

НЕВРОЛОГИЯ И НЕЙРОХИРУРГИЯ NEUROLOGY AND NEUROSURGERY

АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В *LIGAMENTUM FLAVUM* ПАЦИЕНТОВ СО СТЕНОЗИРУЮЩИМИ ПРОЦЕССАМИ ПОЗВОНОЧНОГО КАНАЛА И ДУРАЛЬНОГО МЕШКА

Родионова Л.В.^{1,2},
Самойлова Л.Г.¹,
Сороковиков В.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

² Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (664049, г. Иркутск, Юбилейный, 100, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Родионова Любовь Викторовна,
e-mail: greidmacho@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Получены новые данные по экспрессии генов металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов (ММР-1, ММР-2, ММР-3, ММР-8, ММР-9, ТИМР-1 и ТИМР-2) в *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном уровне. Выявлены особенности метаболизма внеклеточного матрикса (ВКМ). Полученные данные сопоставлены с ранее исследованными генами-кандидатами. Произведён поиск взаимосвязей с особенностями метаболических характеристик внеклеточного матрикса.

Цель работы. Изучить экспрессию генов металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в интраоперационных биоптатах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозами позвоночного канала и дурального мешка в поясничном отделе позвоночника.

Материалы и методы. Обследована группа из 33 человек со стенозами позвоночного канала и дурального мешка, локализованными в поясничном отделе (17 женщин и 16 мужчин; средний возраст – 45,73 ± 1,95 года). Из интраоперационных биоптатов *Ligamentum flavum* выделяли РНК и после проведения обратной транскрипции ставили ПЦР со специфичными праймерами.

Результаты. В *Ligamentum flavum* при стенозирующих процессах позвоночного канала и дурального мешка обнаружены повышенная активность ММР-1 и недостаточный ответ на это ТИМР-1 и ТИМР-2; экспрессия ММР-1 возрастала синхронно с *Dio2*, и оба гена снижали свою активность с увеличением возраста пациента. У пациентов с наличием оссификации *Ligamentum flavum* более активно экспрессировался ген ММР-8 и снижался синтез мРНК гена ММР-9 по сравнению с подгруппой без оссификации.

Ключевые слова: стеноз позвоночного канала, *Ligamentum flavum*, экспрессия генов, металлопротеиназы, ММР-1, ММР-2, ММР-3, ММР-8, ММР-9, ТИМР-1, ТИМР-2, тканевые ингибиторы металлопротеиназ

Статья поступила: 23.11.2021

Статья принята: 06.12.2021

Статья опубликована: 28.12.2021

Для цитирования: Родионова Л.В., Самойлова Л.Г., Сороковиков В.А. Активность генов матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(6-2): 58-72. doi: 10.29413/ABS.2021-6.6-2.7

ACTIVITY OF GENES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN THE *LIGAMENTUM FLAVUM* OF PATIENTS WITH STENOSING PROCESSES IN SPINAL CANAL AND DURAL SAC

Rodionova L.V.^{1,2},
Samoilova L.G.¹,
Sorokovikov V.A.^{1,2}

¹ Irkutsk Scientific Centre
of Surgery and Traumatology
(Bortsov Revolyutsii str. 1, Irkutsk
664003, Russian Federation)

² Irkutsk State Medical Academy
of Postgraduate Education –
Branch Campus of the Russian
Medical Academy of Continuing
Professional Education (Yubileyniy 100,
Irkutsk 664049, Russian Federation)

Corresponding author:
Lyubov V. Rodionova,
e-mail: greidmacho@yandex.ru

ABSTRACT

New data have been obtained for assessing the expression of genes of metalloproteinases and their tissue inhibitors (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2) in the *Ligamentum flavum* in patients with lumbar stenosis of spinal canal and dural sac. The features of the metabolism of the extracellular matrix (ECM) were revealed, the data obtained were compared with those for previously studied candidate genes. The search for relationships with the features of the ECM metabolic characteristics was carried out.

The aim. To study the expression of genes of metalloproteinases and their tissue inhibitors in intraoperative biopsies of the *Ligamentum flavum* of patients with lumbar stenosis of the spinal canal and dural sac.

Materials and methods. A group of 33 people (17 women, 16 men) with lumbar stenosis of the spinal canal and dural sac was studied; the average age is 45.73 ± 1.95 years. RNA was isolated from intraoperative biopsies of the *Ligamentum flavum*, reverse transcription was performed, and PCR using specific primers was performed.

Results. In *Ligamentum flavum* of patients with stenosing processes of the spinal canal and dural sac, an increased activity of MMP-1 and insufficient response of TIMP-1 and TIMP-2 were found; the expression of MMP-1 increased synchronously with Dio2, and both genes decreased their activity with increasing age of the patient. In patients with *Ligamentum flavum* ossification, the MMP-8 gene was more actively expressed, and the synthesis of the mRNA of the MMP-9 gene decreased compared to the subgroup without ossification.

Key words: spinal canal stenosis, *Ligamentum flavum*, gene expression, metalloproteinases, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, tissue inhibitors of metalloproteinases

Received: 23.11.2021
Accepted: 06.12.2021
Published: 28.12.2021

For citation: Rodionova L.V., Samoilova L.G., Sorokovikov V.A. Activity of genes of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the *Ligamentum flavum* of patients with stenosing processes in spinal canal and dural sac. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(6-2): 58-72. doi: 10.29413/ABS.2021-6.6-2.7

ВВЕДЕНИЕ

В изучении механизмов и закономерностей развития дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника ещё достаточно много неисследованных областей. Так, опубликовано мало исследований, посвящённых биологическим субстратам, формирующим очаг патологии, и проведённых с применением современных молекулярно-генетических методов.

Ткани межпозвоночных дисков уникальны тем, что являются одними из немногих тканей организма, выполняющих функции, тесно связанные с составом их внеклеточного матрикса (ВКМ). При дегенерации межпозвоночных дисков прогрессируют уменьшение объёма и изменение качественного состава ВКМ. Эта потеря часто связана с усилением внеклеточного катаболизма при увеличении активности металлопротеиназ и провоспалительных цитокинов, а также есть веские доказательства того, что дегенерация диска связана с нарушением регуляции ферментов, участвующих в биосинтезе гликозаминогликанов [1].

В настоящее время исследователи показывают, что потеря внеклеточного матрикса является одним из ранних проявлений дегенерации межпозвоночных дисков [2]. Дегенерация межпозвоночного диска является каскадной реакцией, вызванной изменением микроокружения пульпозного ядра и дисбалансом синтеза/катаболизма внеклеточного матрикса. Недавно появились работы, доказывающие, что в процессе дегенерации диска увеличивается экспрессия матриксных металлопротеиназ, что облегчает катаболизм внеклеточного матрикса и приводит к дегенеративно-дистрофической патологии позвоночника [2, 3].

Матриксные металлопротеиназы (MMPs, metalloproteinases) составляют семейство внеклеточных ферментов – цинк-зависимых эндопептидаз. В результате своей ферментативной активности они способны разрушать все типы белков внеклеточного матрикса, таким образом выполняя свою роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, механизмах апоптоза, а также в сдерживании роста опухолей. Они также задействованы в расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптозных лигандов и в активации и деактивации хемокинов и цитокинов [4, 5, 6].

Также при многих как нормальных, так и патологических процессах происходит ремоделирование внеклеточного матрикса. В норме выработка протеаз и их ингибиторов – тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases) – уравновешена. В живом организме активность MMPs контролируется на нескольких уровнях. Обычно эти ферменты экспрессируются в очень небольших количествах, и их транскрипция регулируется как в положительную, так и в отрицательную сторону гормонами, цитокинами и факторами роста (IL-1, IL-4, IL-6), трансформирующими факторами роста (EGF, HGF, TGF β) или фактором некроза опухолей альфа (TNF- α , tumor necrosis factor α). Некоторые из этих молекул в свою очередь могут инактиви-

роваться протеолитическим путём посредством MMPs (эффект обратной связи) [7].

Активировать систему MMPs может любое повреждение, инфекция через активацию образования свободных радикалов и/или недостаточную их инактивацию. Активация MMPs свободными радикалами осуществляется прямым действием супероксида на аллостерический центр фермента и активацией фактора транскрипции NF- κ B, повышающего транскрипцию генов MMPs [8].

Известно, что половые стероиды (эстрогены и особенно прогестерон) контролируют продукцию и активность MMPs через разветвлённую сеть локальных регуляторов, включая цитокины [9].

Таким образом, развитие нарушений метаболизма соединительной ткани включает активацию MMPs, и это изменение является одним из ключевых событий в развитии дегенеративно-дистрофических заболеваний опорно-двигательного аппарата. Генетически детерминированные особенности этих процессов могут ограничивать индивидуальные колебания, а также выраженность и скорость дегенерации ВКМ. В связи с вышесказанным была поставлена **цель исследования** – изучить экспрессию генов металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в интраоперационных биоптатах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном отделе позвоночника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования интраоперационных образцов жёлтой связки проведены в группе пациентов со стенозами позвоночного канала и дурального мешка, локализованными в поясничном отделе, – 33 человека (17 женщин и 16 мужчин); средний возраст – 45,73 \pm 1,95 года. Больные включались в исследование методом сплошной выборки. Биоптаты *Ligamentum flavum*, собранные интраоперационно, замораживали в жидком азоте, гомогенизировали и экстрагировали из них РНК. После проведения обратной транскрипции с комплементарной ДНК ставили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с применением реагентов Promega (США) и термоциклера CFX96 (Biorad, США); со специфичными праймерами RealTimePrimers.com (табл. 1) и интеркалирующими красителями FAM и HEX (Promega, США). Контроль специфичности синтеза проводили по кривым плавления ампликонов. Для их построения после проведения ПЦР реакционную смесь с наработанными ампликонами нагревали при непрерывном измерении флуоресценции. При достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается, что позволяет выявить эту точку. Каждое резкое уменьшение флуоресценции соответствует количеству разных типов ампликонов. Для более наглядного представления этих данных проводили дифференциальный анализ кривой плавления с помощью встроенного программного обеспечения CFX96 (BioRad, США). В качестве генов домашнего хозяйства использовали *ACTB* (Actin beta), *GADP*

(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *RPL13A* (Ribosomal protein L13a), *B2M* (Beta-2-microglobulin). С помощью встроенного программного обеспечения BioRad рассчитывали «пороговый» цикл и другие параметры, необходимые для интерпретации полученных данных. Для стандартизации применён оказавшийся наименее вариабельным для этих образцов *ACTB*. Значения, отражающие экспрессию генов, выражали в виде частного пороговых циклов исследуемого гена и гена домашнего хозяйства

$$\left(\frac{C_t \text{ гена}}{C_t \text{ ACTB}} \right)$$

для стандартизации и сопоставимости данных. По результатам рассчитывали медиану, 5-й и 95-й перцентили, статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Более подробная методика подготовки образцов описана ранее [10]. Для интегральной оценки дополнительно использовали данные, полученные и опубликованные ранее [10, 11, 12].

Перечень исследуемых генов и краткая информация, которой руководствовались при выборе [13], приведены в таблице 2. Дополнительно критериями выбора генов-кандидатов также являлись: недостаточная изученность механизмов влияния на развитие дегенеративно-дистрофических процессов соединительной ткани; доказанное и/или потенциальное участие в метаболизме соединительной ткани; участие в регуляции активности локального метаболизма; влияние на процессы оссификации и пролиферации (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1
ПРАЙМЕРЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ ПЦР

Название	Референтная последовательность мРНК в базе данных Gene Bank [13]	Описание	Прямой праймер	Обратный праймер
MMP-1	NM_002421	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	AGCCATCACTTACCTTGCACT	CTGGGAAGCTGTGAGACACC
MMP-2	NM_004530	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	AACATACAAAGGGATTGCCAGG	CCGGGGAAGCTTGTGATGATGGG
MMP-3	NM_002422	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	TGAGGACACCAGCATGAACC	ACTTCGGGATGCCAGGAAAG
MMP-8	NM_002424	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	CCCTGAAGACGCTTCCATTC	TCCAGGTAGTCCTGAACAGTTTTT
MMP-9	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	TTTGAGTCCGGTGGACGATG	GCTCCTCAAAGACCGAGTCC
TIMP-1	NM_003254.2	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TTCTGCACTGATGGTGGGTG	GAACCTTGGCCCTGATGACGA
TIMP-2	NM_003255	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	TGCTTTATCCGGGCTTGTGT	GCTTCGGTTTCATTGCGTGT

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведённых исследований выявлено, что в тканях жёлтой связки пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка позвоночного канала экспрессируются металлопротеиназы-1, -2, -3, -8, -9, а также их тканевые ингибиторы TIMP-1 и TIMP-2. Подробные данные приведены в таблице 3. Для оценки полученной информации проведено предварительное ранжирование по активности выявленной экспрессии исследуемых генов. Весь диапазон полученных значений (кратности C_t , соответствующей величине *ACTB*) для каждого гена был разбит на три равных отрезка, соответствующих активной (первая треть от разницы максимального и минимального размахов), средней (средняя треть от разницы максимального и минимального размахов) и низкой экспрессии (нижняя треть разницы максимального и минимального размахов). Разница минимального и максимального значений вычислялась вычитанием минимального значения из максимального. Эти значения приведены в нижних строках таблицы 3.

Абсолютно во всех образцах (100 %) *Ligamentum flavum* была обнаружена высокая активность только одного гена – *MMP-1* (если не считать гены «домашнего хозяйства» *ACTB*, *GADP*, *RPL13A*). Ген *ACTB* выбран для стандартизации данных как наименее вариабельный, экспрессирующийся на стабильном уровне для всех образцов.

TABLE 1
PRIMERS USED FOR PCR

ТАБЛИЦА 2

ПЕРЕЧЕНЬ ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ БЫЛА ОПРЕДЕЛЕНА В ЖЁЛТОЙ СВЯЗКЕ ПАЦИЕНТОВ СО СТЕНОЗИРУЮЩИМИ ПРОЦЕССАМИ ПОЗВОНОЧНОГО КАНАЛА И ДУРАЛЬНОГО МЕШКА НА ПОЯСНИЧНОМ УРОВНЕ

TABLE 2

LIST OF GENES, THE EXPRESSION OF WHICH WAS DETERMINED IN THE YELLOW LIGAMENT OF PATIENTS WITH STENOSING PROCESSES OF THE SPINAL CANAL AND DURAL SAC AT THE LUMBAR LEVEL

Ген	Кластер MMP-генов (локализация 11q22.3)
<i>MMP-1</i>	Кодирует секретлируемый фермент, который расщепляет интерстициальные коллагены, типы I, II, и III. Ген является частью кластера MMP-генов, которые локализируются в хромосоме 11q22.3 [13].
<i>MMP-2</i>	Кодирует фермент, расщепляющий коллаген IV типа, главный структурный компонент базальных мембран. Фермент играет важную роль в регулировании васкуляризации и воспалительной реакции [13].
<i>MMP-3</i>	Кодирует фермент, расщепляющий фибронектин, ламинин, коллагены III, IV, IX и X типов и протеогликаны хряща, участвует в заживлении ран, а также в прогрессировании атеросклероза и инициации опухоли [13].
<i>MMP-8</i>	Фермент, кодируемый этим геном, локализуется во вторичных гранулах внутри нейтрофилов и активируется аутолитическим расщеплением. Его функция заключается в деградации коллагенов I, II и III типов [13].
<i>MMP-9</i>	Фермент, кодируемый этим геном, расщепляет коллагены IV и V типов, участвует в IL-8-индуцированной мобилизации гемопоэтических клеток-предшественников из костного мозга, ремоделировании ткани [13].
<i>TIMP-1</i>	Кодирует естественные ингибиторы MMPs, участвующие в деградации внеклеточного матрикса. В дополнение к своей ингибирующей роли в отношении большинства известных MMP способен стимулировать пролиферацию в широком диапазоне типов клеток, а также имеет антиапоптозную функцию. Транскрипция этого гена индуцируется в ответ на многие цитокины и гормоны [13].
<i>TIMP-2</i>	В дополнение к ингибирующей активности в отношении металлопротеиназ кодируемый белок имеет уникальную роль – непосредственно подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток. В результате кодируемый белок может иметь решающее значение для поддержания гомеостаза ткани путём подавления пролиферации покоящихся тканей в ответ на ангиогенные факторы и ингибирования протеаз в тканях, подвергающихся ремоделированию внеклеточного матрикса. Предполагают, что <i>TIMP-2</i> относится к числу генов-супрессоров метастазирования (при избыточной экспрессии <i>TIMP-2</i> способность опухоли к инвазивному росту падает, а при утрате этого гена инвазивность опухоли возрастает). Возможно, это связано с его ангиогенной активностью [13].

Таким образом, в *Ligamentum flavum* наиболее активен MMP-1; в таблице 3 и на рисунке 1 видно, что у всех без исключения пациентов выявлена его активная экспрессия, случаев «молчания» этого гена не было. Кроме того, уровень экспрессии также находился на более высоком уровне, по крайней мере по сравнению с MMP-3, MMP-9 и *TIMP-1* и *TIMP-2* (см. табл. 3, рис. 3). Обнаруженная нами увеличенная активность MMP-1 в жёлтой связке хорошо согласуется с данными литературы, свидетельствующими о том, что *MMP-1* может быть использован в качестве показателя дегенерации межпозвоночных дисков [14]. Известно также, что избыточная экспрессия *MMP-1*, индуцируемая IL-1β, играет важную роль в воспалительном процессе дегенерации поясничного фасеточного сустава [15].

Профиль экспрессии генов металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов *TIMP-1* и *TIMP-2* в интраоперационных биоптатах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном уровне представлен на рисунке 1. По величине планок погрешностей видно, что внутри группы имеется гетерогенность по активности генов-кандидатов. Поэтому чтобы оценить соотношения и взаимозависимости экспрессии, образцы были ранжированы по наиболее гетерогенным показателям. Весь диапазон изменений подразделяли на три равных отрезка, соответствующих активной, средней и низкой экспрессии (см. табл. 3, рис. 2).

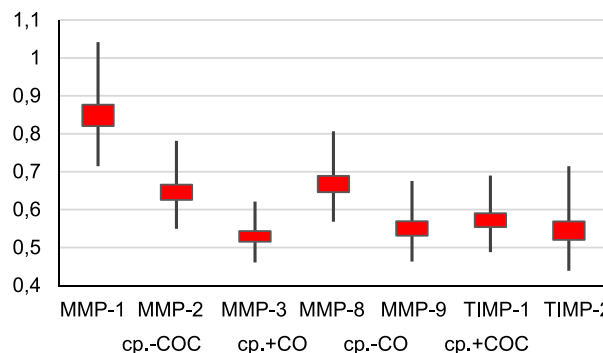


РИС. 1. Профиль экспрессии генов MMPs, *TIMP-1* и *TIMP-2* в интраоперационных биоптатах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном уровне (n = 33): по оси ординат – обратные величины от частного порогового цикла C_t гена и C_t АСТВ:

$$\frac{1}{C_t \text{ гена-кандидата}} / C_t \text{ АСТВ}$$

FIG. 1. Expression profiles of MMPs, *TIMP-1* and *TIMP-2* genes in intraoperative biopsies of the *Ligamentum flavum* of patients with lumbar stenosis of spinal canal and dural sac (n = 33): the ordinate is the reciprocal of the partial threshold cycle C_t of gene and ACTB

$$\frac{1}{C_t \text{ candidate gene}} / C_t \text{ ACTB}$$

ТАБЛИЦА 3
СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДАННЫХ
ПО ЭКСПРЕССИИ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ
ИНГИБИТОРОВ В ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ОБРАЗЦАХ
ЖЁЛТОЙ СВЯЗКИ

TABLE 3
STATISTICAL CHARACTERISTICS OF THE DATA
ON THE EXPRESSION OF METALLOPROTEINASES
AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN INTRAOPERATIVE
LIGAMENTUM FLAVUM SAMPLES

Показатель	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Количество наблюдений (n)	33	32	31	29	30	28	28
Среднее арифметическое значение (C _p)	1,18	1,55	1,89	1,50	1,82	1,75	1,84
Стандартное отклонение	0,22	0,27	0,28	0,26	0,34	0,30	0,44
Стандартная ошибка среднего значения	0,039	0,048	0,050	0,048	0,063	0,056	0,082
Медиана	1,170	1,567	1,949	1,437	1,792	1,764	1,830
1-й квартиль	1,023	1,386	1,680	1,307	1,502	1,665	1,487
3-й квартиль	1,379	1,695	2,033	1,652	2,103	1,916	2,172
4-й квартиль	1,579	2,03	2,616	2,074	2,389	2,377	2,926
5-й процентиль	0,80	1,01	1,44	1,12	1,37	1,25	1,21
95-й процентиль	1,48	1,95	2,27	1,94	2,38	2,16	2,38
Экссесс	-0,71	-0,10	0,26	-0,49	-1,17	0,78	-0,13
Асимметрия	-0,15	-0,36	0,16	0,44	0,22	-0,48	0,33
Минимальное значение	0,720	0,972	1,386	1,117	1,317	0,987	1,078
Максимальное значение	1,579	2,030	2,616	2,074	2,389	2,377	2,926
Размах (мин. – макс.)	0,860	1,058	1,230	0,957	1,072	1,39	1,848
«Высокий» диапазон	0,720–1,006 (n = 11)	0,972–1,325 (n = 7)	1,386–1,796 (n = 10)	1,117–1,436 (n = 14)	1,317–1,674 (n = 11)	0,987–1,45 (n = 4)	1,078–1,694 (n = 10)
«Средний» диапазон	1,007–1,293 (n = 12)	1,326–1,677 (n = 15)	1,797–2,206 (n = 18)	1,437–1,755 (n = 11)	1,675–2,032 (n = 10)	1,451–1,914 (n = 17)	1,695–2,310 (n = 14)
«Низкий» диапазон	1,294–1,579 (n = 10)	1,678–2,030 (n = 10)	2,207–2,616 (n = 3)	1,756–2,074 (n = 4)	2,033–2,389 (n = 9)	1,915–2,377 (n = 7)	2,311–2,926 (n = 4)
«Молчание»	0	1	2	4	3	5	5

На рисунке 2 видно, что наименее активными являются гены тканевых ингибиторов MMPs, особенно TIMP-2.

Характеристика активности экспрессии генов, кодирующих матричные металлопротеиназы и тканевые ингибиторы металлопротеиназ в интраоперационных образцах *Ligamentum flavum* пациентов, более наглядно представлена на рисунке 3. Гены представлены в порядке убывания их активности. Некоторая недостаточность синтеза TIMP, очевидно, имеет место, так как в 5 (15,1 %) случаях из 33 каждый из ферментов TIMP не проявлял свою активность, а вернее, не нарабатывалась мРНК, с которой он и/или его предшественник мог бы в последующем синтезироваться. Таким образом, известный механизм контроля активности MMPs с помощью образования комплекса MMPs – TIMP-1 для противодействия разрушения ВКМ [9] в данном случае, по-

видимому, не работал. Данные литературы сообщают о том, что TIMP-1 и TIMP-2 всё же играют роль в гипертрофии гладкой связки у пациентов со стенозом позвоночника, но это, скорее, является локальным явлением, а не системным [16].

Изменение баланса между экспрессией MMPs и активностью их ингибиторов TIMP-1 и TIMP-2, несомненно, действует на процессы деградации макромолекул матрикса и может приводить к изменению их количественного и качественного составов.

Подробно данные представлены в таблице 4. Из таблицы видно, что стандартная ошибка среднего для MMPs и TIMPs имеет самые маленькие величины из всех приведённых здесь генов. Возможно, это может быть связано с их важной ролью в данном субстрате.

Проведён анализ экспрессии генов-кандидатов при разделении пациентов на подгруппы по наличию/

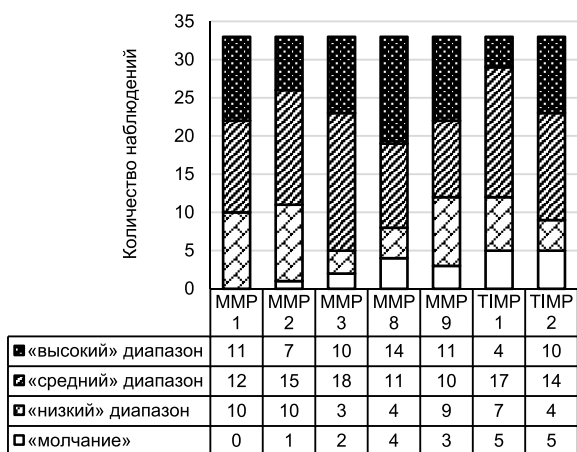


РИС. 2.
Распределение на диапазоны по активности экспрессии генов металлопротеиназ и их ингибиторов в ткани *Ligamentum flavum* (n = 33)

FIG. 2.
Distribution into ranges according to the activity of expression of genes of metalloproteinases and their inhibitors in the *Ligamentum flavum* tissue

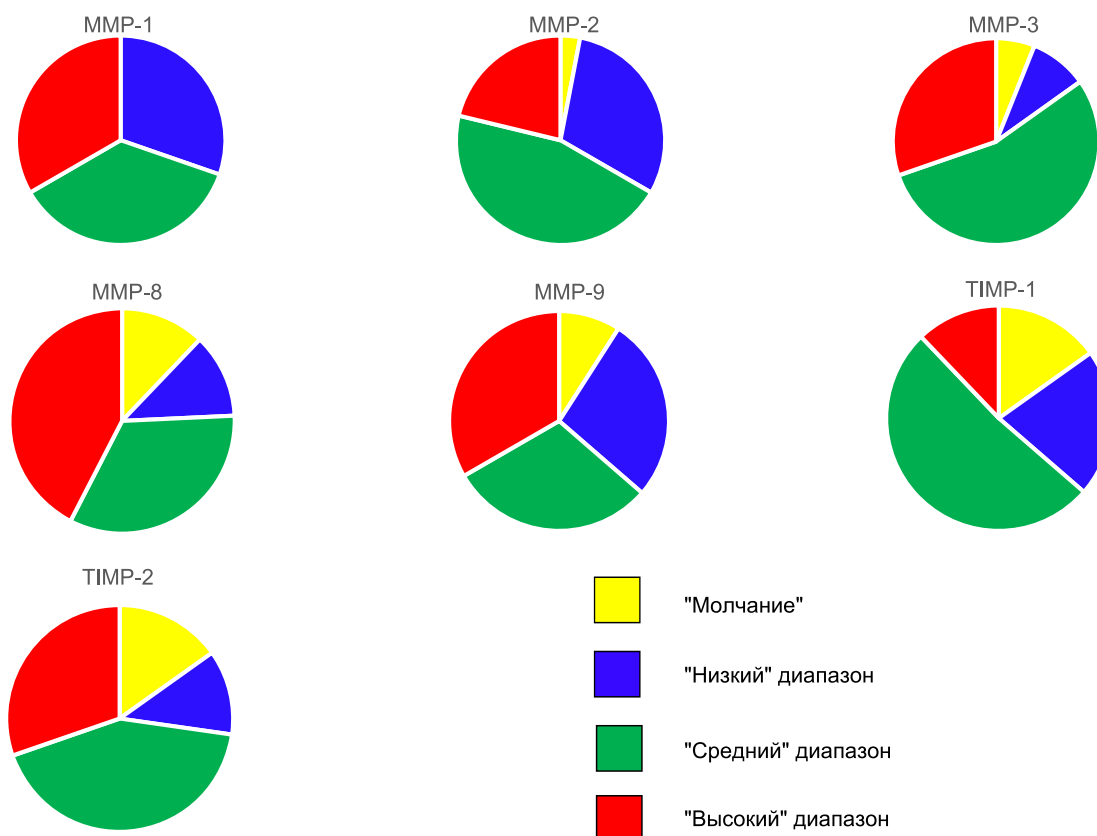


РИС. 3.
Характеристика активности экспрессии генов, кодирующих матричные металлопротеиназы и тканевые ингибиторы металлопротеиназ в интраоперационных образцах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном уровне (n = 33)

отсутствию оссификации жёлтой связки (рис. 4). Подробно о разделении по признакам оссификации написано нами ранее [10]. Не было получено статистически значимых различий по большинству генов между пациентами с наличием и отсутствием выраженной оссификации жёлтой связки. Однако при сравнении уровня экспрессии MMPs и TIMPs в ткани *Ligamentum flavum* в группах без оссификации жёлтой связки и с признаками оссификации (табл. 5, 6; рис. 4) было обнаружено, что в группе с элементами оссификации жёлтой связки была более активна экспрессия MMP-8 и менее выражен синтез мРНК MMP-9 ($p < 0,05$). Другими словами, развитие оссификации было сопряжено с возрастанием экспрессии MMP-8, что косвенно может свидетельствовать о создании условий для усиления деградации коллагенов I–III типов и убыванием экспрессии MMP-9, которое сложно интерпретировать однозначно. На первые четыре типа коллагена приходится более 90 % всего коллагена организма. Всего на нынешний момент известно более 28 типов. MMP-9 может разрушать коллагены IV и V типов, а также участвовать в ремоделировании тканей. Возможно, в данном случае гетеротопическая ос-

FIG. 3.
Characteristics of the activity of expression of genes encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in intraoperative *Ligamentum flavum* samples from patients with lumbar stenosis of spinal canal and dural sac (n = 33)

ТАБЛИЦА 4
ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫЯВЛЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ В ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ОБРАЗЦАХ *LIGAMENTUM FLAVUM* И СОПОСТАВЛЕНИЕ С СИНТЕЗОМ МРНК МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ

TABLE 4
CHARACTERISTICS OF THE EXPRESSION OF CANDIDATE GENES IN INTRAOPERATIVE SAMPLES OF *LIGAMENTUM FLAVUM* AND COMPARISON WITH THE SYNTHESIS OF MRNA OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS

Обозначение гена	Количество наблюдений (n)	Среднее арифметическое значение порогового цикла (C _t ср.) после стандартизации	Стандартное отклонение	Ошибка среднего арифметического, выраженная в процентах от среднего арифметического значения	Процент выявления от численности исследуемой совокупности биоптатов
<i>CALCR</i>	32	1,460	0,237	16,27	97
<i>ESR1</i>	32	1,141	0,110	9,63	97
<i>ESR2</i>	33	1,282	0,175	13,63	100
<i>FGFR1</i>	33	1,460	0,493	33,80	100
<i>FGFR3</i>	33	1,645	0,257	15,61	100
<i>GDF5</i>	23	2,015	0,654	32,47	69,7
<i>PDGFA</i>	31	1,429	0,467	32,67	93,9
<i>PDGFB</i>	32	1,453	0,322	22,16	97
<i>PTH1R</i>	33	1,658	0,255	15,38	100
<i>PTH2R</i>	33	1,441	0,212	14,73	100
<i>MMP-1</i>	33	1,179	0,222	3,31	100
<i>MMP-2</i>	32	1,545	0,272	3,11	96,97
<i>MMP-3</i>	31	1,888	0,280	2,65	93,94
<i>MMP8</i>	29	1,497	0,259	3,21	87,88
<i>MMP-9</i>	30	1,819	0,342	3,46	90,91
<i>TIMP-1</i>	28	1,746	0,299	3,21	84,85
<i>TIMP-2</i>	28	1,844	0,436	4,45	84,85
<i>ACTB*</i>	33	1	0	0,00	100
<i>GADP</i>	33	1,070	0,082	7,68	100
<i>RPL13A</i>	33	0,974	0,104	10,70	100

Примечание. * – выбран для стандартизации данных как наименее вариабельный, экспрессирующийся на стабильном уровне для всех образцов.

сификация жёлтой связки происходит при недостаточном синтезе MMP-9. Данный факт можно использовать для возможной разработки новой медицинской технологии для диагностики развития оссификатов.

Разделение на группы по гендерному признаку не повлекло возникновения различий в экспрессии изучаемых генов (табл. 7, 8).

При проведении корреляционного анализа выявлены структуры сетевых взаимодействий, отражающие метаболизм соединительной ткани в *Ligamentum flavum* (табл. 9).

MMP-1 была наиболее активно экспрессирующей металлопротеиназой, возрастала синхронно с дейодиназой 2-го типа (Dio2) и была связана отрицательной

ТАБЛИЦА 5
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЭКСПРЕССИИ,
ПОЛУЧЕННЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ
БЕЗ ПРИЗНАКОВ ОССИФИКАЦИИ *LIGAMENTUM FLAVUM*

TABLE 5
QUANTITATIVE EXPRESSION PARAMETERS OBTAINED
FOR A GROUP OF PATIENTS WITHOUT SIGNS
OF *LIGAMENTUM FLAVUM* OSSIFICATION

Параметры	<i>MMP-1</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-3</i>	<i>MMP-8</i>	<i>MMP-9</i>	<i>TIMP-1</i>	<i>TIMP-2</i>
<i>n</i>	15	14	14	14	14	13	14
Среднее	1,17	1,54	1,93	1,72	1,68	1,81	1,80
Стандартное отклонение	0,21	0,31	0,28	0,16	0,32	0,29	0,36
Стандартная ошибка среднего арифметического	0,055	0,082	0,074	0,043	0,087	0,079	0,097
Медиана	1,128	1,567	1,951	1,681	1,604	1,786	1,830
1-й квартиль	0,999	1,334	1,810	1,620	1,414	1,72	1,576
3-й квартиль	1,382	1,699	2,052	1,722	2,096	1,920	2,169
4-й квартиль	1,476	1,980	2,616	2,074	2,383	2,377	2,347
5-й процентиль	0,94	1,02	1,57	1,57	1,34	1,38	1,23
95-й процентиль	1,47	1,92	2,29	2,03	2,20	2,25	2,32
Экссесс	-1,55	-0,60	2,59	0,77	-0,09	0,96	-0,16
Асимметрия	0,40	-0,43	0,61	1,11	0,85	0,04	-0,37

ТАБЛИЦА 6
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЭКСПРЕССИИ,
ПОЛУЧЕННЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ
С ПРИЗНАКАМИ ОССИФИКАЦИИ *LIGAMENTUM FLAVUM*

TABLE 6
QUANTITATIVE EXPRESSION PARAMETERS OBTAINED
FOR A GROUP OF PATIENTS WITH SIGNS OF *LIGAMENTUM*
***FLAVUM* OSSIFICATION**

Параметры	<i>MMP-1</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-3</i>	<i>MMP-8</i>	<i>MMP-9</i>	<i>TIMP-1</i>	<i>TIMP-2</i>
<i>n</i>	16	16	15	13	14	13	13
Среднее	1,18	1,56	1,85	1,28	1,97	1,66	1,87
Стандартное отклонение	0,24	0,27	0,25	0,10	0,32	0,32	0,52
Стандартная ошибка среднего арифметического	0,061	0,067	0,065	0,028	0,086	0,089	0,145
Медиана	1,190	1,605	1,940	1,307	2,039	1,706	1,784
1-й квартиль	1,10725	1,435	1,621	1,227	1,738	1,486	1,468
3-й квартиль	1,311	1,641	2,005	1,354	2,203	1,929	2,299
4-й квартиль	1,579	2,03	2,250	1,424	2,389	2,126	2,926
5-й процентиль	0,78	1,15	1,49	1,12	1,46	1,15	1,29
95-й процентиль	1,52	1,96	2,19	1,39	2,38	2,05	2,60
Экссесс	-0,16	0,47	-1,29	-0,90	-0,93	0,13	-0,56
Асимметрия	-0,49	-0,31	-0,13	-0,57	-0,34	-0,65	0,57

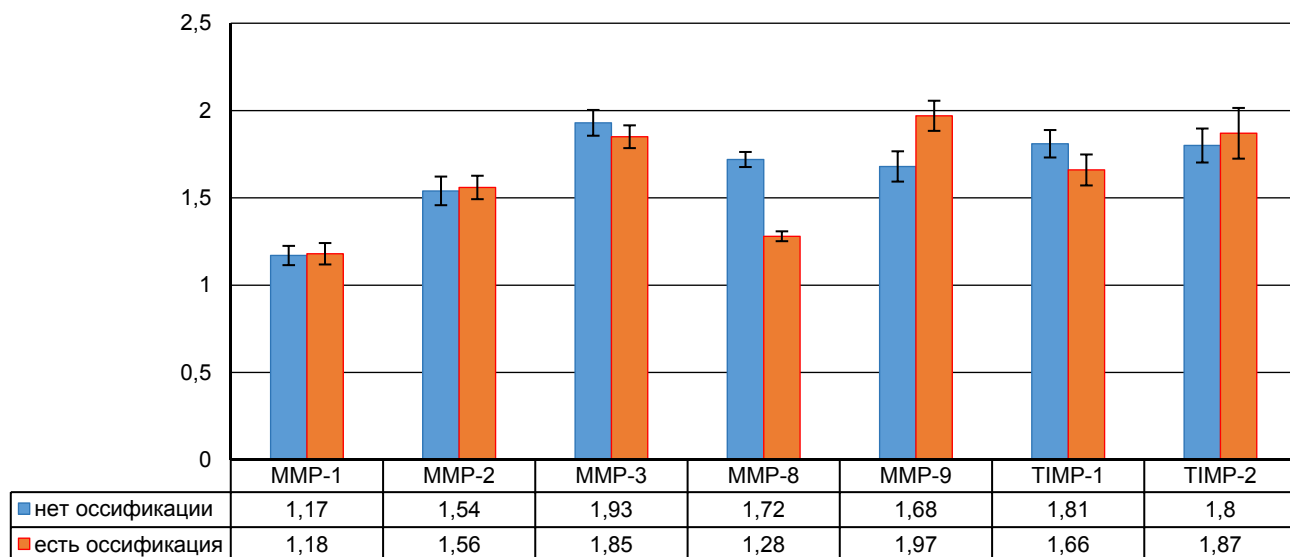


РИС. 4.

Сравнение экспрессии MMPs и TIMPs в образцах Ligamentum flavum пациентов с оссификацией и без неё: по оси ординат – C_t гена/ C_t АСТВ; * – уровень статистической значимости между сравниваемыми группами $p < 0,05$

FIG. 4.

Comparison of the MMPs and TIMPs expression in Ligamentum flavum samples from patients with and without ossification: ordinate – Ct of gene/Ct of ACTB; * – the level of statistical significance between the compared groups $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 7

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ MMPs И TIMP-1/TIMP-2 У МУЖЧИН СО СТЕНОЗИРУЮЩИМИ ПРОЦЕССАМИ ПОЗВОНОЧНОГО КАНАЛА И ДУРАЛЬНОГО МЕШКА

TABLE 7

STATISTICAL CHARACTERISTICS OF MMPs AND TIMP-1/TIMP-2 GENE EXPRESSION IN MEN WITH STENOSING PROCESSES OF SPINAL CANAL AND DURAL SAC

Параметры	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
<i>n</i>	15	14	15	14	15	12	14
Среднее	1,19	1,52	1,85	1,54	1,76	1,83	1,86
Стандартное отклонение	0,17	0,30	0,32	0,22	0,27	0,18	0,32
Стандартная ошибка среднего арифметического	0,044	0,081	0,084	0,060	0,071	0,053	0,085
Медиана	1,176	1,567	1,890	1,609	1,778	1,829	1,868
1-й квартиль	1,041	1,313	1,620	1,357	1,492	1,752	1,583
3-й квартиль	1,334	1,728	2,033	1,645	1,991	1,939	2,125
4-й квартиль	1,469	1,933	2,616	2,012	2,113	2,171	2,347
5-й процентиль	0,97	1,02	1,46	1,25	1,39	1,57	1,41
95-й процентиль	1,44	1,90	2,27	1,82	2,11	2,08	2,32
Экссесс	-1,19	-0,80	0,67	0,48	-1,71	0,75	-1,10
Асимметрия	0,26	-0,41	0,69	0,12	-0,06	-0,18	0,02

ТАБЛИЦА 8
СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ MMPs И TIMP-1/TIMP-2 У ЖЕНЩИН
СО СТЕНОЗИРУЮЩИМИ ПРОЦЕССАМИ ПОЗВОНОЧНОГО
КАНАЛА И ДУРАЛЬНОГО МЕШКА

TABLE 8
STATISTICAL CHARACTERISTICS OF MMPs
AND TIMP-1/TIMP-2 GENE EXPRESSION IN WOMEN
WITH STENOSING PROCESSES OF SPINAL CANAL
AND DURAL SAC

Параметры	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
<i>n</i>	18	18	16	15	15	16	14
Среднее	1,17	1,57	1,92	1,46	1,88	1,68	1,83
Стандартное отклонение	0,26	0,25	0,24	0,29	0,40	0,35	0,54
Стандартная ошибка среднего арифметического	0,062	0,059	0,059	0,075	0,103	0,089	0,145
Медиана	1,159	1,577	1,951	1,373	1,806	1,708	1,808
1-й квартиль	1,020	1,454	1,809	1,242	1,580	1,457	1,454
3-й квартиль	1,383	1,668	2,031	1,678	2,287	1,817	2,259
4-й квартиль	1,579	2,03	2,293	2,074	2,389	2,377	2,926
5-й процентиль	0,79	1,25	1,52	1,12	1,35	1,18	1,13
95-й процентиль	1,51	1,99	2,26	1,91	2,38	2,19	2,58
Экссесс	-1,02	1,01	0,62	-0,34	-1,57	0,12	-0,51
Асимметрия	-0,19	-0,21	-0,61	0,82	0,04	-0,07	0,44

корреляционной связью с возрастом. Между собой коррелировали только MMP-8, MMP-9 и TIMP-1. Остальные MMPs были связаны с другими показателями, но не друг с другом. Однако наибольшую сеть взаимодействий выявили именно для вышеназванных ферментов – MMP-8 и MMP-9. На рисунке 5 эта структура располагается в центре. MMP-8/MMP-9 были тесно связаны с показателями веса, объёма талии и бёдер, а также концентрации общего тироксина в сыворотке крови, активности ацетилтрансферазы 2-го типа и рецепторов к фактору роста фибробластов 3-го типа. К структуре сетевых взаимодействий MMP-8 и MMP-9 была «привязана» экспрессия TIMP-1, которая в свою очередь имела довольно обширную сеть взаимодействий, включающую показатели гормонального профиля, а также возраст и активность ацетилтрансферазы NAA20.

Однако здесь нужно отметить, что трудно определить непосредственный тип клеток биоптата, которые экспрессируют конкретные гены. Из данных литературы известно, что, помимо фибробластов и остеокластов, источником MMP-8 и MMP-9 (в том числе даже *in vitro*) также могут быть Т-лимфоциты, мононуклеары периферической крови и полиморфноядерные гранулоциты [17]. Кроме того, MMPs могут образовываться также из гранулоцитов, инфильтрирующих пространство ликвора и из паренхиматозных клеток мозговых оболочек [18].

Известно, что половые стероиды (эстрогены и особенно прогестерон) контролируют продукцию и активность MMPs через разветвлённую сеть локальных регуляторов, включая цитокины [9]. В настоящем исследовании экспрессия мРНК TIMP-2, несмотря на частые случаи «молчания», также была сопряжена с гормональным профилем (эстрадиол, общий и свободный трийодтиронин, рецепторы к паратиреоидному гормону) и, что особенно интересно, коррелировала с AANAT. Взаимосвязи с блоком ацетилтрансфераз необходимо отдельно интерпретировать с привлечением данных о полиморфизмах NAT2.

Таким образом, в результате корреляционного анализа для MMPs и TIMPs выявлены разнообразные сетевые взаимодействия с антропометрическими (вес, возраст, ИТБ, ОБ, ОТ), гормональными (половые, стрессорные стероиды, йодтиронины и ферменты, участвующие в их превращениях), а также другими метаболическими показателями.

Активность экспрессии дейодиназы 2-го типа была связана тесной корреляционной связью с наиболее активной MMP-1, обе они убывали с увеличением возраста и взаимодействовали с показателями гормонального профиля сыворотки крови. Таким образом, ранее выдвинутые нами гипотезы о том, что 1) возрастные дегенеративно-дистрофические процессы связаны со снижением локальной экспрессии Dio2, и 2) уровень секреции половых гор-

ТАБЛИЦА 9
КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ (r) МЕЖДУ
ЭКСПРЕССИЕЙ MMPs И TIMP-1/TIMP-2 И ДРУГИМИ
РАНЕЕ ИССЛЕДОВАННЫМИ ПАРАМЕТРАМИ [10, 11, 12]*

TABLE 9
CORRELATION COEFFICIENTS (r) BETWEEN
THE EXPRESSION OF MMPs AND TIMP-1/TIMP-2 AND OTHER
PREVIOUSLY STUDIED PARAMETERS [10, 11, 12]*

Параметры, с которыми проведён поиск коррелятивных связей		Экспрессия генов						
		MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Экспрессия генов металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов	MMP-1	1,000	-	-	-	-	-	-
	MMP-2	-0,074	1,000	-	-	-	-	-
	MMP-3	-0,077	-0,105	1,000	-	-	-	-
	MMP-8	-0,040	-0,134	0,047	1,000	-	-	-
	MMP-9	-0,229	0,179	0,208	-0,440	1,000	-	-
	TIMP-1	-0,301	0,314	-0,005	0,125	-0,045	1,000	-
	TIMP-2	-0,102	-0,042	0,172	-0,112	-0,104	-0,078	1,000
Антропометрические данные	Пол	0,035	-0,088	-0,137	0,166	-0,182	0,257	0,033
	Возраст	-0,662	0,011	-0,034	-0,067	0,067	0,407	0,074
	Рост	0,163	-0,094	-0,029	0,092	-0,051	0,046	0,029
	Вес	0,213	-0,075	-0,183	0,422	-0,946	0,051	0,009
	ОТ	-0,219	-0,125	-0,155	0,155	-0,655	0,036	-0,006
	ОБ	0,012	0,058	-0,295	0,223	-0,606	-0,268	-0,160
	ИТБ	0,054	-0,099	0,022	0,302	-0,174	0,200	-0,037
Экспрессия других генов	AANAT	0,057	-0,004	-0,017	-0,004	-0,038	-0,322	-0,357
	CALCR	-0,008	0,010	0,193	0,142	-0,109	-0,265	0,021
	Dio1	0,125	0,164	0,395	0,119	-0,020	-0,053	0,098
	Dio2	0,375	-0,186	-0,106	-0,059	-0,276	-0,394	0,113
	Dio3	0,123	-0,042	-0,209	0,026	0,182	-0,168	-0,205
	ESR1	-0,238	-0,366	0,006	0,030	-0,105	-0,127	0,131
	ESR2	0,243	0,218	-0,031	-0,051	-0,162	-0,088	-0,208
	FGFR1	-0,131	-0,016	0,184	-0,181	0,100	-0,272	0,110
	FGFR3	0,386	-0,204	0,055	-0,067	-0,441	-0,289	-0,067
	GDF5	-0,157	0,098	-0,004	-0,252	0,123	0,051	-0,037
	NAA20	0,158	-0,092	-0,381	-0,030	-0,158	-0,390	-0,028
	NAT1	-0,060	-0,059	-0,046	-0,058	0,089	0,138	0,027
	NAT2	0,036	0,041	-0,036	-0,374	0,397	-0,003	-0,225
	PDGFA	-0,093	0,098	-0,247	0,302	-0,234	-0,049	0,424
	PDGFB	0,054	-0,067	-0,452	-0,187	-0,243	-0,011	0,132
	PTH1R	0,180	-0,015	-0,113	0,200	-0,250	-0,069	-0,444
	PTH2R	0,140	0,001	-0,098	-0,163	-0,136	-0,245	-0,337
GADP	-0,157	-0,007	0,063	0,174	-0,029	0,375	0,154	
RPL13A	0,127	-0,288	-0,085	0,144	-0,364	-0,368	0,303	
Концентрация гормонов в сыворотке крови	Пл	0,139	-0,139	0,011	0,243	-0,101	0,170	-0,050
	ЛГ	-0,359	-0,253	0,125	-0,016	-0,274	0,330	0,183
	ФСГ	0,322	-0,080	-0,165	-0,304	-0,124	-0,166	-0,102
	ДГЭА	-0,502	0,109	0,096	-0,022	0,302	-0,006	-0,332
	Эстр.	-0,486	0,135	-0,008	0,040	0,276	0,107	-0,321
	Тс	0,367	-0,173	-0,149	-0,055	0,040	-0,387	0,092
	17-ОН	-0,015	0,094	0,089	0,147	-0,274	-0,307	0,436
	Пг	0,204	-0,115	-0,165	0,023	0,029	0,148	-0,068
	ТТГ	0,391	-0,097	-0,054	0,013	-0,111	-0,490	-0,112
	св. Т4	0,353	-0,010	0,157	-0,169	-0,149	-0,766	0,152
	св. Т3	-0,235	-0,145	-0,208	-0,212	-0,125	0,065	-0,001
	общ. Т4	-0,164	0,162	-0,097	0,201	-0,009	0,087	0,288
	общ. Т3	0,273	0,047	-0,097	-0,022	0,007	-0,261	-0,421
	атТПО	-0,126	-0,179	-0,110	-0,384	-0,074	-0,051	0,234
Кортизол	-0,193	-0,183	0,295	0,112	-0,165	0,004	0,498	

Примечание. * – анализы, не описанные в данной статье, опубликованы ранее [10, 11, 12]. Жирным шрифтом выделены коэффициенты корреляции, достигающие уровня статистической значимости (критическое значение $r = 0,35$ при числе степеней свободы $df = 31 (n - 2)$; $p < 0,05$. ОТ – объём талии; ОБ – объём бедер; ИТБ – индекс талия/бедра; Пл – пролактин; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ДГЭА – дегидроэпандростерон сульфат; Эстр. – эстрадиол; Тс – тестостерон; Пг – прогестерон; ТТГ – тиреотропный гормон; св. Т4 – свободный тироксин; св. Т3 – свободный трийодтиронин; общ. Т4 – общее содержание тироксина в сыворотке крови; общ. Т3 – общее содержание трийодтиронина в сыворотке крови; атТПО – антитела к тиреопероксидазе.

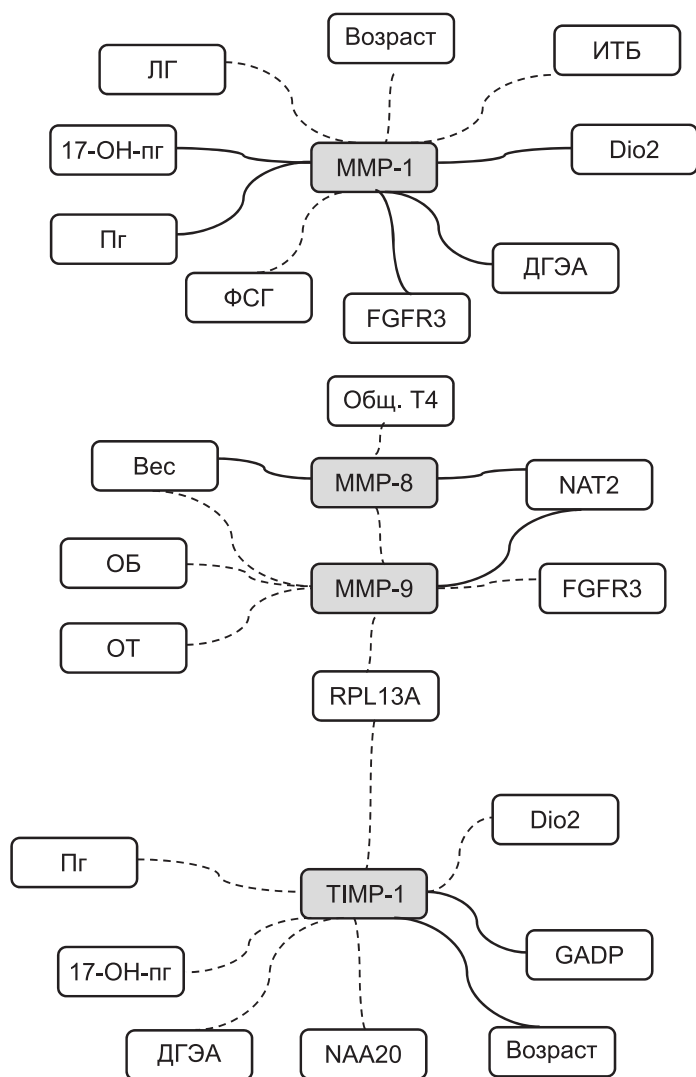


РИС. 5.

Структура корреляционных связей между экспрессией металлопротеиназ, их тканевых ингибиторов и ранее изученными аналитами [10, 11, 12]: ЛГ – лютеинизирующий гормон в сыворотке крови; ИТБ – индекс талия/бёдра; 17-OH-pg – 17-OH-прогестерон в сыворотке крови; Пг – прогестерон в сыворотке крови; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон в сыворотке крови; ДГЭА – дегидроэпандростерон сульфат в сыворотке крови; общ. Т4 – общее содержание тироксина (Т4) в сыворотке крови; ОБ – объём бёдер; ОТ – объём талии; общ. Т3 – общее содержание трийодтиронина (Т3) в сыворотке крови; св. Т3 – содержание свободного Т3 в сыворотке крови. Сплошной линией обозначены положительные коррелятивные связи, пунктиром – отрицательные.

FIG. 5.

The structure of correlations between the studied parameters and the expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors: ЛГ – luteinizing hormone in serum; ИТБ – waist/hip index; 17-OH-pg – 17-OH-progesterone in serum; Пг – progesterone in serum; ФСГ – follicle-stimulating hormone in serum; ДГЭА – dehydroepiandrosterone sulfate in serum; total Т4 – total concentration of thyroxine in serum; ОБ – hips measurement; ОТ – waist measurement; общ. Т3 – total concentration of triiodothyronine in serum; св. Т3 – free triiodothyronine in serum. A solid line indicates positive correlative relationships, and a dotted line indicates negative ones

монов влияет на метаболизм *Ligamentum flavum*, получили ещё некоторое количество аргументов в свою пользу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований выявлены локальные особенности метаболизма соединительной

ткани и равновесные отношения между металлопротеиназами и их тканевыми ингибиторами в ткани жёлтой связки пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка.

Развитие оссификации жёлтой связки было сопряжено с возрастанием экспрессии MMP-8, что косвенно может свидетельствовать об усилении дегградации коллагенов I–III типов и убыванием экспрессии MMP-9. Гендер-

ных различий в активности металлопротеиназы и их тканевых ингибиторов не обнаружено.

Наиболее активно у пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала в *Ligamentum flavum* экспрессируется MMP-1; она увеличивается синхронно с увеличением Dio2 и изменяется обратно пропорционально возрасту.

При проведении корреляционного анализа выявлены структуры сетевых взаимодействий, отражающие метаболизм соединительной ткани в *Ligamentum flavum*, вовлекающий не только металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы, но и гормоны, инициацию активного синтеза ферментов, рецепторного аппарата клеток, а также различных ацетилтрансфераз. Таким образом, метаболизм *Ligamentum flavum* состоит из большого числа сетевых взаимодействий, разнообразных звеньев биологических процессов и представляет собой единую целую, сложно регулируемую систему.

Полученные научные результаты позволяют увеличить объём знаний для более глубокого понимания механизмов и закономерностей развития дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Silagi ES, Shapiro IM, Risbud MV. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration. *Matrix Biol.* 2018; 71-72: 368-379. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.025
2. Yu L, Sun ZJ, Tan QC, Wang S, Wang WH, Yang XQ, et al. Thermosensitive injectable decellularized nucleus pulposus hydrogel as an ideal biomaterial for nucleus pulposus regeneration. *J Biomater Appl Actions.* 2020; 35(2): 182-192. doi: 10.1177/0885328220921328
3. Henry N, Clouet J, le Bideau J, le Visage C, Guicheux J. Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems. *Biotechnol Adv.* 2018; 36(1): 281-294. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.009
4. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(6): 1375-1381. doi: 10.1189/jlb.0607338
5. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Каня О.В. Матриксная металлопротеаза 9 и ремоделирование при инфаркте миокарда. *Acta biomedica scientifica.* 2013; 90(2-1): 138-141.
6. Shurygina IA, Rodionova LV, Ayushinova NI, Chepurnykh EE, Trukhan IS, Shurygin MG. The effect of the p38 MAPK inhibitor on the expression of metalloproteinases and their inhibitors during the formation of abdominal adhesions. *Int J Biomed.* 2021; (4).
7. Kamieniak P, Bielewicz J, Kurzepa J, Daniluk B, Kocot J, Trojanowski T. The impact of changes in serum levels of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 on pain perception in patients with disc herniation before and after surgery. *J Pain Res.* 2019; 12: 1457-1464. doi: 10.2147/JPR.S201199

8. Xue M, March L, Sambrook PN, Jackson CJ. Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: Relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(9): 2864-2874. doi: 10.1002/art.22844

9. Яролинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2012; LXI(1): 113-125.

10. Родионова Л.В., Самойлова Л.Г., Шурыгина И.А., Скляренко О.В., Животенко А.П., Кошкарёва З.В., и др. Особенности реакций ацетилирования у больных со стенозирующим процессом позвоночного канала и дурального мешка поясничного отдела позвоночника в зависимости от выраженности оксификации *Ligamentum flavum*. *Патогенез.* 2020; 18(3): 45-52. doi: 10.25557/2310-0435.2020.03.45-52

11. Родионова Л.В., Самойлова Л.Г., Небезина А.В., Шурыгина И.А. Экспрессия генов дейодиназ в интраоперационных образцах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном отделе позвоночника. *Acta biomedica scientifica.* 2019; 4(6): 20-25. doi: 10.29413/ABS.2019-4.6.3

12. Родионова Л.В., Самойлова Л.Г., Сороковиков В.А. Активность генов рецепторов к паратиреоидному гормону в биоптатах *Ligamentum flavum* пациентов со стенозирующими процессами позвоночного канала и дурального мешка на поясничном уровне. *Acta biomedica scientifica.* 2020; 5(6): 113-123. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.13

13. *National Center for Biotechnological Information.* URL: <https://https.ncbi.nlm.nih.gov> [date of access: 01.11.2021].

14. Hsu HT, Yue CT, Teng MS, Tzeng IS, Li TC, Tai PA, et al. Immunohistochemical score of matrix metalloproteinase-1 may indicate the severity of symptomatic cervical and lumbar disc degeneration. *Spine J.* 2020; 20(1): 124-137. doi: 10.1016/j.spinee.2019.08.004

15. Xu D, Sun Y, Bao G, Liu W, Zhu X, Cui S, et al. MMP-1 overexpression induced by IL-1 β : Possible mechanism for inflammation in degenerative lumbar facet joint. *J Orthop Sci.* 2013; 18(6): 1012-1019. doi: 10.1007/s00776-013-0466-2

16. Kim HJ, Park JB, Won HY, Chang H. Serum levels of TGF-beta1, TIMP-1 and TIMP-2 in patients with lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Asian Spine J.* 2007; 1(1): 8-11. doi: 10.4184/asj.2007.1.1.8

17. Lindberg RL, Sorsa T, Tervahartiala T, Hoffmann F, Mellanen L, Kappos L, et al. Gelatinase B [matrix metalloproteinase (MMP)-9] and collagenases (MMP-8/-13) are upregulated in cerebrospinal fluid during aseptic and bacterial meningitis in children. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32(3): 304-317. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00729.x

18. Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Hölzländer GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: Association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(1): 80-84. doi: 10.1086/313922

REFERENCES

1. Silagi ES, Shapiro IM, Risbud MV. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the patho-

genesis of disc degeneration. *Matrix Biol.* 2018; 71-72: 368-379. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.025

2. Yu L, Sun ZJ, Tan QC, Wang S, Wang WH, Yang XQ, et al. Thermosensitive injectable decellularized nucleus pulposus hydrogel as an ideal biomaterial for nucleus pulposus regeneration. *J Biomater Appl Actions.* 2020; 35(2): 182-192. doi: 10.1177/0885328220921328

3. Henry N, Clouet J, le Bideau J, le Visage C, Guicheux J. Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems. *Biotechnol Adv.* 2018; 36(1): 281-294. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.009

4. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(6): 1375-1381. doi: 10.1189/jlb.0607338

5. Shurygina MG, Shurygina IA, Dremina NN, Kanya OV. Matrix metalloproteinase 9 and remodeling in myocardial infarction. *Acta biomedica scientifica.* 2013; 90(2-1): 138-141. (In Russ.).

6. Shurygina IA, Rodionova LV, Ayushinova NI, Chepurnykh EE, Trukhan IS, Shurygin MG. The effect of the p38 MAPK inhibitor on the expression of metalloproteinases and their inhibitors during the formation of abdominal adhesions. *Int J Biomed.* 2021; (4).

7. Kamieniak P, Bielewicz J, Kurzepa J, Daniluk B, Kocot J, Trojanowski T. The impact of changes in serum levels of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 on pain perception in patients with disc herniation before and after surgery. *J Pain Res.* 2019; 12: 1457-1464. doi: 10.2147/JPR.S201199

8. Xue M, March L, Sambrook PN, Jackson CJ. Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: Relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(9): 2864-2874. doi: 10.1002/art.22844

9. Yarmolinskaya MI, Molotkov AS, Denisova VM. Matrix metalloproteinases and inhibitors: classification, mechanism of action. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2012; LXI(1): 113-125. (In Russ.).

10. Rodionova LV, SamoiloVA LG, Shurygina IA, Sklyarenko OV, Zhivotenko AP, Koshkareva ZV, et al. Characteristic of acetylation reactions in patients with stenosing process of the lumbar spinal

canal and dural sac depending on the severity of *Ligamentum flavum* ossification. *Pathogenesis.* 2020; 18(3): 45-52. (In Russ.). doi: 10.25557/2310-0435.2020.03.45-52

11. Rodionova LV, SamoiloVA LG, Nevezhina AV, Shurygina IA. Expression of deiodinase genes in intraoperative *Ligamentum flavum* in patients with stenotic processes of the spinal canal and dural sac on the lumbar spine. *Acta biomedica scientifica.* 2019; 4(6): 20-25. (In Russ.). doi: 10.29413/ABS.2019-4.6.3

12. Rodionova LV, SamoiloVA LG, Sorokovikov VA. Activity of parathyroid hormone receptor genes in *Ligamentum flavum* biopsies of patients with spinal canal and dural sac stenosis at the lumbar level. *Acta biomedica scientifica.* 2020; 5(6): 113-123. (In Russ.). doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.13

13. National Center for Biotechnological Information. URL: <https://https.ncbi.nlm.nih.gov> [date of access: 01.11.2021].

14. Hsu HT, Yue CT, Teng MS, Tzeng IS, Li TC, Tai PA, et al. Immunohistochemical score of matrix metalloproteinase-1 may indicate the severity of symptomatic cervical and lumbar disc degeneration. *Spine J.* 2020; 20(1): 124-137. doi: 10.1016/j.spinee.2019.08.004

15. Xu D, Sun Y, Bao G, Liu W, Zhu X, Cui S, et al. MMP-1 overexpression induced by IL-1 β : Possible mechanism for inflammation in degenerative lumbar facet joint. *J Orthop Sci.* 2013; 18(6): 1012-1019. doi: 10.1007/s00776-013-0466-2

16. Kim HJ, Park JB, Won HY, Chang H. Serum levels of TGF-beta1, TIMP-1 and TIMP-2 in patients with lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Asian Spine J.* 2007; 1(1): 8-11. doi: 10.4184/asj.2007.1.1.8

17. Lindberg RL, Sorsa T, Tervahartiala T, Hoffmann F, Melanen L, Kappos L, et al. Gelatinase B [matrix metalloproteinase (MMP)-9] and collagenases (MMP-8/-13) are upregulated in cerebrospinal fluid during aseptic and bacterial meningitis in children. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32(3): 304-317. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00729.x

18. Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: Association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(1): 80-84. doi: 10.1086/313922

Сведения об авторах

Родионова Любовь Викторовна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клеточной патофизиологии и биохимии, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»; доцент кафедры лучевой и клинической лабораторной диагностики, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, e-mail: greidmacho@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5080-9225>

Самойлова Лилия Григорьевна – младший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: popovalg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4482-6130>

Сороковиков Владимир Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, директор, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»; заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и нейрохирургии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, e-mail: vasorokovikov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9008-6383>

Information about the authors

Lyubov V. Rodionova – Cand. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology; Associate Professor at the Department of X-Ray and Clinical Laboratory Diagnostics, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, e-mail: greidmacho@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5080-9225>

Liliya G. SamoiloVA – Junior Research Officer at the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: popovalg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4482-6130>

Vladimir A. Sorokovikov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Director, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology; Head of the Department of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, e-mail: vasorokovikov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9008-6383>