

understanding of the molecular mechanisms of the effect of nucleic acids antimetabolites on biochemical processes, which can serve as the basis for the targeted search and creation of new anticancer drugs.

This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental research (grant №M20MC-043).

REFERENCES

1. *Fuchs-Tarlovsky V.* Role of antioxidants in cancer therapy / Fuchs-Tarlovsky V // *Nutrition*. 2013;29:15–21.
2. An overview of the antioxidant effects of ascorbic acid and alpha lipoic acid (in liposomal forms) as adjuvant in cancer treatment. Attia M [et al.] // *Antioxidants*. 2020;9:359–373.
3. Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements / Aggarwal V [et al.] // *Biomolecules*. 2019;9:735.
4. Cytosine-based nucleoside analogs are selectively lethal to DNA mismatch repair-deficient tumour cells by enhancing levels of intracellular oxidative stress / Hewish M [et al.] // *British Journal of Cancer*. 2013;108:983–992.
5. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity / Singh K [et al.] // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26:2:177–190.

МикроРНК let-7e И miR-140 КАК БИОМАРКЕРЫ ДЕФОРМИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ

MicroRNA let-7e AND miR-140 AS BIOMARKERS OF DEFORMING JOINT DISEASES

П. Т. Журко, И. В. Коктыш, Р. М. Смолякова

P. T. Zhurko, I. Koktysh, R. Smolyakova

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,

г. Минск, Республика Беларусь

pavlinats@mail.ru, drkoktysh@gmail.com

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Исследован уровень экспрессии циркулирующих микроРНК let-7e и miR-140 в плазме периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с гонартрозом и коксартрозом. Выявлено статистически значимое снижение экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости и let-7e в периферической крови пациентов с остеоартритами ($p < 0,05$). МикроРНК let-7e характеризует сопутствующую патологию и указывает на развитие метаболического синдрома. Установлена корреляционная связь уровней экспрессии изучаемых микроРНК со степенью тяжести заболевания.

The circulating microRNAs (let-7e and miR-140) expression levels were studied in the plasma of peripheral blood and synovial fluid of patients with gonarthrosis and coxarthrosis. There was a statistically significant decrease in the expression of miR-140 in synovial fluid and let-7e in the peripheral blood of patients with osteoarthritis ($p < 0.05$). MicroRNA let-7e characterizes comorbidity and indicates the development of metabolic syndrome. It was established a correlation between the microRNAs expression levels and the disease severity.

Ключевые слова: микроРНК, синовиальная жидкость, периферическая кровь, остеоартрит, тяжесть течения, биомаркер.

Keywords: microRNA, synovial fluid, peripheral blood, osteoarthritis, severity, biomarker.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-55-58>

Остеоартрит – дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, распространенность которого увеличивается, занимая первое место среди всех нозологических форм патологии суставов и поражая не менее 20% населения. В Республике Беларусь отмечается неуклонный рост заболеваемости остеоартритами, при этом все чаще поражая молодое население. Актуальность изучения данной патологии также обусловлена высоким уровнем временной нетрудоспособности, ранней инвалидизацией населения и ухудшением качества жизни пациентов в целом.

В настоящее время описаны клинические фенотипы пациентов с остеоартритами, однако патогенетические механизмы развития и достоверные методы лабораторной диагностики, в том числе молекулярно-генетические, гонартрозов и коксартрозов до конца не изучены, что затрудняет постановку диагноза, а также прогнозирование исхода.

В качестве биологических маркеров остеоартритов могут быть использованы малые некодирующие РНК, в частности, микроРНК. В связи с небольшим количеством нуклеотидов, формирующих уникальную последовательность микроРНК, данный вид нуклеиновой кислоты характеризуется крайне низкой изменчивостью, и, соответственно, высоким постоянством: микроРНК имеют мало шансов на вариацию или мутацию. Однако известно, что воздействия лекарственных препаратов, различных внешних стимулов, влияющих на генетические и эпиге-

нетические программы, могут приводить к изменениям экспрессии микроРНК (снижению или увеличению), что, в конечном итоге, может привести к формированию патологического процесса в организме. Дерегуляция на уровне экспрессии этих молекул наблюдается при самых различных заболеваниях организма человека, например, при злокачественных новообразованиях поджелудочной железы, предстательной железы, головы и шеи, яичников, молочной железы, мочевого пузыря, почек, при гормональных заболеваниях, а также при заболеваниях опорно-двигательного аппарата и ряде других.

Особой клинической значимостью отмечаются циркулирующие микроРНК благодаря простоте их получения, стабильности и высокой чувствительности. Предполагается выделение клетками микроРНК в межклеточное пространство в случае здорового функционирования организма и при формировании патологического процесса, что делает возможным анализ экспрессии данных биомолекул с целью изучения молекулярных основ формирования заболеваний и молекулярной диагностики.

Малая некодирующая РНК miR-140 принимает участие в процессах хондрогенеза и развитии хрящевой ткани, и является единственной микроРНК с характерным для хряща паттерном экспрессии. Компьютерное моделирование патологических процессов предполагает участие циркулирующих miR-140-3p в сыворотке крови в регуляции метаболических процессов, способствующих развитию остеоартрита. Однако подчеркивается необходимость проведения функциональных исследований, чтобы подтвердить биоинформатический анализ и пролить свет на метаболические пути, приводящие к возникновению и развитию остеоартрита [1]. Кроме того, определяется необходимость разработки стандартизованных протоколов выделения и анализа циркулирующих микроРНК в более крупных когортах различных этнических групп перед использованием miR-140 в клинической практике.

Считается, что микроРНК семейства let-7 являются наиболее распространенными микроРНК в клетках и тканях организма, включая хондроциты. Показано, что данные микроРНК необходимы для нормальной пролиферации хондроцитов в ростовой пластинке. В эксперименте ингибирование let-7 в хондроцитах приводило к подавлению экспрессии микроРНК let-7, что снижало пролиферацию хондроцитов [2, 3].

Цель: выявить особенности экспрессии циркулирующих микроРНК let-7e и miR-140 в синовиальной жидкости и плазме крови пациентов с гонартрозом и коксартрозом.

Исследуемую группу составили с информированного согласия 17 пациентов с деформирующими заболеваниями суставов (в том числе 11 пациентов с гонартрозом и 6 пациентов с коксартрозом), подвергавшихся оперативному лечению (артроскопии или тотальному эндопротезированию суставов). Группу сравнения составили 7 пациентов с отсутствующими рентгенологическими и клиническими признаками деформирующей патологии суставов, также перенесших оперативное вмешательство на суставах.

Характеристика исследуемых групп представлена в таблице. В исследовании также учитывались степени активности деформирующих заболеваний суставов

Таблица 1 – Характеристика пациентов исследуемых групп и группы сравнения

Клинический диагноз / группа	Количество пациентов, пол		Возраст, лет*
Коксартроз	6	женщины – 5; мужчины – 1	64,5 [60;69]
Гонартроз	11	женщины – 8, мужчины – 3	57,0 [51,0;67,0]
Остеоартрит (ОА)	17	женщины – 13, мужчины – 4	60,0 [55,0;67,0]
Группа сравнения	7	женщины – 4, мужчины – 3	49,0 [26,0;57,0]

Примечание: * – указаны медианы и процентиля [25%; 75%]

Забор периферической крови и синовиальной жидкости для исследований проводился во время оперативного вмешательства (эндопротезирования сустава или артроскопии).

Выполнено исследование мочи, общий и биохимический анализы крови, а также анализ коагулограммы.

Для определения уровня экспрессии микроРНК в синовиальной жидкости и плазме у пациентов с деформирующими заболеваниями суставов использовался адаптированный нами протокол молекулярно-генетического исследования («miRNeasy Serum / Plasma Kit», Qiagen, Германия). Экспрессия микроРНК определялась в двухшаговой полимеразной цепной реакции (ПЦР): этап обратной транскрипции (miRCURY LNA RT Kit, Qiagen, Германия), далее – ПЦР в реальном времени (miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Германия). Исследовались циркулирующие микроРНК: hsa-miR-140-5p (MIMAT0000431) и hsa-let-7e-5p (MIMAT0000066). Нормализацию полученных значений Ct проводили по Ct малой ядерной РНК U6. Для определения экспрессии микроРНК использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Статистический анализ полученных результатов проводился непараметрическими методами с использованием программы «Statistica 8.0». Для выявления статистически значимых различий или взаимосвязи признаков критический уровень значимости p нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

Проведенные нами молекулярно-генетические исследования плазмы периферической крови не показали статистически значимые изменения уровня экспрессии miR-140 при остеоартритах, тем самым не подтверждая результаты компьютерного моделирования.

Однако у пациентов с остеоартритами в синовиальной жидкости установлено снижение уровня экспрессии микроРНК miR-140 ($p=0,03$), коррелирующее со степенью активности заболевания ($R_s=-0,65$, $p=0,02$). Кроме того, отмечена тенденция к увеличению кратности изменения экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости пациентов с деформирующими заболеваниями суставов по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($p=0,08$).

При коксартрозах установлено статистически значимое подавление более чем в 5 раз экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($p=0,03$, рисунок 1).

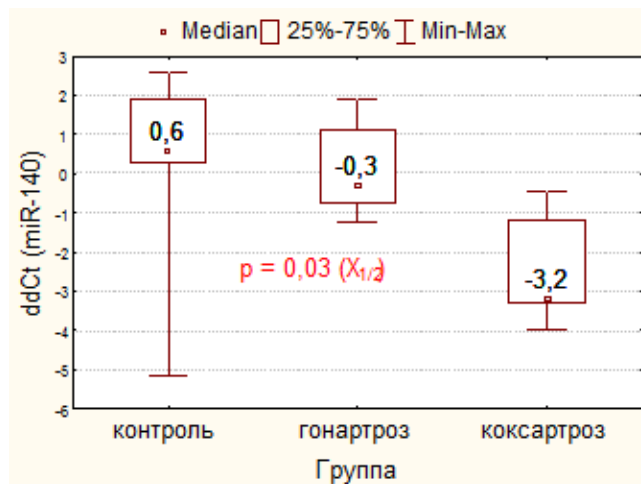


Рис. 1 – Экспрессия циркулирующей микроРНК miR-140 в синовиальной жидкости

Сравнение результатов молекулярно-генетических исследований в независимости от нозологий деформирующих заболеваний суставов показал снижение относительной экспрессии циркулирующей микроРНК let-7e в периферической крови пациентов с остеоартритами ($p=0,03$, рисунок 2).

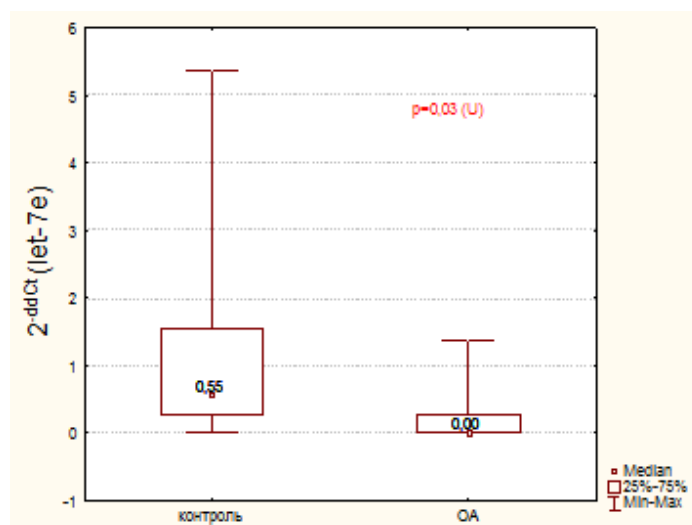


Рис. 2 – Экспрессия циркулирующей микроРНК let-7e в периферической крови исследуемых групп

Выявленное нами изменение экспрессии let-7e может объясняться наличием сопутствующей патологии, в частности, присутствием компонентов метаболического синдрома, сопровождаемого системным воспалением, а также воспалительной природой формирования самого остеоартрита. Это подтверждается исследованиями по участию семейства let-7 в процессах пролиферации, апоптоза и аутофагии хондроцитов.

Исследование экспрессии let-7e в синовиальной жидкости пациентов с гонартрозами и коксартрозами не выявило статистически значимых различий в уровне экспрессии данной циркулирующей микроРНК в сравнении с контрольной группой. Однако некоторые литературные данные описывают участие всего семейства микроРНК let-7 в процессах хондрогенеза у мышей и формировании деформирующих заболеваний суставов. Поэтому нами проведен корреляционный анализ, который показал статистически значимую умеренную обратную корреляционную зависимость между уровнем экспрессии let-7e в синовиальной жидкости и степенью активности остеоартрита ($R_s=-0,53$, $p=0,03$).

Развитие тяжелых форм остеоартритов ассоциируют в том числе с микроРНК let-7e [4]. Отмечается связь низких уровней let-7e с повышенным риском артропластики из-за тяжелого течения остеоартрита. На экспериментальной модели крыс деформирующих заболеваний выявлено снижение экспрессии let-7e в сыворотке крови и хряще коленного сустава. Показана обратная зависимость уровня экспрессии let-7e с тяжелым течением остеоартритов коленного и тазобедренного суставов [5].

Кроме молекулярно-генетического исследования нами проанализированы клинико-лабораторных показатели у пациентов с остеоартритами, а также их связь с экспрессией микроРНК.

Клинико-лабораторные исследования показали изменения в общем анализе крови пациентов с остеоартритами, характерные для воспалительного процесса. Установлено статистически значимое увеличение количества лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов ($p < 0,05$, соответственно). Также выявлены изменения в анализе гемостазиограммы (снижение ПТИ, увеличение МНО) и активности аланинаминотрансферазы периферической крови данной группы пациентов ($p < 0,05$, соответственно). Данные гемостазиограмм пациентов с деформирующими заболеваниями суставов указывают на тенденцию к удлинению периода формирования кровяного сгустка и более низкой свертывающей способности крови пациентов исследуемой группы.

На основе изучения экспрессии циркулирующих микроРНК выявлены взаимосвязи нарушений клинико-лабораторных и молекулярно-генетических показателей при деформирующих заболеваниях суставов.

Экспрессия miR-140 / let-7e микроРНК ассоциирована с изменениями клинико-лабораторных показателей периферической крови пациентов с остеоартритами. При гонартрозе установлена прямая сильная статистически значимая связь уровня экспрессии miR-140 с количеством нейтрофилов ($R_s = 0,9$, $p < 0,05$) в периферической крови, а коэффициент нормализации let-7e прямо коррелировал с относительным количеством моноцитов ($R_s = 0,7$, $p < 0,05$) и обратно коррелировал со средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах ($R_s = -0,8$, $p < 0,05$). Развитие коксартроза сопровождается наличием связи между уровнем экспрессии miR-140 в плазме и средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах ($R_s = 0,9$, $p < 0,05$) а также обратной корреляцией между относительным изменением экспрессии let-7e и средним содержанием гемоглобина в эритроците ($R_s = -0,9$, $p < 0,05$).

Анализ экспрессии циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в синовиальной жидкости и периферической крови показал участие данных биомолекул в развитии деформирующих заболеваний суставов и возможность использования в качестве биомаркеров при оценке прогноза течения деформирующих заболеваний суставов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes / E. Ntounou L. Feng [et al.] // Clin Epigenetics. – 2017. – Vol. 9. – DOI: 10.1186/s13148-017-0428-1.
2. Mirzamohammadi, F. MicroRNAs in cartilage development, homeostasis, and disease / F. Mirzamohammadi, G. Papaioannou, T. Kobayashi // Curr Osteoporos Rep. – 2014. – Vol. 12, № 4. – P. 410–419.
3. Let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development / G. Papaioannou [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – Vol. 110, № 35. – P. E3291–E3300.
4. 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.
5. 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.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ У СПОРТСМЕНОВ

ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF MOLECULAR GENETIC MARKERS OF PREDISPOSITION TO CARDIOVASCULAR PATHOLOGY IN ATHLETES

А. С. Люльченко

A. Lyulchenko

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,

г. Минск, Республика Беларусь

makarevich.nastyusha@gmail.com

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Сердечно-сосудистые патологии на протяжении десятилетий занимают лидирующие позиции по инвалидизации и смертельным исходам во всём мире. Среди спортсменов риск сердечно-сосудистой патологии