

# СОДЕРЖАНИЕ АНГИОГЕННЫХ И АНГИОСТАТИЧЕСКИХ ХЕМОКИНОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В НОРМЕ

**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>, Арсентьева Н.А.<sup>1</sup>,  
Любимова Н.Е.<sup>1</sup>, Семенов А.В.<sup>1</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 «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В настоящее время в иммунопатогенезе различных заболеваний суставов большая роль отводится хемокинам. Существенной проблемой при исследовании образцов синовиальной жидкости от больных с патологией суставов является определение контрольного (нормального) уровня хемокинов. В данной работе было проведено определение содержания целой панели хемокинов в относительно нормальной синовиальной жидкости в группе пациентов с травмами суставов в анамнезе и с отсутствием на момент обследования признаков внутри- и внесуставного воспаления. Данные для ряда хемокинов СС- и СХС-классов получены впервые. Эти результаты можно в дальнейшем использовать для изучения воспалительных заболеваний суставов различной этиологии.

*Ключевые слова:* хемокины, синовиальная жидкость

## **Адрес для переписки:**

Жебрун Дарья Анатольевна  
аспирант ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 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. — аспирант ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», младший научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
Маслянский А.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ ревматологии ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
Титов А.Г. — к.м.н., врач-травматолог отделения ревматологии ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
Патрухин А.П. — врач-травматолог, ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия  
Костарева А.А. — к.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
Арсентьева Н.А. — научный сотрудник, ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия  
Любимова Н.Е. — научный сотрудник, ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия  
Семенов А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия  
Тотолян Арег А. — д.м.н., член-корр. РАМН, заместитель директора по научной работе ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», заведующий НИЛ иммунологии ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 12.12.2013

Принята к печати 15.01.2014

# ANGIOGENIC AND ANGIOSTATIC CHEMOKINES LEVEL IN NORMAL SYNOVIAL FLUID

**Zhebrun D.A.<sup>a,b</sup>, Maslyanskiy A.L.<sup>b</sup>, Titov A.G.<sup>b</sup>, Patruhin A.P.<sup>a</sup>, Kostareva A.A.<sup>b</sup>, Arsentieva N.A.<sup>a</sup>, Lubimova N.E.<sup>a</sup>, Semenov A.V.<sup>a</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 Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Chemokines are believed to play an important role in immunopathogenesis of different joint diseases. One of important problems in studies of synovial fluid is determination of normal level of chemokines from control patients. In our study we determined concentrations of number of chemokines in relatively normal synovial fluid from subjects with background traumatic joint injury without systemic or local inflammation at the moment of study. Results for several CC- and CXC-chemokines are shown for the first time. Therefore, our data can be further used in analysis of synovial fluid chemokine profile in studies of joint disease of different etiology. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 2, pp 189-194)

*Keywords: chemokines, synovial fluid*

---

## **Address for correspondence:**

Zhebrun Daria A.  
PhD Candidate, St. Petersburg  
Pasteur Institute of Epidemiology  
and Microbiology; 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., PhD Candidate, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology; Research Associate, Laboratory of Immunology, Almazov Federal Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation  
Maslyanskiy A.L., PhD (Medicine), Laboratory of Rheumatology, Almazov Federal Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation  
Titov A.G., PhD (Medicine), Rheumatology Department, Almazov Federal Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation  
Patruhin A.P., 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 Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation  
Arsentieva N.A., Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation  
Lubimova N.E., Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation  
Semenov A.V. — PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation  
Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member of RAMS, Deputy Director, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Laboratory of Immunology, Almazov Federal Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Received 12.12.2013

Accepted 15.01.2014

## Введение

В настоящее время в иммунопатогенезе различных заболеваний суставов важная роль отводится хемокинам [5, 8]. Например, при ревматоидном артрите в развитии паннуса принимают участие хемокины, регулирующие ангиогенез. Несмотря на достаточное количество публикаций по данной теме, подавляющее большинство работ проводится либо на культурах клеток, либо на экспериментальных моделях индуцированного артрита [4, 9]. В клинико-иммунологических исследованиях основным биоматериалом являются периферическая кровь или синовиальная жидкость [6, 7]. Существенной проблемой при исследовании образцов синовиальной жидкости является определение контрольного уровня хемокинов в норме. В доступной нам мировой литературе лишь в единичных работах приводятся значения некоторых хемокинов в синовиальной жидкости условно здоровых лиц. В большинстве работ контрольная группа вообще отсутствует, а основная группа, например ревматоидный артрит, сопоставляется с группой сравнения – остеоартроз. Таким образом, целью данной работы явилось определение содержания ангиогенных и ангиостатических СС-, СХС- и СХЗС-хемокинов в относительно нормальной синовиальной жидкости и определение границ нормальных значений.

## Материалы и методы

### Пациенты и взятие биоматериала

По этическим соображениям достаточно проблематично получить образцы синовиальной жидкости от практически здоровых лиц, поэтому 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 синовиальная жидкость может считаться условно «нормальной». В исследуемую группу вошли пациенты с травмами суставов в анамнезе. Биоматериал получали при плановом оперативном вмешательстве: ревизионная и/или диагностическая артроскопия. На проведение данного исследования было получено согласие Этического комитета ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». Исходно был обследован 21 пациент. При отсутствии признаков воспаления на момент взятия биоматериала по общелабораторным показателям (нормальные значения СОЭ, ЦРБ, количества лейкоцитов в анализе крови), а также при отсутствии синовита артроскопически па-

циенты определялись в основную группу исследования (без воспаления, или «норма»;  $n = 15$ ). Эти пациенты были включены в исследование по анализу экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов в относительно нормальной синовиальной оболочке [1]. У 9 из 15 пациентов данной группы была получена синовиальная жидкость, в которой проводили определение содержания хемокинов. При наличии признаков воспаления (повышенное значение как минимум одного из вышеуказанных лабораторных показателей) и/или наличии признаков синовита пациенты ( $n = 6$ ) исключались из данного исследования. Таким образом, окончательно группу пациентов, которых стало возможным отнести к условной норме, составили 9 человек: соотношение мужчин и женщин – 2/7 (22,2/77,8%), средний возраст –  $48 \pm 26$  лет.

Синовиальную жидкость отбирали в стерильный шприц, далее переносили в стерильные пробирки и центрифугировали при 1000g при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. Надосадочную жидкость переносили в промаркированную сухую пробирку, замораживали и хранили при  $-80^\circ\text{C}$  до момента проведения анализа.

### Проведение анализа

Содержание хемокинов в синовиальной жидкости проводили с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel I-III (Millipore, США) согласно инструкции производителя. Для считывания результатов использовали прибор MAGPIX® (Millipore, США). Проводили определение концентраций следующих хемокинов: CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL11/эотаксин, CCL24/эотаксин-2, CCL26/эотаксин-3, CCL21/SLC, CXCL1-3/Gro, CXCL5/ENA78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CX3CL1/фракталкин.

### Статистическая обработка

Анализ результатов и статистическую обработку проводили в программах GRAPH Pad Prism 5.0 и 6.02 и MS Excel. Значения концентрации, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода, принимались равными значению нижней границы. Если значение концентрации превышало верхнюю границу чувствительности, то концентрацию принимали равной верхней границе. Для содержания каждого хемокина рассчитывали значение медианы (Me) и межквартильный размах (Q25; Q75).

## Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены концентрации хемокинов в синовиальной жидкости, определен-

ные в данной работе, в сопоставлении с данными литературы. Нами в норме были выявлены наименьшие значения (пикограммы) для CCL26/эотаксин-3 и CXCL11/I-TAC, а наибольшие (нанogramмы) – для CCL2/MCP-1, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL12/SDF-1 и CX3CL1/фракталкин.

Исследования с использованием СЖ от пациентов контрольных групп единичны. Так, в одной из работ оценивали содержание некоторых хемокинов и цитокинов в СЖ больных остеоартрозом разных стадий с использованием мультиплексного ИФА на проточном цитометре [11]. У пациентов без остеоартроза (нормальный хрящ) или с самой начальной стадией остеоартроза (незначительное размягчение поверхностного слоя) по шкале Международного общества по восстановлению хряща были выявлены концентрации CXCL8/IL8, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, которые превышали концентрации, полученные нами для этих хемокинов. В то же время для CCL11/

эотаксина значения были выше, чем в нашей работе. Различия в полученных показателях, вероятно, можно объяснить использованием разных методов. К тому же в вышеуказанном исследовании в контрольную группу с относительно нормальной синовиальной жидкостью входило только 2 пациента (табл. 1).

Другие авторы для определения значений нормы для CCL5/RANTES и CXCL8/IL-8 проводили исследование синовиальной жидкости, полученной от пациентов с травмами коленных суставов давностью не менее 3 недель [10]. Значение концентрации CCL5/RANTES, полученное в этой работе, превышало таковое в нашем исследовании, а для CXCL8/IL-8, наоборот, значение концентрации было ниже. Отметим, что в этой работе применялись коммерческие наборы для ИФА, DuoSet ELISA Development System R&D, что существенно отличалось от технологии, использованной нами (табл. 1).

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ АНГИОГЕННЫХ И АНГИОСТАТИЧЕСКИХ ХЕМОКИНОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В НОРМЕ**

Хемокин	Концентрация в синовиальной жидкости, пг/мл					
	Наши данные n = 9		Beekhuizen M. et al., 2012; Beekhuizen M. et al., 2013 (посмертные доноры, без патологий сустава), n = 16	Vangsnæs C.T. et al., 2011 (нормальный хрящ/начальная стадия остеоартроза), n = 2	Pierzchala A. et al., 2011 (посттравматическая группа, не ранее 3 недель после травмы), n = 20	
	Медиана	Q25-Q75	Медиана ± IqR	Среднее ± sd	Среднее	Среднее ± sd
CCL2/MCP-1	1424,0	360-4772	542,4±102,1	нет данных	75	нет данных
CCL5/RANTES	71,5	45,3-423,5	15,6±28,1	31,7±48,3	нет данных	563,1±309,5
CCL11/эотаксин	32,4	17,1-48,8	14,6±39,6	22,4±21,4	80	нет данных
CCL24/эотаксин-2	324,2	126,4-661,4	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CCL26/эотаксин-3	4,9	2,5-10,7	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CCL21/SLC	772,7	380,8-1726,0	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL1-3/Gro	1205*	597-7550*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL5/ENA78	20,7	8,0-1508,0	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL6/GCP-2	80,0	28,0-231,5	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL7/NAP-2	9979,0	4201,0-40603,0	4,8±36	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL8/IL-8	124,4	32,1-1757,0	16,2±43,5	нет данных	50	18,2±14,0
CXCL9/MIG	1589,0	583,0-2612,0	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL10/IP-10	888,6	375,5-2054,0	302,1±280,8	521,5±561,2	120	нет данных
CXCL11/I-TAC	9,9	2,6-17,2	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL12/SDF-1	1606,0	1266,0-2721,0	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CXCL13/BCA-1	49,0	14,9-204,3	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
CX3CL1/фракталкин	1373,0	1077,0-33718,0	0±0	нет данных	нет данных	нет данных

**Примечание.** \* – концентрация CXCL1-3/Gro приводится в единицах флуоресценции (mean fluorescent units, MFI); IqR – межквартильный размах (interquartile range); sd – стандартное отклонение (standard deviation).

И, наконец, две работы, описывающие одно и то же исследование по определению ряда хемокинов в СЖ при остеоартрозе по сравнению с контрольной группой, были опубликованы в 2012 и 2013 гг. Анализ проводили по той же технологии и с использованием аналогичных наборов, которые использовались нами [2, 3]. В данной работе значения концентрации CCL11/эотаксина в контрольной группе оказались сравнимы с результатами, полученными нами (табл. 1), а концентрации CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 и CCL5/RANTES были несколько ниже, чем в нашем исследовании. Необходимо отметить, что в данном исследовании для определения значений нормы были исследованы образцы синовиальной жидкости, получен-

ные от посмертных доноров в течение 24 часов после смерти.

К сожалению, других публикаций о содержании хемокинов в синовиальной жидкости в норме или относительной «норме» не встречается. Таким образом, в нашей работе впервые получены данные о содержании в относительно нормальной синовиальной жидкости следующих хемокинов: CCL24/эотаксин-2, CCL26/эотаксин-3, CCL21/SLC, CXCL1-3/Gro, CXCL5/ENA78, CXCL6/GCP-2, CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1 и CXCL13/BCA-1. Эти показатели можно в дальнейшем использовать для изучения воспалительных заболеваний суставов различной этиологии, таких как ревматоидный артрит, остеоартроз, псориатический артрит, спондилоартрит и другие.

## Благодарности

Данная работа выполнена при частичной поддержке Гранта РФФИ №12-04-32237 и Гранта Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности в 2012 году.

## Список литературы

1. Жебрун Д.А., Маслянский А.Л., Титов А.Г., Патрухин А.П., Костарева А.А., Гольцева И.С., Тотоян Арег А. Определение мРНК ангиогенных и ангиостатических хемокинов и их рецепторов в синовиальной оболочке методом количественной ПЦР в реальном времени // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 6. – С. 525-534.

*Ссылки 2-11 см. в References (сmp. 193-194). See References for numbers 2-11 at pp. 193-194.*

## References

1. Zhebrun D.A., Maslyanskiy A.L., Titov A.G., Patrukhin A.P., Kostareva A.A., Gol'tseva I.S., Totolian Areg A. Opredelenie mRNK angiogennykh i angiostaticheskikh khemokinov i ikh retseptorov v sinovial'noy obolochke metodom kolichestvennoy PTSR v real'nom vremeni [Analysis of expression of angiogenic and angiostatic chemokines and their receptors in synovial tissue by quantitative real-time PCR]. *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 525-534.

2. Beekhuizen M., Gierman L.M., Creemers L.B., Dhert W.J., Huizinga T.W., Van Osch G.J., Zuurmond A.M. A descriptive study of synovial fluid changes in cytokine, chemokine and growth factor levels between osteoarthritis patients and healthy donors. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2012, vol. 20, s. 1, pp. S79-S80.

3. Beekhuizen M., Gierman L.M., van Spil W.E., Van Osch G.J., Huizinga T.W., Saris D.B., Creemers L.B., Zuurmond A.M. An explorative study comparing levels of soluble mediators in control and osteoarthritic synovial fluid. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2013, vol. 21, pp. 918-922.

4. 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.

5. De Jager W., Hoppenreijns E.P., Wulffraat N.M., Wedderburn L.R., Kuis W., Prakken B.J. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007, vol. 66, no. 5, pp. 589-598.

6. Hampel U., Sesselmann S., Iserovich P., Sel S., Paulsen F., Sack R. Chemokine and cytokine levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid. *J. of Immunological Methods*, 2013, vol. 396, pp. 134-139.

7. 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, vol. 31, no. 12, pp. 2336-2346.
8. 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.
9. 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.
10. Pierzchala A.W., Kusz D.J., Hajduk G. CXCL8 and CCL5 Expression in Synovial Fluid and Blood Serum in Patients with Osteoarthritis of the Knee. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2011, vol. 59, no. 2, pp. 151-155.
11. Vangsness C.T. Jr., Burke W.S., Narvy S.J., MacPhee R.D., Fedenko A.N. Human knee synovial fluid cytokines correlated with grade of knee osteoarthritis—a pilot study. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.*, 2011, vol. 69, no. 2, pp. 122-127.