

И.В. Коктыш¹, П.Т. Журко¹, Р.М. Смолякова¹, В.Т. Коктыш², О.М. Липницкий²¹*Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова БГУ
Белорусского государственного университета, Минск*²*Учреждение здравоохранения «11-ая городская клиническая больница», Минск, Беларусь
drkoktysz@gmail.com*

Изучена экспрессия циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в плазме периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с деформирующими заболеваниями суставов. Выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости и let-7e в периферической крови пациентов с остеоартритами ($p < 0,05$). Определено участие let-7e в формировании метаболического синдрома, осложняющего течение основного заболевания опорно-двигательного аппарата. Найдена связь степени тяжести заболевания с особенностями уровней экспрессии циркулирующих в периферической крови и синовиальной жидкости miR-140 и let-7e.

Ключевые слова: остеоартрит, метаболический синдром, биомаркер, микроРНК, синовиальная жидкость, периферическая кровь, прогноз течения.

Остеоартрит (ОА), или деформирующий ОА – дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, характеризующееся выраженным болевым синдромом, ограничением подвижности и приводящее в большинстве случаев к инвалидности при несвоевременной диагностике и некорректном лечении. Считается, что ОА наиболее распространен в основном среди лиц пожилого возраста, однако в настоящее время данная форма патологии суставов все чаще встречается у молодых людей. Заболеваемость ОА продолжает расти, поражая миллионы людей, и становясь одним из самых распространенных хронических расстройств здоровья во всем мире, в том числе и в Республике Беларусь. Существует предположение, что такая тенденция может быть связана с увеличением продолжительности жизни людей в развитых странах [1,2].

Около 50% случаев ОА связаны с генетическим фактором риска, остальные 50% обусловлены другими причинами [1], среди которых к наиболее значимым факторам риска ОА относят ожирение и нарушение обмена веществ, что подтверждается ростом заболеваемости ОА во всем мире на фоне увеличения числа лиц с лишней массой тела и ожирением [3]. Кроме того, ожирение тесно ассоциировано не только с фактом наличия ОА, но и с его прогрессией, а некоторые авторы предполагают участие адипокинов в формировании болевого синдрома и последующей инвалидизации [4]. Следует отметить, что выраженный болевой синдром при ОА приводит к снижению физической активности пациентов и выраженной гиподинамии, что в свою очередь усиливает выраженность метаболических нарушений, в том числе способствуя увеличению массы тела пациентов. Таким образом, формируется «порочный круг» [2].

Становится очевидной необходимость изучения молекулярных механизмов патогенеза, а также усовершенствования диагностическим мероприятий ОА. Особое место среди биомаркеров ОА, позволяющих осуществлять раннюю диагностику и прогноз ОА, занимают микроРНК [1, 5]. Несмотря на то, что микроРНК не кодируют белки, они регулируют уровень экспрессии генов [1]. МикроРНК вызывают особый интерес у исследователей из различных областей биологии и медицины благодаря консервативности их структуры и вероятности определения взаимосвязи патологических процессов через изучение микроРНК [5].

Определение уровня экспрессии микроРНК может быть использовано для ранней диагностики ОА, оценки степени тяжести течения и прогноза заболевания. Полученные результаты могут стать основой для дальнейшего изучения патофизиологических связей заболеваний опорно-двигательного аппарата с другими патологическими состояниями. Например, установлено, что miR-22, miR-103, miR-25, miR-337 и miR-29a коррелируют с индексом массы тела, что предполагает потенциальную роль этих микроРНК в метаболизме липидов и развитии ОА. Однако точных данных, описывающих связь метаболического синдрома (МС) и деформирующих заболеваний су-

ставов на молекулярно-генетическом уровне до сих пор нет. Активное изучение связи метаболических особенностей индивидуума и формирования ОА делает возможным открытие биомаркеров ОА [1].

miR-140 – основная микроРНК, принимающая участие в процессах хондрогенеза. Предполагается что уровни экспрессии miR-140-5p и -3p хондроцитами значительно снижаются в случае формирования ОА [6]. Дефицит miR-140, в свою очередь, ускоряет дифференцировку хондроцитов в гипертрофические, ингибирует дифференцировку покоящихся хондроцитов в столбчатые пролиферирующие хондроциты, а также способствует аномальной экспрессии генов во время развития ОА.

Потенциальным прогностическим маркером тяжести коксартроза и гонартроза на фоне метаболического синдрома может стать микроРНК let-7e. Известно, что повышенная экспрессия let-7e ассоциирована с уровнем липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, повышенными значениями артериального давления и количеством симптомов при МС. Кроме того, предполагается участие let-7e в регуляции активности инсулина и связь уровня ее экспрессии с тяжестью ОА коленного и тазобедренного суставов [5, 7].

Цель исследования – установить особенности экспрессии циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в синовиальной жидкости и плазме крови пациентов с деформирующими заболеваниями суставов, ассоциированных с МС.

Материалы и методы исследования. С информированного согласия исследуемую группу составили 17 пациентов с ОА, осложненными МС, подвергавшихся артроскопии или тотальному эндопротезированию суставов (в том числе 13 женщин, 4 мужчины; возраст 60,0 [55,0;67,0]). Из них 11 пациентов с гонартрозом (в том числе 8 женщин, 3 мужчины; возраст 57,0 [51,0;67,0]) и 6 – с коксартрозом (в том числе 5 женщин, 1 мужчина; возраст 64,5 [60,0;69,0]). 7 пациентов с отсутствием рентгенологических и клинических признаков ОА и МС, также перенесших оперативное вмешательство на суставах, составили группу сравнения (в том числе 4 женщины, 3 мужчины; возраст 49,0 [26,0;57,0]).

Объект исследования: периферическая кровь и синовиальная жидкость. Забор исследуемого материала проводился во время оперативного вмешательства. Результаты общеклинических, биохимических исследований мочи и крови, а также коагулограммы получены сотрудниками клинико-диагностической лаборатории Учреждения здравоохранения «11-я городская клиническая больница» г. Минска.

Для оценки уровня экспрессии изучаемых микроРНК в биологических жидкостях пациентов с ОА использовался адаптированный нами протокол молекулярно-генетического исследования («miRNeasy Serum / Plasma Kit», Qiagen, Германия): микроРНК определялась в двухшаговой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первый этап – этап обратной транскрипции (miRCURY LNA RT Kit, Qiagen, Германия), второй – ПЦР в режиме реального времени (miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Германия). Исследовались циркулирующие микроРНК: hsa-miR-140-5p (MIMAT0000431) и hsa-let-7e-5p (MIMAT0000066). Полученные значения Ct нормализовались по Ct малой ядерной РНК U6. Для оценки уровней экспрессии микроРНК был использован метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Полученные результаты лабораторных исследований биологических жидкостей пациентов обеих групп были проанализированы с помощью непараметрических методов статистического анализа программы «Statistica 8.0». Критический уровень значимости p нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Изучена экспрессия циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в плазме периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с деформирующими заболеваниями суставов, ассоциированных с метаболическим синдромом (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Анализ экспрессии циркулирующих miR-140 и let7-е в периферической крови у пациентов с ОА и группы сравнения

Клинический диагноз / группа	ΔC_T (miR-140)	ΔC_T (let-7e)	$\Delta\Delta C_T$ (miR-140)	$\Delta\Delta C_T$ (let-7e)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (miR-140)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (let-7e)
ОА	19,50 [19,19; 20,57]	17,57 [16,99; 17,94]	16,64 [3,56; 19,40]	16,32 [1,85; 17,66] *p=0,03 (U)	0,03 [0,00; 1,00]	0,00 [0,00; 0,28] *p=0,03 (U)
Группа сравнения	20,74 [19,86; 21,36]	17,46 [17,27; 17,74]	1,42 [-0,40; 10,32]	0,86 [-0,62; 1,94]	0,46 [0,09; 1,54]	0,55 [0,26; 1,54]

Примечание: указаны медианы и процентиля [25%; 75%], * – U-критерий Манна-Уитни, ΔC_T – коэффициент нормализации микроРНК, $\Delta\Delta C_T$ – разница коэффициентов нормализации, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ – кратность изменения уровня экспрессии гена (относительная экспрессия).

Таблица 2 – Анализ экспрессии циркулирующих miR-140 и let7-е в синовиальной жидкости пациентов с коксартрозом и группы сравнения

Клинический диагноз / группа	ΔC_T (miR-140)	ΔC_T (let-7e)	$\Delta\Delta C_T$ (miR-140)	$\Delta\Delta C_T$ (let-7e)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (miR-140)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (let-7e)
Коксартроз	15,36** [15,28; 17,37] *p=0,04 (Z)	13,82 [13,69; 13,83]	-3,19 ** [-3,27; 1,18] *p=0,04 (Z)	-1,73 [-1,86; -1,72]	9,13 [2,27; 9,65] *p=0,04 (Z)	3,32 [3,29; 3,63]
Группа сравнения	19,17 [18,85; 20,46]	16,07 [15,73; 16,55]	0,62 [0,30; 1,92]	0,52 [0,18; 1,00]	0,65 [0,26; 0,81]	0,70 [0,50; 0,88]

Примечание: указаны медианы и процентиля [25%; 75%], * – Z-критерий Вальда-Вольфовица, ΔC_T – коэффициент нормализации микроРНК, $\Delta\Delta C_T$ – разница коэффициентов нормализации, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ – кратность изменения уровня экспрессии гена (относительная экспрессия).

Анализ данных молекулярно-генетического исследования плазмы пациентов с деформирующими заболеваниями суставов не выявил статистически значимых изменений в отношении экспрессии miR-140 по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения (таблица 1). Считается, что miR-140 необходим для адипогенеза и его пониженные уровни могут быть обнаружены в плазме периферической крови пациентов с патологическим ожирением, подтверждая участие miR-140 в метаболических процессах и ожирении, основных участниках развития ОА [8].

Установлено статистически значимое снижение относительной экспрессии циркулирующей микроРНК let-7e в периферической крови в группе пациентов с ОА (p=0,03, таблица 1). Результаты особенностей экспрессии let-7e в периферической крови при наличии деформации суставов могут быть ассоциированы с МС и сопутствующим ОА, что косвенно свидетельствует об участии let-7 в формировании и развитии системного воспаления и ОА в целом.

В синовиальной жидкости пациентов с ОА обнаружено статистически значимое снижение уровня экспрессии микроРНК miR-140 (p=0,03), коррелирующее со степенью активности заболевания (Rs=-0,65, p=0,02, рисунок 1).

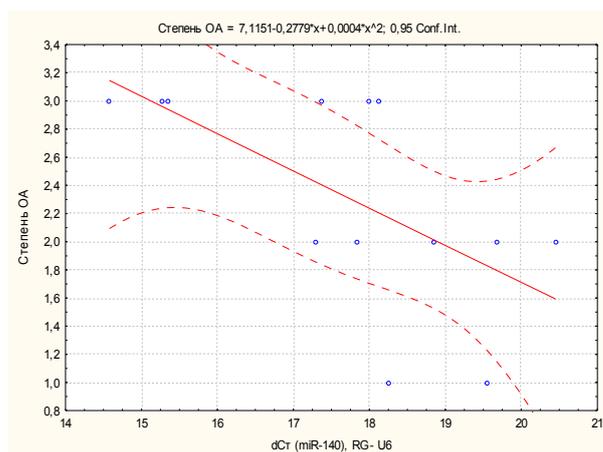


Рисунок 1. – Взаимосвязь уровня экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости со степенью активности заболевания у пациентов с ОА.

Выявлена тенденция к увеличению кратности изменения экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости исследуемой группы пациентов относительно группы сравнения ($p=0,08$). Кроме того, у пациентов с коксартрозом найдено статистически значимое более чем пятикратное подавление экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости ($p=0,03$, таблица 2). При этом исследование синовиальной жидкости пациентов с ОА, осложненными МС, на предмет особенностей экспрессии let-7e статистически значимых различий не показало.

Описывается ассоциация let-7e с развитием тяжелого течения при ОА: снижение экспрессии let-7e указывает на высокую вероятность артропластики [9,10]. Нами также выявлена статистически значимая умеренная обратная корреляционная связь между уровнем экспрессии let-7e в синовиальной жидкости и степенью активности деформирующего заболевания суставов ($R_s=-0,53$, $p=0,03$, рисунок 2).

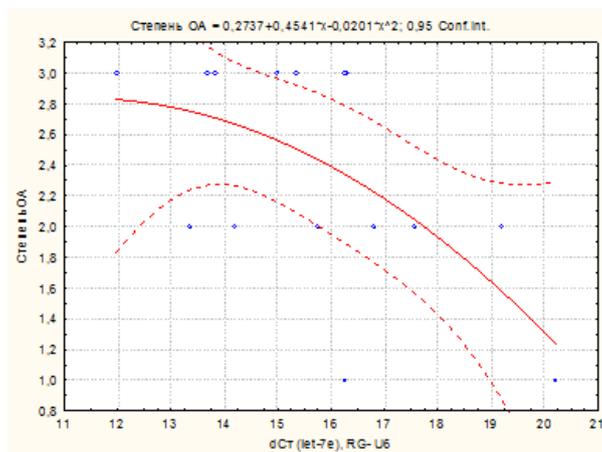


Рисунок 2. – Взаимосвязь уровня экспрессии let-7e в синовиальной жидкости пациентов со степенью активности заболевания при ОА

Клинико-лабораторные исследования периферической крови пациентов с ОА, осложненными МС, показали изменения, характерные для воспалительного процесса, среди которых отмечено статистически значимое увеличение количества лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов ($p<0,05$, соответственно).

Установлена прямая сильная статистически значимая связь между уровнем экспрессии miR-140 и количеством нейтрофилов ($R_s=0,9$, $p<0,05$) в периферической крови у пациентов с гонартрозом, а коэффициент нормализации let-7e прямо коррелировал с относительным количеством моноцитов ($R_s=0,7$, $p<0,05$) и обратно – со средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах ($R_s=-0,8$, $p<0,05$). Кроме того, у пациентов с коксартрозом установлена прямая корреляция между уровнем экспрессии miR-140 в плазме и средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах ($R_s=0,9$,

$p < 0,05$) и обратная – между относительным изменением экспрессии let-7e и средним содержанием гемоглобина в эритроците ($R_s = -0,9$, $p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, развитие остеоартрита сопровождается снижением уровня экспрессии микроРНК miR-140 в синовиальной жидкости, коррелирующее со степенью активности заболевания. Для пациентов с остеоартритами характерно снижение относительной экспрессии циркулирующей микроРНК let-7e в периферической крови, связанное со степенью тяжести деформирующих изменений в суставах.

Полученные результаты могут быть использованы в практической медицине (в ревматологии и ортопедии) для ранней диагностики остеоартритов, оценки степени тяжести течения и прогноза заболевания, а также для прогнозирования необходимости эндопротезирования суставов.

Список использованных источников

1. Kapoor, M. osteoarthritis: pathogenesis, diagnosis, available treatments, drug safety, regenerative and precision medicine / М. Kapoor, N.N. Mahomed. – Switzerland : Springer International, 2015. – 283 p.
2. Васильева, Л.В. Влияние метаболического синдрома на клиническую картину остеоартроза / Л.В. Васильева, Д.И. Лахин // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 8–10.
3. Fatty acids and osteoarthritis: different types, different effects / L. Marieke [et al.] // Joint Bone Spine. – 2019. – Vol. 86, № 4. – P. 451–458.
4. Differential involvement of synovial adipokines in pain and physical function in female patients with knee osteoarthritis. A cross-sectional study / J. Calvet [et al.] // Osteoarthritis and Cartilage. – 2018. – Vol. 26. – P. 276–284.
5. Yu Y. Modulated autophagy by microRNAs in osteoarthritis chondrocytes / Y.Yu, J. Zhao // Bio-med Res Int. – 2019. – Vol. 2019. – DOI: 10.1155/2019/1484152.
6. Potential novel prediction of TMJ-OA: miR-140-5p regulates inflammation through Smad/TGF- β signaling / W. Li [et al.] // Front Pharmacol. – 2019. – Vol. 10. – DOI: 10.3389/fphar.2019.00015.
7. Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis / L. Nguyen [et al.] // International Int J Mol Sci. – 2017. – Vol. 18, № 3. – DOI: 10.3390/ijms18030601.
8. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes / E. Ntoumou L. Feng [et al.] // Clin Epigenetics. – 2017. – Vol. 9. – DOI: 10.1186/s13148-017-0428-1.
9. Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity / C-M. Yin [et al.] // Bone Joint Res. – 2017. – Vol. 6, № 11. – P. 612–618.
10. Circulating microRNA let-7e is decreased in knee osteoarthritis, accompanied by elevated apoptosis and reduced autophagy / L. Feng [et al.] // Int J Mol Med. – 2020. – Vol. 45, № 5. – P. 1464–1476.
11. Szunerits S, Boukherroub R. Graphene-based biosensors // Interface Focus 2018, 8, 20160132.