

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ мРНК АНГИОГЕННЫХ И АНГИОСТАТИЧЕСКИХ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

**Жебрун Д.А.<sup>1,2</sup>, Маслянский А.Л.<sup>2</sup>, Титов А.Г.<sup>2</sup>, Патрухин А.П.<sup>1</sup>, Костарева А.А.<sup>2</sup>, Гольцева И.С.<sup>3</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В настоящее время в иммунопатогенезе различных заболеваний суставов большая роль отводится хемокинам. При обследовании больных с патологией суставов (ревматоидный артрит, остеоартроз, псориатический артрит и др.), помимо периферической крови, основным биоматериалом является синовиальная жидкость. В то же время не меньший интерес представляет исследование синовиальной оболочки (СО), в которой развиваются основные патологические процессы, и, соответственно, анализ хемокинов и их рецепторов в СО может предоставить более полную информацию об иммунопатогенезе заболеваний суставов различной этиологии. В данной работе была проведена оптимизация методики количественного определения экспрессии мРНК ангиогенных и ангиостатических хемокинов и их рецепторов в СО с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Подробно описаны все этапы проведения исследования, начиная от взятия биоматериала, заканчивая анализом результатов ПЦР. Приведены границы нормальных значений изучаемых показателей по результатам обследования лиц с травмой суставов в анамнезе и с отсутствием на момент обследования каких-либо признаков внутри- и внесуставного воспаления. Показано, что данный метод может быть информативен для сравнения внутрисуставной экспрессии хемокинов и рецепторов между группами и может использоваться для изучения роли хемокинов в развитии соответствующих иммунопатологических процессов.

**Ключевые слова:** хемокины, ПЦР в реальном времени, флуоресцентные зонды, экспрессия, синовиальная оболочка

## **Адрес для переписки:**

Жебрун Дарья Анатольевна  
младший научный сотрудник НИЛ  
иммунологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени  
В.А. Алмазова» Минздрава России  
197341, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Аккуратова, 2.  
Тел.: 8 (812) 702-37-77.  
E-mail: zhebrun@almazovcentre.ru

## **Авторы:**

Жебрун Д.А. — младший научный сотрудник НИЛ иммунологии  
ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Минздрава России,  
аспирант ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени  
Пастера», Санкт-Петербург, Россия  
Маслянский А.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ  
ревматологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Минздрава  
России, Санкт-Петербург, Россия  
Титов А.Г. — к.м.н., врач-травматолог отделения ревматологии  
ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-  
Петербург, Россия  
Патрухин А.П. — врач-травматолог, ФБУН «НИИ  
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-  
Петербург, Россия  
Костарева А.А. — к.м.н., директор института Молекулярной  
биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова»  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
Гольцева И.С. — студентка-магистр ГОУ ВПО «Санкт-  
Петербургский государственный технологический институт»,  
Санкт-Петербург, Россия  
Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАМН,  
заместитель директора по научной работе ФБУН «НИИ  
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», заведующий  
НИЛ иммунологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова»  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 10.07.2013

Отправлена на доработку 15.08.2013

Принята к печати 10.09.2013

# ANALYSIS OF EXPRESSION OF ANGIOGENIC AND ANGIOSTATIC CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS IN SYNOVIAL TISSUE BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Zhebrun D.A.<sup>a, b</sup>, Maslyansky A.L.<sup>b</sup>, Titov A.G.<sup>b</sup>, Patruhin A.P.<sup>a</sup>, Kostareva A.A.<sup>b</sup>, Goltseva I.S.<sup>c</sup>, Totolian Areg A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> St. Petersburg State Technological Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Chemokines are generally believed to play an important role in immunopathogenesis of different joint diseases. Synovial fluid is the primary bio-material, along with peripheral blood, for evaluation of patients with joint pathology (rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis, etc). However, analysis of synovial membranes is also of importance, since the main pathologic processes evolve at this site. Analysis of chemokines and their receptors in synovium may provide more complete information about immunopathogenesis of articular disease of different etiologies. We carried out optimization procedures for real-time reverse-transcription PCR analysis, in order to quantify specific mRNA expression of angiogenic and angiostatic chemokines and their receptors in synovium. All the stages, from sampling the biological material and until analysis of results are described in details. Normal ranges for mRNA expression rates are provided, as based on examination of subjects with previous traumatic joint injury, without any clinical signs of current systemic or local inflammation. We demonstrate that this method can be informative for comparing intra-articular expression of chemokines and their receptors between different clinical groups. It can also be used to investigate the role of chemokines in appropriate immunopathological events. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 6, pp 525-534)

**Keywords:** chemokines, real-time PCR, TaqMan probes, expression, synovium

## Address for correspondence:

Zhebrun Daria A.  
Research Associate, Laboratory of  
Immunology, Almazov Federal Heart,  
Blood and Endocrinology Centre  
197341, Russian Federation,  
St. Petersburg, Akkuratova str., 2.  
Phone: 7 (812) 702-37-77.  
E-mail: zhebrun@almazovcentre.ru

## Authors:

Zhebrun D.A., Research Associate, Laboratory of Immunology, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Maslyansky A.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Rheumatology Department, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, Russian Federation  
Titov A.G., PhD (Medicine), Rheumatology Department, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Patruhin A.P., Clinical Traumatologist, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Kostareva A.A., PhD (Medicine) Chief, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Goltseva I.S., Master Student, St. Petersburg State Technological Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Medical Sciences, Deputy Director, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Head, Laboratory of Immunology, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Received 10.07.2013

Revision received 15.08.2013

Accepted 10.09.2013

## Введение

Воспалительный процесс является неотъемлемой частью развития множества заболеваний — инфекционных, онкологических, аллергических и аутоиммунных. В его формировании принимает участие огромное количество медиаторов, среди которых особое место занимают хемокины, или хемотаксические цитокины. Они представляют собой подсемейство небольших белков, названных так за их главную функцию — хемотаксическую миграцию лейкоцитов, эндотелиоцитов, клеток эпителия. Хемокины играют ключевую роль как в нормальных, так и в патологических процессах в организме: иммунных и воспалительных реакций и вирусных инфекциях, ангиогенезе, клеточной дифференцировке, продукции коллагена, пролиферации гематопоетических предшественников, опухолевом росте и метастазировании, онтогенезе центральной нервной системы [6, 25]. В зависимости от расположения консервативных цистеинов в белковой молекуле хемокины подразделяются на 4 класса: CXC, CC, CX3C и C. Рецепторы для хемокинов представляют собой белки с 7 трансмембранными доменами, сопряженные с G белком [16, 30]. Среди хемокинов выделяют провоспалительные, например CXCL8/IL-8, CCL11/эотаксин, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1b, CCL5/RANTES, и гомеостатические, такие как CCL19/MIP-3b, CCL21/SLC, CXCL13/BCA-1, CXCL12/SDF-1, XCL1/лимфотактин- $\alpha$ , XCL2/лимфотактин- $\beta$ . По участию хемокинов в ангиогенезе существует деление хемокинов на ангиогенные и ангиостатические. Ангиогенными свойствами обладают ELR-положительные CXC-хемокины, содержащие аминокислотную последовательность Глутамин-Аргинин CXCL8/IL-8, CXCL1/Gro- $\alpha$ , CXCL2/Gro- $\beta$ , CXCL3/Gro- $\gamma$ , CXCL5/ENA78, CXCL7/NAP-2, CXCL6/GCP-2, а также некоторые хемокины из других подклассов — CCL2/MCP-1, CX3CL1/фракталин, CXCL12/SDF-1 и пр. [23, 24]. К ангиостатическим относятся все ELR-отрицательные CXC-хемокины: CXCL4/PF4, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL13/BCA-1, CXCL11/I-TAC, а также CCL21/SLC [3, 15, 28].

В настоящее время в иммунопатогенезе различных заболеваний суставов (ревматоидный артрит, остеоартроз, псориатический артрит и др.) большая роль отводится хемокинам [1, 5, 8, 12, 13, 14]. Несмотря на большое количество публикаций по данной теме, подавляющее большинство работ проводится либо на культурах клеток, либо на экспериментальных моделях индуцированного артрита [2, 19]. В клинко-иммунологических исследованиях основным биоматериалом являются периферическая кровь или синовиальная жидкость [11], что, несомненно, объясняется от-

носительной доступностью этого биоматериала для анализа. При воспалительных заболеваниях суставов важнейшим патологическим процессом является гипертрофия синовиальной оболочки (СО) и ее инфильтрация клетками воспаления [7] и сопровождающие их процессы ангиогенеза, в связи с чем наибольший интерес представляет изучение роли хемокинов, регулирующих ангиогенез в СО. Исследования с использованием СО немногочисленны и в основном представлены работами зарубежных авторов [21, 26, 29].

Для анализа хемокинов и их рецепторов в тканях, жидкостях и клеточных культурах применяются разнообразные методы. Одним из способов измерения экспрессии целевых молекул является определение уровня их мРНК методом ПЦР в реальном времени. Преимуществом этого метода является количественная оценка образующегося ПЦР-продукта, детекция ПЦР-продукта в режиме реального времени во время амплификации, высокая воспроизводимость и чувствительность [9]. Эти особенности говорят в пользу данного метода для оценки продукции хемокинов, т.к. часто в ткани они экспрессируются в очень малых количествах, или исследователь ограничен в объеме биоматериала, при этом требуется оценка большого спектра молекул. Также снижается время и трудоемкость анализа [18].

Еще одной проблемой при исследовании образцов СО является определение нормального, или контрольного, уровня мРНК хемокинов. Поскольку по этическим соображениям не представляется возможным получить образцы СО от практически здоровых лиц, для определения нормальных значений, возможно исследовать образцы, полученные при артроскопии и плановых оперативных вмешательствах на суставах от пациентов с травмами в анамнезе. В случае отсутствия признаков системного или внутрисуставного воспалительного процесса, гипертрофии синовиума, полученная СО может считаться условно «нормальной».

Таким образом, целью данной работы явилась оптимизация методики количественного определения экспрессии мРНК ангиогенных и ангиостатических хемокинов и их рецепторов в СО с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией и определение границ нормальных значений изучаемых показателей.

## Материалы и методы

### Группы обследованных и взятие биоматериала

В работе был использован материал, полученный от 21 пациента с травмами суставов в анамнезе. Биоптаты СО отбирались при плановом оперативном вмешательстве (ревизионная артроскопия, диагностическая артроскопия, эн-

допротезирование). На проведение данного исследования было получено согласие Этического комитета ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». При отсутствии признаков воспаления на момент взятия биоматериала по лабораторным показателям (нормальные значения СОЭ, ЦРБ, количества лейкоцитов в анализе крови), а также при отсутствии синовита артроскопически, пациенты определялись в основную группу исследования (без воспаления, или «норма»;  $n = 15$ ). При наличии признаков воспаления (повышенное значение как минимум одного из вышеуказанных лабораторных показателей) и/или наличии признаков синовита СО определялись во вторую группу (с признаками воспаления;  $n = 6$ ). Общая характеристика обследованных групп представлена в таблице 1. В течение нескольких минут после взятия материала образцы СО замораживались в жидком азоте для предотвращения деградации РНК и хранились в нем до этапа выделения РНК.

#### Выделение РНК и оценка качества ее выделения

Для выделения РНК образцы СО обрабатывали на автоматическом гомогенизаторе Tissue Lyser ST (Qiagen, Германия) в растворе охлажденного тризола в течение 3-4 минут на скорости 50 Гц. Далее выделение РНК из СО проводилось методом гуанидин-тиоцианат-хлороформной экстракции с использованием тризола (TRIzol® Reagent, Invitrogen) согласно инструкции производителя.

После выделения РНК проводили ее качественную и количественную оценку. На первом этапе качество выделенной РНК проверяли методом оптической денситометрии на спектрофотометре Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., США). При соотношениях оптических плотностей (ОП) A260/280 в пределах 1,8-2,0, а ОП A260/230  $\geq 1,8$  определяли, что раствор РНК не содержит примесей белков, тризола, солей и пр.

Далее контроль качества выделенной РНК осуществлялся на биоанализаторе Agilent (Agilent Technologies, Inc., США) с использованием чипов RNA Nano Chips (Agilent Technologies, Inc., США) [4]. Образцы РНК вносили в лунки чипа,

содержащего сеть микроканалов, заполненных полимерным гелем, содержащим флуоресцентный краситель. Чип загружался в биоанализатор, где выполнялось электрофоретическое разделение молекул РНК в зависимости от их размера. После завершения анализа получали следующие характеристики выделенной РНК:

1. Концентрацию.

2. Соотношение 28S/18S рибосомальных РНК. Недеградированная тотальная РНК должна иметь данное соотношение близкое к 2:1.

3. Так называемый индекс целостности РНК (RNA Integrity Number, RIN). Это значение является надежным и общепринятым в мире критерием для сравнения образцов РНК. RIN лежит в пределах от 10 (неповрежденная РНК) до 1 (абсолютно деградированная РНК). РНК, имеющая  $RIN \geq 6$ , соответствует РНК высокого качества и пригодна для дальнейшей работы [22].

#### Обработка ДНКазой и обратная транскрипция

Для того чтобы избежать амплификации геномной ДНК, при подборе праймеров предпочтительнее выбирать участки на стыке экзон-интрон или, если это возможно, располагать прямой и обратный праймеры в разных экзонах. При работе с хемокинами это оказывается не всегда выполнимым из-за короткой длины мРНК и небольшого количества экзонов. В этом случае следует делать очистку выделенной РНК от примесей геномной ДНК, для чего выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas) согласно рекомендациям производителя. Далее проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора Revertaid (Fermentas) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя. Для реакции брали 1 мкг РНК. В реакции использовали рандомные гексамерные праймеры. При проведении каждого цикла реакции обратной транскрипции в обязательном порядке используется положительный контроль — мРНК гена GAPDH. Для того чтобы избежать деградации кДНК при последующих циклах замораживания-оттаивания, ее разводили в три раза деионизованной водой, свободной от РНКаз, разделяли на несколько аликвот и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ОБСЛЕДОВАННЫХ

Характеристика группы	Группы обследованных:	
	без воспаления («норма»)	с признаками воспаления
Количество пациентов	15	6
Соотношение мужчин и женщин М/Ж (%)	10/5 (66,7% / 33,3%)	3/3 (50% / 50%)
Средний возраст, лет (M $\pm$ SD)	46,4 $\pm$ 22,2	55,0 $\pm$ 19,0

### Проведение анализа

Для детекции ПЦР-продукта используются флуоресцентные красители. Механизмы генерации репортерной флуоресценции различаются в зависимости от типа ПЦР в реальном времени. В данной работе мы использовали специфические флуоресцентные зонды TaqMan (Синтол). Такой олигонуклеотидный зонд несет на 5'-конце флуоресцентную метку, а на 3'-конце — гаситель флуоресценции. Зонд комплементарен участку амплифицируемой области. При отжиге праймеров зонд количественно связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует, дойдя до участка, гибризованного с зондом, начинает расщеплять его за счет 5'-экзонуклеазной

активности. В результате флуоресцентная метка отделяется от гасителя, и ее свечение может быть детектировано прибором.

При дизайне праймеров и зондов необходимо соблюдать общие правила относительно температуры отжига ( $T_m$ ), длины олигонуклеотидов, % GC оснований. Размер PCR-продукта должен превышать 150-170 нп. [17]. Специфические праймеры и флуоресцентные зонды подбирались с помощью программ NCBI/Primer-BLAST и Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, CA, USA). Их последовательности приведены в таблице 2.  $T_m$  праймеров, использовавшихся в работе, составляла 57-60 °C,  $T_m$  зондов — 68-72 °C.

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI7500 (Applied

**ТАБЛИЦА 2. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК АНГИОГЕННЫХ И АНГИОСТАТИЧЕСКИХ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ**

GAPDH	прямой праймер	ttcgacagtcagccgcatctt
	обратный праймер	tacgaccaaataccgttgactcc
	зонд	ttgcgtcgccagccgagccac
HPRT	прямой праймер	tgacactggcaaaacaatgca
	обратный праймер	agtctggcttatatccaacacttcg
	зонд	tcgcaagcttgctggtgaaaaggac
CCL2/MCP-1	прямой праймер	attctcaaactgaagctcgact
	обратный праймер	cattgattgcatctggctgag
	зонд	cccttggggaatgaagggtggctgc
CCL5/RANTES	прямой праймер	catcctcattgctactgcccctc
	обратный праймер	gccactgggtgtagaaatactcct
	зонд	tcctcggacaccacccctgctgc
CCL11/eotaxin	прямой праймер	agatacccctcagcgactag
	обратный праймер	ggctctgaagatcacagcttctc
	зонд	tgccactgggtgattctcctgtagctc
CCL24/eotaxin-2	прямой праймер	gcaggagtgtatcttcaccac
	обратный праймер	catgtacctctggaccact
	зонд	agggccagcagttctgtggcgac
CCL26/eotaxin-3	прямой праймер	catatccaagacctgtgcttc
	обратный праймер	tggtagtgaatatcacagcccg
	зонд	acagccacaagcccctccctgg
CCL21/SLC	прямой праймер	cctcaagtacagccaaaggaagat
	обратный праймер	cggggcaagaacaggatagct
	зонд	ccgccaaggtgtccgcagctaccg
CXCL1/Gro- $\alpha$	прямой праймер	cgaagtcatagccacactcaag
	обратный праймер	ccttctggtcagttggatttg
	зонд	ttgcctcaatcctgcataccccat
CXCL2/Gro- $\beta$	прямой праймер	cgaagtcatagccacactcaag
	обратный праймер	ccttctggtcagttggatttg
	зонд	tctcaaccccgcatcgcccatg

Таблица 2 (продолжение)

CXCL3/Gro- $\gamma$	прямой праймер	atactgaacaaggggagcaccac
	обратный праймер	ctagaaagctgctgttctcttttca
	зонд	caggggtggctccctgcccttaccaga
CXCL5/ENA78	прямой праймер	atctgcaaggtgtcgccatag
	обратный праймер	acaaatttccttcccgttcttc
	зонд	tgctccaaggtggaagtgtagcctc
CXCL6/GCP-2	прямой праймер	gattggtaaactgcaggtgttcc
	обратный праймер	cggtcttcaggagggtaccac
	зонд	cagggccgcagtgctccaaggtgg
CXCL7/NAP-2	прямой праймер	ctgaactccgctgcattgtat
	обратный праймер	agtgtggctatcacttcgacttg
	зонд	ttgcaatgggttcttcccgatca
CXCL8/IL-8	прямой праймер	cggaaaggaacctctcactgtgt
	обратный праймер	caaaactgcaccttcacacagagct
	зонд	caagctggcctggctctcttggc
CXCL9/MIG	прямой праймер	gagtgaaggaaccccagtagt
	обратный праймер	ttgtagggtgatagctccctgggt
	зонд	aagggtcgtgttctgcacagc
CXCL10/IP-10	прямой праймер	acatattctgagcctacagcaga
	обратный праймер	agagagagggtactccttgaatgc
	зонд	ctgccattctgatttgccttctc
CXCL11/I-TAC	прямой праймер	tacagttgttcaaggcttccca
	обратный праймер	ctcaatatctgccactttcactgc
	зонд	cagggcctatgcaaagacagcgctct
CXCL12/SDF-1	прямой праймер	gagctacagatgccatgcc
	обратный праймер	agccgggctacaatctgaag
	зонд	tcgaaagccatgttgccagagcca
CXCL13/BCA-1	прямой праймер	gacagaatgaagttcatctcgaca
	обратный праймер	gacctccagaacaccttgact
	зонд	ctgcttctcatgctgtgttgacga
CX3CL1/fractalkine	прямой праймер	atgtcgtggctgctccgcttg
	обратный праймер	ccgcatgatgcctggttctgtt
	зонд	ccgtgggtgctgtccagccagcagga
CCR1	прямой праймер	tcctgctgacgattgacaggta
	обратный праймер	gtgcccgcaaggcaaac
	зонд	tggccatcgtccacgccc
CCR2	прямой праймер	ccacaagctgaacagagaaagt
	обратный праймер	gagaacgagatgtggacagca
	зонд	ttgaacaaggacgcatttcccagt
CCR3	прямой праймер	agaagtgaatgacaacctacta
	обратный праймер	agaagtgaatgacaacctacta
	зонд	actgatggcccagttgtgccccgct
CCR4	прямой праймер	agaaaagcaagctgcttctggtt
	обратный праймер	tgtctgtatatccgtggggtt
	зонд	aggctcctcaaggcaggtctgggc
CCR5	прямой праймер	atctggccagaagagctgaga
	обратный праймер	cacttgataatccatttcttcca
	зонд	cgttcccctacaagaaacttccccg

Таблица 2 (окончание)

CXCR1	прямой праймер	tctctgactgcagctcctactgtt
	обратный праймер	cttcagtttcagcaatgggttga
	зонд	cacacctggccgggtgcttcagttag
CXCR2	прямой праймер	aataacagcaggtcacagctgc
	обратный праймер	cttcaagctgtcactctccatg
	зонд	cctacaggtgaaaagcccagcgacc
CXCR3	прямой праймер	gtccttgaggtgagtgaccacc
	обратный праймер	ggtagcagcagagtcactctcg
	зонд	cgccgaggttgccgcctctct
CXCR4	прямой праймер	cagcaggtagcaaagtgcgc
	обратный праймер	catttctcggtgtagtatctgaa
	зонд	cctgagtgctccagtagccaccgca
CXCR5	прямой праймер	gcggggagcctctcaacataa
	обратный праймер	gttcccagaacaggtcctcca
	зонд	cggcacagccatgaactaccgct
CX3CR1	прямой праймер	gatgactggcagatccagaggtt
	обратный праймер	cgcgtagaatatggacaggaacac
	зонд	cagtccacgccaggccctcacc

Biosystems, Сингапур) с использованием наборов компании Синтол (Москва) при следующих условиях: 50 °С – 5 минут; 95 °С – 10 минут; 40 циклов амплификации (96 °С – 15 секунд; 58–60 °С – 60 секунд). Реакционная смесь содержала 2,5 мкл 10х ПЦР-буфера, 1,5 мкл каждого праймера (10 пмоль/мкл), 2 мкл зонда (5 пкмоль/мкл), 5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 мкл dNTP (10 mM), 0,3 мкл Taq-полимеразы, 5,7 мкл деионизированной воды и 4 мкл разведенной кДНК.

Для каждого образца реакцию проводили на двух технических репликатах, далее усредняя значение Ct для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта Ct) с нормализацией по эндогенным референс-генам [20]. В соответствии с современными рекомендациями по проведению количественной ПЦР в реальном времени использовались одновременно 2 эндогенных контроля – GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа) и HPRT (гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза) [27]. Под относительной экспрессией понималось отношение  $E^{(Ct_{\text{референс-ген}})} / E^{(Ct_{\text{ген интереса}})}$ , где E = эффективности реакции, Ct – пороговый цикл. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений кДНК (в 5 или 10 раз). Эффективность автоматически рассчитывалась прибором. При постановке реакции ПЦР был использован подход максимизации образцов на одном планшете [10].

#### Статистическая обработка

Анализ результатов и статистическую обработку проводили в программе GRAPH Pad Prism 6.02 и MS Excel. Использовали в основном не-

параметрические тесты (тест Манна–Уитни). На графиках, показывающих уровень экспрессии мРНК, значение экспрессии в группе «норма» считается равным 1. Границы нормальных значений представлены в виде медианы (Me), нижний квартиль, верхний квартиль.

## Результаты и обсуждение

Результаты анализа качества выделенной РНК представлены на рисунках 1 и 2. На рисунке 1 (см. 3-ю обложку) приведен график, полученный при проведении оптической денситометрии на 11 пробах РНК. Видно, что пик поглощения всех образцов приходится на длину волны 260 нм. Для всех проанализированных образцов РНК соотношение A260/280 находилось в пределах 1,8–2,0, а соотношение A260/230 составляло не менее 1,8 (так, на рисунке 1 для образца № 1 A260/280 = 1,98; A260/230 = 2,05). Следовательно, выделенная РНК не содержит существенных примесей.

Результаты анализа РНК на биоанализаторе Agilent представлены на рисунке 2 (см. 3-ю обложку). Во всех образцах (sample 1-11, или дорожки 2-12) видны две четкие полосы, соответствующие 28S и 18S рибосомальным РНК, что уже визуально подтверждает сохранность РНК. Средний RIN данных образцов РНК составил 6,7 (от 5,80 до 7,20), что говорит о хорошем качестве выделенной РНК и о пригодности ее использования в дальнейшей работе. Таким образом, все образцы РНК, выделенной из СО, были хорошего качества и пригодные для дальнейшего анализа.

В таблице 3 приведены границы нормальных значений экспрессии мРНК генов хемокинов и их рецепторов относительно эндогенных референс-генов.

Изменение экспрессии мРНК хемокинов в СО от пациентов с признаками воспаления по сравнению с пациентами без признаков воспаления (норма) представлено на рисунке 3, а изменение экспрессии хемокиновых рецепторов – на рисунке 4.

Выявлено достоверное увеличение экспрессии трех из шести проанализированных СС-хемокинов: CCL5/RANTES, CCL11/эотаксина-1 и CCL24/эотаксина-2. Для CXС-хемокинов не было обнаружено значимого изменения экспрессии, хотя наблюдалась тенденция к повышению экспрессии для CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG. Также повышенная экспрессия по сравнению с «нормой» была обнаружена

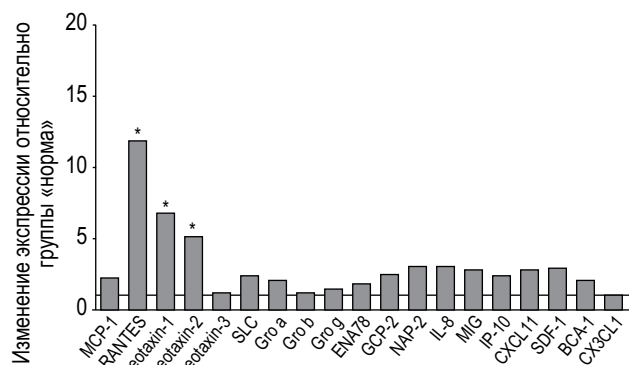
для рецепторов CCR2 и CCR5, что достаточно закономерно, учитывая, что первый является одним из основных рецепторов для CCL11/эотаксина-1, а второй – для CCL5/RANTES. Несмотря на отсутствие значимых различий в экспрессии изученных CXС хемокинов, экспрессия мРНК CXCR1 и CXCR2 была выше в группе с признаками воспаления.

Таким образом, даже при небольшом числе наблюдений, данный метод оказался информативным при сравнении экспрессии хемокинов и их рецепторов в СО между двумя изученными группами. При соблюдении описанной техники взятия материала, пробоподготовки, оценки РНК, проведении ПЦР в реальном времени и корректной обработке результатов, данный подход можно использовать для оценки внутрисуставной экспрессии мРНК хемокинов и хемо-

**ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ мРНК АНГИОГЕННЫХ И АНГИОСТАТИЧЕСКИХ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППЫ «НОРМА»**

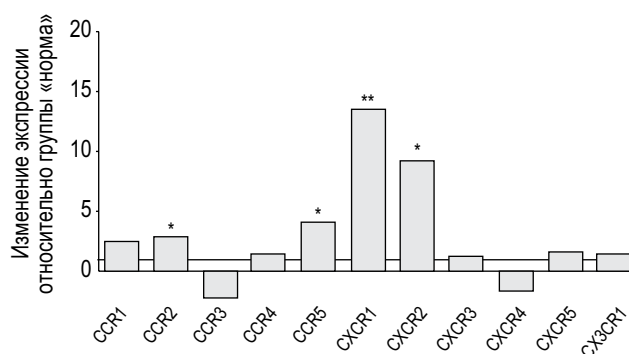
Хемокин, хемокиновый рецептор	Величина экспрессии мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов относительно мРНК референс-генов	
	Медиана (Ме)	нижний квартиль – верхний квартиль
CCL2/MCP-1	0,9793	0,6707 – 3,1334
CCL5/RANTES	0,0097	0,0064 – 0,0343
CCL11/eotaxin-1	0,0001	0,00002 – 0,00015
CCL24/eotaxin-2	0,0002	0,0001 – 0,0004
CCL26/eotaxin-3	0,0006	0,6707 – 3,1334
CCL21/SLC	0,3258	0,1654 – 0,6505
CXCL1/Gro- $\alpha$	0,0897	0,0160 – 0,4250
CXCL2/Gro- $\beta$	0,1054	0,0242 – 0,2312
CXCL3/Gro- $\gamma$	0,0545	0,0092 – 0,1505
CXCL5/ENA78	0,0145	0,0032 – 0,0585
CXCL6/GCP-2	0,1396	0,0324 – 1,0557
CXCL7/NAP-2	0,0437	0,0179 – 0,1228
CXCL8/IL-8	0,0349	0,0213 – 0,1126
CXCL9/MIG	0,0118	0,0042 – 0,0293
CXCL10/IP-10	0,0755	0,0235 – 0,1713
CXCL11/I-TAC	0,0008	0,0004 – 0,0049
CXCL12/SDF-1	5,2697	1,6401 – 7,7616
CXCL13/BCA-1	0,0057	0,0011 – 0,0189
CX3CL1/fractalkine	0,0703	0,0252 – 0,1221
CCR1	1,5010	0,9837 – 4,7886
CCR2	0,0417	0,0239 – 0,1023
CCR3	0,0086	0,0019 – 0,0123
CCR4	0,0320	0,0177 – 0,0952
CCR5	0,0173	0,0065 – 0,0356
CXCR1	0,0077	0,0062 – 0,0159
CXCR2	0,0179	0,0134 – 0,0308
CXCR3	0,0356	0,0260 – 0,1260
CXCR4	0,3935	0,1451 – 0,5316
CXCR5	0,00004	0,00004 – 0,00009
CX3CR1	0,0686	0,0275 – 0,3464





**Рисунок 3. Изменение экспрессии мРНК хемокинов в СО от пациентов с признаками воспаления по сравнению с пациентами без признаков воспаления**

**Примечание.** Значение экспрессии в группе без признаков воспаления считается равным 1. Показаны значения медианы. \* –  $p < 0,05$  (использован тест Манна–Уитни).



**Рисунок 4. Изменение экспрессии мРНК рецепторов хемокинов в СО от пациентов с признаками воспаления по сравнению с пациентами без признаков воспаления**

**Примечание.** Значение экспрессии в группе без признаков воспаления считается равным 1. Показаны значения медианы. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  (использован тест Манна–Уитни).

киновых рецепторов при изучении воспалительных заболеваний суставов различной этиологии.

## Благодарности

Данная работа поддержана грантом Минобрнауки России для физических лиц из фе-

дерального бюджета в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы и Грантом Правительства Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности в 2012 году.

## Список литературы (References)

1. Arenberg D.A., Keane M.P., DiGiovine B., Kunkel S.L., Morris S.B., Xue Y.Y., Burdick M.D., Glass M.C., Iannettoni M.D., Strieter R.M. Epithelial neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J. Clin Invest.*, 1998, vol. 102, pp. 465-472.
2. Blades M.C., Ingegnoli F., Wheller S.K., Manzo A., Wahid S., Panayi G.S., Perretti M., Pitzalis C. Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID Mice. *Arthritis Rheum.*, 2002, vol. 46, no. 3, pp. 824-836.
3. Boulday G., Haskova Z., Reinders M.E., Pal S., Briscoe D.M. Vascular endothelial growth factor-induced signaling pathways in endothelial cells that mediate overexpression of the chemokine IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176, pp. 3098-3107.
4. Bustin S.A., Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.*, 2004, vol. 15, pp. 155-166.
5. Chen Z., Malhotra P.S., Thomas G.R., Ondrey F.G., Duffey D.C., Smith C.W., Enamorado I., Yeh N.T., Kroog G.S., Rudy S., McCullagh L., Mousa S., Quezado M., Herscher L.L., Van Waes C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1999, vol. 5, pp. 1369-1379.
6. Esche C., Stellato C., Beck L.A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.*, 2005, vol. 125, pp. 615-628.
7. Firestein G.S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Kelly's Textbook of Rheumatology. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier*, 2009, pp. 1035-1086.
8. Frangogiannis N.G., Entman M.L. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2005, vol. 15, pp. 163-169.
9. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 1996, vol. 6, no. 10, pp. 986-994.
10. Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 2007, vol. 8, p. R19.
11. Hitchon C.A., Alex P., Erdile L.B., Frank M.B., Dozmorov I., Tang Y., Wong K., Centola M., El-Gabalawy H.S. A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis. *J. Rheumatol.*, 2004 Dec, vol. 31, no. 12, pp. 2336-2346.

12. Keane M.P., Donnelly S.C., Belperio J.A., Goodman R.B., Dy M., Burdick M.D., Fishbein M.C., Strieter R.M. Imbalance in the expression of CXC chemokines correlates with bronchoalveolar lavage fluid angiogenic activity and procollagen levels in acute respiratory distress syndrome. *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, pp. 6515-6521.
13. Kitadai Y., Haruma K., Sumii K., Yamamoto S., Ue T., Yokozaki H., Yasui W., Ohmoto Y., Kajiyama G., Fidler I.J., Tahara E. Expression of IL-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 1998, vol. 152, pp. 93-100.
14. König A., Krenn V., Toksoy A., Gerhard N., Gillitzer R. MIG, GRO $\alpha$  and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Virchows Arch.*, 2000, vol. 436, pp. 449-458.
15. Maurer A.M., Zhou B., Han Z.C. Roles of platelet factor 4 in hematopoiesis and angiogenesis. *Growth Factors*, 2006, vol. 24, pp. 242-252.
16. Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F., Hebert C.A., Horuk R., Matsushima K., Miller L.H., Oppenheim J.J., Power C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2000, vol. 52, pp. 145-176.
17. Overbergh L., Giulietti A., Valckx D., Decallonne R., Bouillon R., Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J. Biomol. Tech.*, 2003, vol. 14, no. 1, pp. 33-43.
18. Overbergh L., Gysemans C., Mathieu C. Quantification of chemokines by real-time reverse transcriptase PCR: applications in type 1 diabetes. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2006 Jan, vol. 6, no. 1, pp. 51-64.
19. Pierer M., Rethage J., Seibl R., Lauener R., Brentano F., Wagner U., Hantzschel H., Michel B.A., Gay R.E., Gay S., Kyburz D. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, no. 2, pp. 1256-1265.
20. Schmittgen T., Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008, vol. 3, no. 6, pp. 1101-1108.
21. Schmutz C., Hulme A., Burman A., Salmon M., Ashton B., Buckley C., Middleton J. Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: upregulation of CXCR5. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, vol. 7, no. 2, pp. R217-229.
22. Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.*, 2006, vol. 7, p. 3 <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/7/3>
23. Stamatovic S.M., Keep R.F., Mostarica-Stojkovic M., Andjelkovic A.V. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, pp. 2651-2661.
24. Strieter R.M., Polverini P.J., Kunkel S.L., Arenberg D.A., Burdick M.D., Kasper J., Dzuiba J., Van Damme J., Walz A., Marriott D., Chan S.-Y., Roczniak S., Shanafelt A.B. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, pp. 27348-27357.
25. Van Damme J., Mantovani A. From cytokines to chemokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 2005, pp. 549-551.
26. Van der Voort R., Antoine W.T. van Lieshout, Liza W.J. Toonen, Annet W. Slöetjes, Wim B. van den Berg, Carl G. Figdor, Timothy R.D.J. Radstake, Gosse J. Adema. Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum.*, 2005, vol. 52, no. 5, pp. 1381-1391.
27. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 2002, vol. 3, no. 7: <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.5>
28. Volin M.V., Woods J.M., Amin M.A., Connors M.A., Harlow L.A., Koch A.E. Fractalkine: A novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 159, pp. 1521-1526.
29. Yoshida S., Arakawa F., Higuchi F., Ishibashi Y., Goto M., Sugita Y., Nomura Y., Niino D., Shimizu K., Aoki R., Hashikawa K., Kimura Y., Yasuda K., Tashiro K., Kuhara S., Nagata K., Ohshima K. Gene expression analysis of rheumatoid arthritis synovial lining regions by cDNA microarray combined with laser microdissection: up-regulation of inflammation-associated STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, and CCL5. *Scand. J. Rheumatol.*, 2012, vol. 41, pp. 170-179.
30. Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, vol. 12, pp. 121-127.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ мРНК АНГИОГЕННЫХ И АНГИОСТАТИЧЕСКИХ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» (АВТОРЫ: ЖЕБРУН Д.А., МАСЛЯНСКИЙ А.Л., ТИТОВ А.Г., ПАТРУХИН А.П., КОСТАРЕВА А.А., ГОЛЬЦЕВА И.С., ТОТОЛЯН АРЕГ А. (с. 525-534)

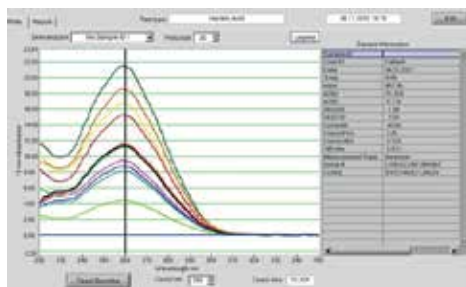


Рисунок 1. Оптическая денситометрия 11 образцов РНК

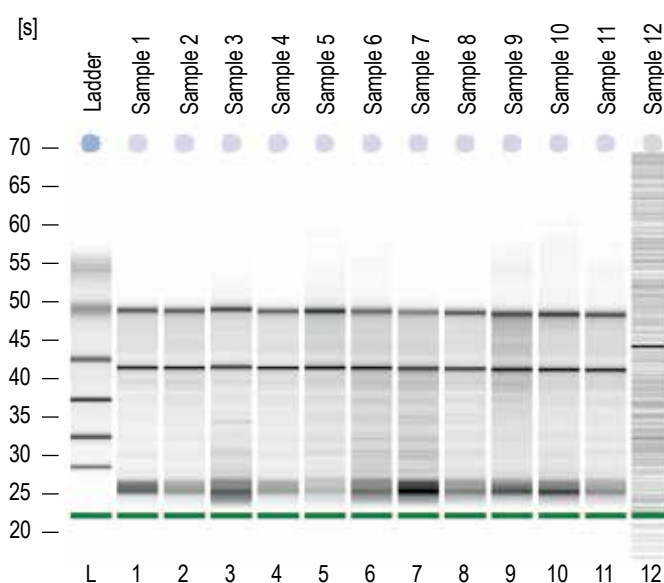


Рисунок 2. Электрофореграмма 11 образцов РНК, полученная на биоанализаторе Agilent