкости» процессов, протекающих в синовиальной ткани в условиях патологии.

Изучение экспрессии генов-кандидатов, принимающих участие в метаболизме тканевых структур, формирующих патологический очаг, выявление их взаимосвязей и взаимообусловленности, может выявить потенциально критические моменты, связанные с формированием осложнений.

Выявление и анализ профилей экспрессии генов по содержанию транскриптов в интраоперационных образцах синовиальной ткани пациентов с коксартрозом может дать ценную информацию для анализа молекулярных механизмов патогенеза.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Прозрачность исследования.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Исследователи несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

**Декларация о финансовых и иных взаимодействиях.** Авторы принимали участие в разработке концепции и дизайне исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

**Работа поступила в редакцию:** 22.07.2018 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев В.А. Корреляционная связь ферментов лейкоцитов в норме и при действии токсических факторов // Лабораторное дело. 1984. №8. С.465-468.
2. Булыгин Г.В., Камзалакова Н.И., Андрейчиков А.В. Метаболические основы регуляции иммунного ответа. Новосибирск, 1999. 346 с.3. Корочина К.В., Чернышева Т.В., Корочина И.Э. и др. Патогистологические особенности синовиальной оболочки пациентов с гонартрозом поздних стадий // Оренбургский медицинский вестник. 2017. Т. V. №3. С.15-18.
4. Соколов В.В., Нарциссов Р.П., Иванова Л.А. Цитохимия ферментов в профпатологии. М., 1975. 244 с.
5. Capellino S., Straub R.H., Cutolo M. Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes // Ann. N.-Y. Acad. Sci. 2014. Vol. 1317. P.24-31. DOI: 10.1111/nyas.12398.
6. Lugo L., Villalvilla A., Gómez R., et al. Effects of PTH [1-34] on synoviothy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis // Osteoarthritis Cartilage. 2012. Vol. 20. №12. P.1619-1630. DOI: 10.1016/j.joca.2012.08.010.
7. Sellam J., Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis // Nat. Rev. Rheumatol. 2010. Vol. 6. P.625-635.

## REFERENCES

1. Aliyev V.A. Correlation between leukocyte enzymes in normal conditions and under toxicological effect // Laboratornoe delo. 1984. №8. P.465-468. (in Russian)
2. Bulygin G.V., Kamzalakova N.I., Andreychikov A.V. Metabolic basis of immune response regulation. Novosibirsk, 1999. 346 p. (in Russian)3. Korochina K.V., Chernysheva T.V., Korochina I.E., et al. Pathological peculiarities of synovial membrane in patients with gonarthrosis at advanced stages // Orenburgskiy meditsinskiy vestnik. 2017. Vol. 5. №3. P.15-18. (in Russian)
4. Sokolov V.V., Nartsisov R.P., Ivanova L.A. Cytochemistry of enzymes in occupational pathology. Moscow, 1975. 244 p. (in Russian)
5. Capellino S., Straub R.H., Cutolo M. Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes // Ann. N.-Y. Acad. Sci. 2014. Vol. 1317. P.24-31. DOI: 10.1111/nyas.12398.
6. Lugo L., Villalvilla A., Gómez R., et al. Effects of PTH [1-34] on synoviothy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis // Osteoarthritis Cartilage. 2012. Vol. 20. №12. P.1619-1630. DOI: 10.1016/j.joca.2012.08.010.
7. Sellam J., Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis // Nat. Rev. Rheumatol. 2010. Vol. 6. P.625-635.

## Информация об авторах:

Родионова Любовь Викторовна – к.б.н., заведующая лабораторией клеточной патофизиологии и биохимии научно-лабораторного отдела ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (664049, г. Иркутск, Юбилейный, 64/1, каб. 205; e-mail: greidmacho@yandex.ru); Леонова Светлана Николаевна – д.м.н., ведущий научный сотрудник научно-клинического отдела травматологии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: svetlana.leonova.1963@mail.ru; тел. (3952) 290-350); Самойлова Лилия Григорьевна – младший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии научно-лабораторного отдела ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664049, г. Иркутск, Юбилейный, 64/1, каб. 219; e-mail: popovalg@mail.ru); Небезина Анна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии научно-лабораторного отдела ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» 664049, г. Иркутск, Юбилейный, 64/1, каб. 219; e-mail: manulus\_vius@mail.ru).

## Information About the Authors

Rodionova Lyubov V. – Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry of the Scientific Laboratory Department of Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, Teaching Assistant at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (664049, Irkutsk, Yubileyniy, 64/1, room 205; e-mail: greidmacho@yandex.ru); Leonova Svetlana N. – MD, PhD, DSc (Medicine), Leading Research Officer at the Scientific Clinical Department of Traumatology of Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1; e-mail: svetlana.leonova.1963@mail.ru; tel. (3952) 290-350); Samoylova Liliya G. – Junior Research Officer at the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry of the Scientific Laboratory Department of Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664049, Irkutsk, Yubileyniy, 64/1, room 219; e-mail: popovalg@mail.ru); Nevezhina Anna V. – Junior Research Officer at the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry of the Scientific Laboratory Department of Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664049, Irkutsk, Yubileyniy, 64/1, room 219; e-mail: manulus\_vius@mail.ru).