

Expresní profil genů CCL5, MIF, RANKL a DC-STAMP v periprotetických tkáních pacientů reoperovaných pro selhání umělé kloubní náhrady – pilotní data



Tománková T¹, Kriegová E¹, Gallo J², Mrázek F¹, Petřek M¹
¹Laboratoř imunogenomiky a proteomiky, Ústav imunologie LF, Univerzita Palackého, Olomouc
²Ortopedická klinika, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc



Selhání umělé kloubní náhrady (totální endoprotéza, TEP)

- nejčastější příčinou selhání totální endoprotézy (TEP) kyčle a kolena je periprotetická osteolýza (OL) a aseptické uvolnění (AU)

- při vzniku a rozvoji OL a AU hrají důležitou roli otěrové částice, uvolňované z povrchu kloubní náhrady, které vyvolávají zánětlivou odpověď

- buněčné a molekulární mechanismy vedoucí k rozvoji OL a AU nejsou dosud zcela objasněny

Cíle

Zavést metodu ke sledování mRNA exprese vybraných kandidátních molekul v periprotetických tkáních.

Zvolit, charakterizovat a srovnat místa odběru tkáně pro sledování genové exprese molekul podílejících se na procesech vedoucích k selhání TEP.

Kandidátní molekuly

Studované molekuly byly vybrány na podkladě jejich pravděpodobné účasti v patogenezi OL a AU:

- CCL5/RANTES** (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted): prozánětlivý CC chemokin regulující migraci T lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie
- MIF** (Macrophage Migration Inhibitory Factor): prozánětlivý cytokin účastnící se aktivace makrofágů a T-buněk, ovlivňuje buněčný růst a apoptózu
- RANKL** (Receptor Activator Nuclear Factor-kappaB Ligand): mediátor diferenciaci a aktivace osteoklastů
- DC-STAMP** (Dendritic Cell-Specific TransMembrane Protein): molekula nezbytná pro fúzi buněk osteoklastů

Charakteristika vyšetřovaných tkání

Periprotetická tkáň byla odebrána 14 pacientům při reoperaci TEP:

- 1) TEP kolene, n=5
- 2) TEP kyčle, n=9

Odběr tkáně byl proveden ze 3 standardizovaných odběrových míst v oblasti TEP:

- **Lokalita 1** (lok.1) = vnitřní synoviální list kloubního pouzdra
- **Lokalita 2** (lok.2) = oblast kolem proximální komponenty (jamka, femorální komponenta)
- **Lokalita 3** (lok.3) = oblast kolem distální komponenty (dřík, tibiální komponenta)

Tab. 1: Přehled použitých sond a primerů pro kvantitativní RT-PCR

Gen	Primery	LNA sonda (Roche)
CCL5	5'-CCTCATTGCTACTGCCCTCT-3' 5'-GGTGTGGTGCCGAGGAATA-3'	#16
MIF	5'-ACCGTCTCTACAGCAAGC-3' 5'-CGCGTTCATGTCGTAATAGTTG-3'	#40
RANKL	5'-TGATTCATGTAGGAGAATTAACAGG-3' 5'-GATGTGCTGTGATCCAACGA-3'	#17
DC-STAMP	5'-TGCATGCAAAGCTGCTTAAA-3' 5'-AGGACTGGAAGCCAGAAATG-3'	#7
PSMB2	5'-AGAGGGCAGTGGAACTCCTT-3' 5'-AGGTTGGCAGATTCAGGTG-3'	#50

Metody

- K izolaci celkové RNA ze vzorku tkání (0,1 – 0,2 g, uchováno v RNAlateru) byl použit kit mirVana miRNA kit (Ambion).
- Kvantita a kvalita izolované celkové RNA byla hodnocena pomocí systému 2100 Bioanalyzer a využitím RNA 6000 Nano assays (Agilent Technologies).
- K reverzní transkripci byl použit Verso™ cDNA kit s anchored dT primery (Thermo Fisher Scientific).
- Kvantitativní RT-PCR (RotorGene 3000 system, Corbett Research) s fluorescenčně značenými sondami (Roche, Universal Probe Library) byla použita ke sledování relativní mRNA exprese vybraných molekul (**Tab. 1**).
- Relativní genová exprese byla vyhodnocena metodou druhé derivace (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research) s využitím cDNA z lidské univerzální referenční RNA (Stratagene) jako kalibrátoru a PSMB2 jako referenčního genu.

Výsledky

Všechny izolované vzorky RNA byly dobré kvality (RIN RNA Integrity Number: 6,6 – 9,0) (**Obr. 1**).

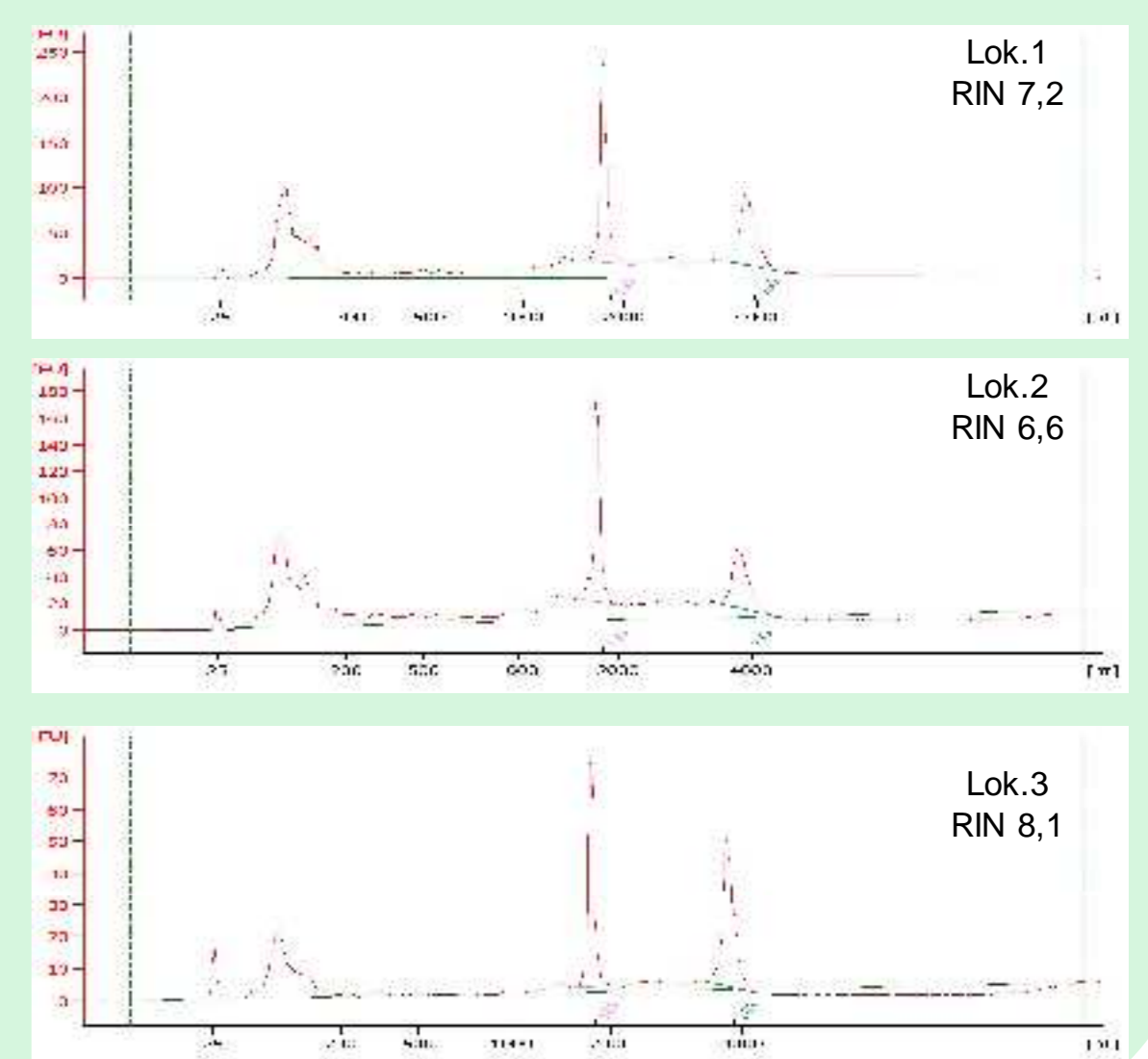
Studované geny byly exprimovány na úrovni mRNA ve všech vyšetřovaných vzorcích periprotetických tkání. Jak u pacientů s TEP kolena (**Obr. 2A**), tak s TEP kyčle (**Obr. 2B**) byla stanovena nejvyšší relativní exprese u genů MIF a CCL5, nižší byla naopak u genů DC-STAMP a RANKL.

Expresní profily jednotlivých genů byly závislé na lokalitě odběru u TEP kolena i kyčle.

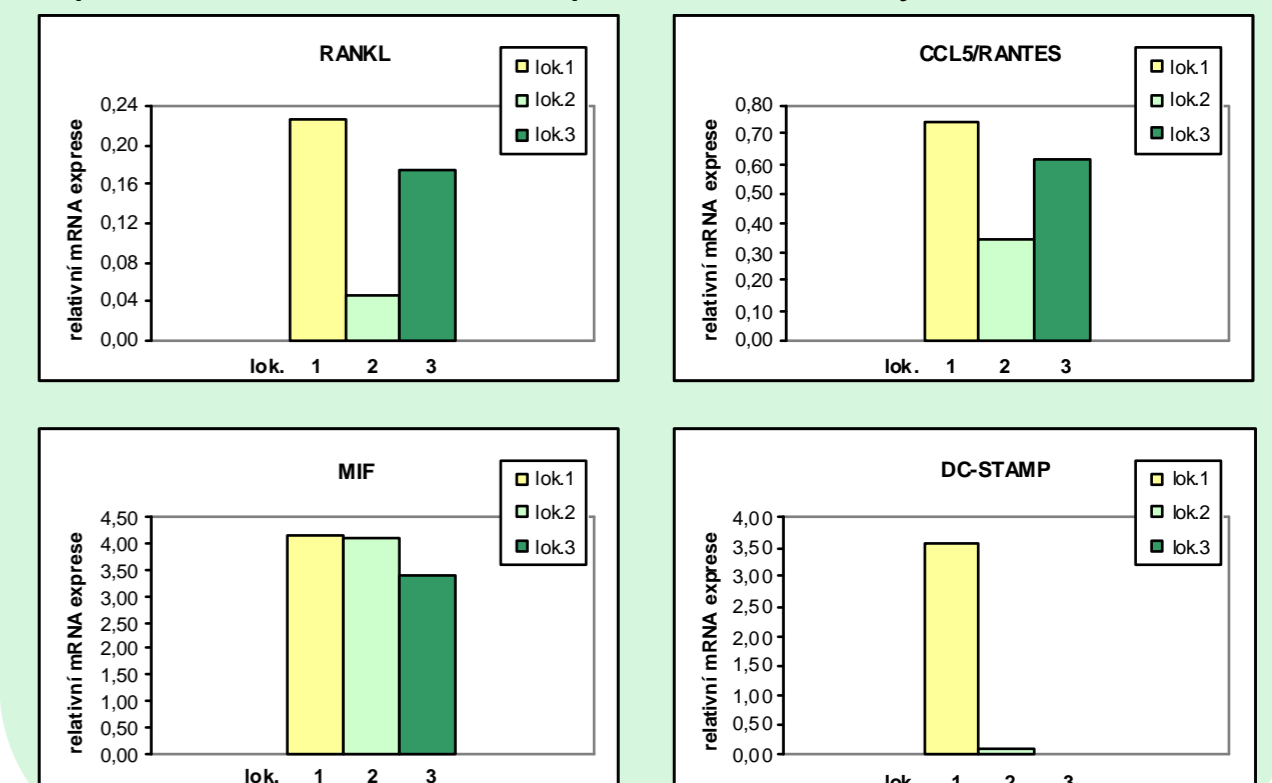
a) V případě **TEP kyčle** byla zjištěna nejvyšší mRNA exprese všech studovaných molekul ve vzorcích tkáně odebraných v místě kontaktu s endoprotézou (lok.1) ve srovnání se vzdálenějšími lokalitami 2,3 (**Obr. 3**).

b) V případě **TEP kolena** byla nejvyšší mRNA exprese genů CCL5, MIF a RANKL ve vzorcích odebraných z lok.1 vs. lok. 2 a 3; pouze u genu DC-STAMP byla pozorována zvýšená exprese ve vzdálenějších lokalitách 2 a 3 ve srovnání s místem kontaktu tkáně s TEP (**Obr. 4**).

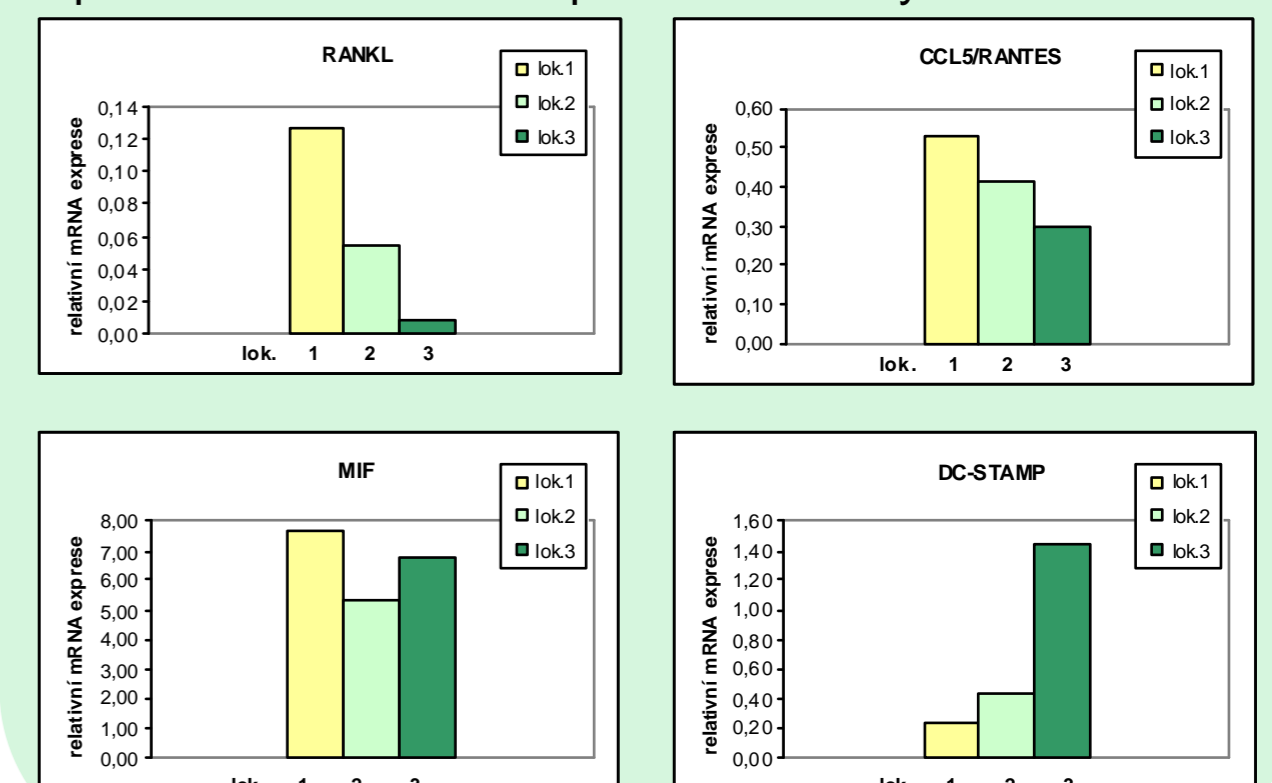
Obr.1: Analýza kvality a kvantity izolované RNA pomocí Agilent systému-reprezentativní výsledek



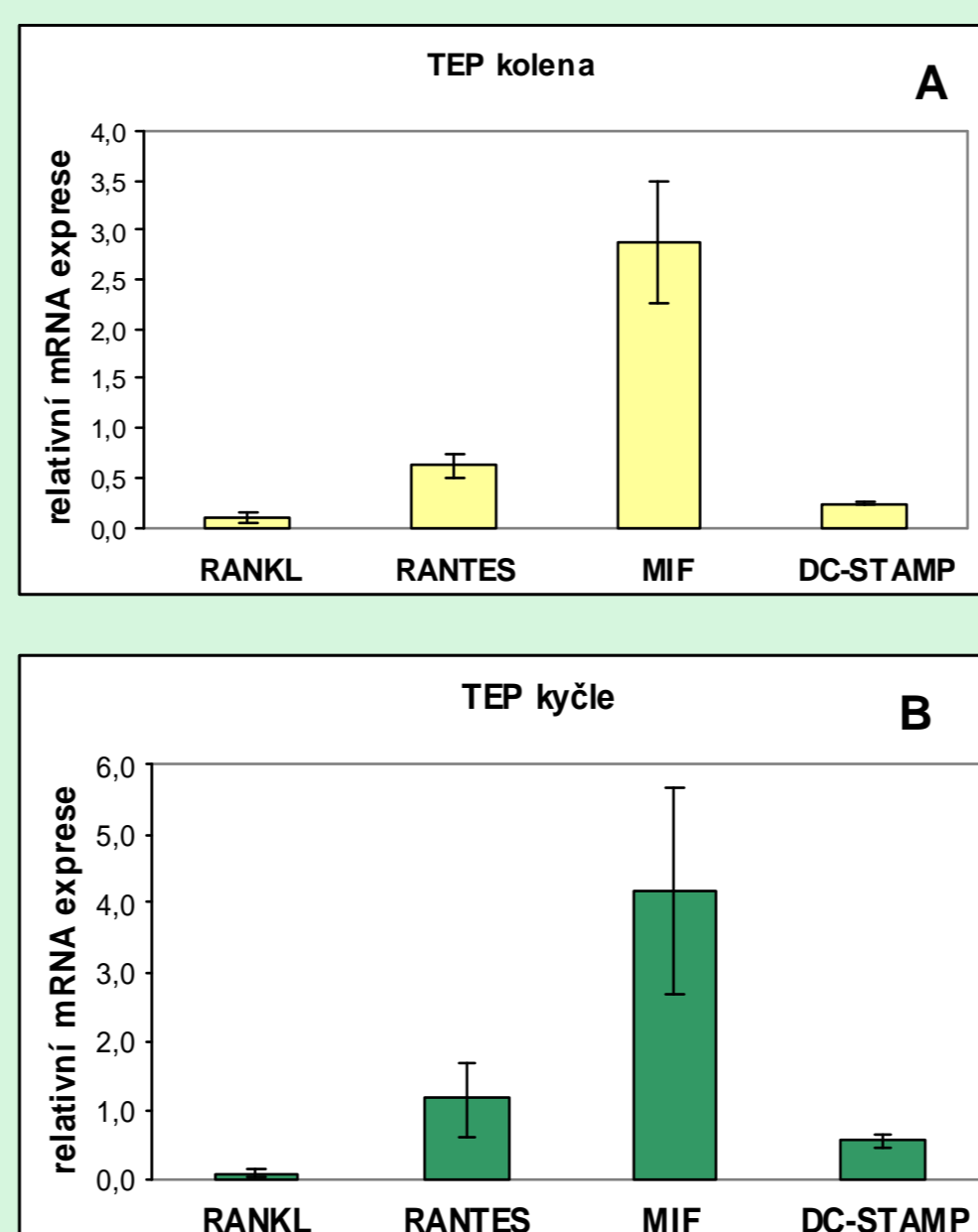
Obr.3: Relativní mRNA exprese studovaných molekul u pacienta s TEP kyčle ve tkáních podle místa odběru -reprezentativní výsledek.



Obr.4: Relativní mRNA exprese studovaných molekul u pacienta s TEP kolena ve tkáních podle místa odběru -reprezentativní výsledek.



Obr.2: Relativní mRNA exprese studovaných molekul u pacientů s TEP kolena (A) a kyčle (B). Výsledky jsou uvedeny jako relativní genová exprese ± SD



Závěr

Naše data ukazují, že kvantitativní RT-PCR je pro svou citlivost a přesnost vhodnou metodou pro sledování genové exprese kandidátních molekul v periprotetických tkáních pacientů se selháním TEP.

Naše pilotní experimenty naznačují důležitost volby a standardizace místa odběru tkáně pro získání relevantních výsledků.