

УДК 616.72-002.77-053.3-005

Т.П. МАКАРОВА, М.С. ИЛЬИНА, В.В. СЕМЕНОВ, С.А. СЕНЕК

Казанский государственный медицинский университет

Оценка нестабильности генома у больных ювенильным ревматоидным артритом

Ильина Мария Сергеевна

ассистент кафедры госпитальной педиатрии с курсами ПП и ПДО

420138, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, д. 140, тел. 8-917-888-43-08, e-mail: mariyailina_kgmu@mail.ru

В статье представлены результаты оценки нестабильности генома у больных с ювенильным ревматоидным артритом с различными формами и вариантами, а также в зависимости от наличия базисной терапии, с помощью изучения уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами. Выявлена зависимость нестабильности генома от формы и активности заболевания.

Ключевые слова: ювенильный ревматоидный артрит, нестабильность генома, бинуклеарные лимфоциты с микронуклеусами.

T.P. MAKAROVA, M.S. ILINA, V.V. SEMENOV, S.A. SENEK

Kazan State Medical University

Evaluation of genomic instability in patients with juvenile rheumatoid arthritis

The paper presents the results evaluation of genomic instability in patients with juvenile rheumatoid arthritis with different forms and variations, as well as depending on the availability of basic therapy by studying the level binuclear lymphocytes with micronucleus. The dependence of genomic instability on the form and disease activity was revealed

Key words: juvenile rheumatoid arthritis, genomic instability, binuclear lymphocytes with micronucleus.

Согласно современным представлениям, ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА) объединяет гетерогенную группу хронических заболеваний суставов, имеющих различные этиологию, патогенез и иммуногенетическое происхождение, различную нозологическую принадлежность и неоднозначный прогноз. Основными задачами являются осуществление контроля над возникновением и развитием заболевания, достижение ремиссии, профилактика осложнений, обеспечение наилучшего исхода болезни с благоприятным жизненным и социальным прогнозом [1, 2]. Эффективное решение вышеперечисленных задач представляется возможным только на основе патогенетической терапии, корректирующей нарушения различных сторон метаболизма. Это положение полностью оправдало себя при разработке генно-инженерных биологических препаратов, мишенью которых являются узловые патогенетические звенья воспалительного процесса при ЮРА (ФНО α , ИЛ-1, ИЛ-6, В – клетки и т.д.).

Однако сложившее к настоящему времени понимание патогенеза ЮРА ещё не диктует стратегию выбора эффективного лечения [1, 4,

7, 11]. Анализ литературы показал, что спектр исследований направленный на формирование научно-обоснованной концепции патогенеза ЮРА за последние годы начинает смещаться в область молекулярно-биологических разработок иммуногенетического статуса заболевания: детализируются отклонения в биохимических профилях иммунной и генетической системы, определяются алгоритмы их взаимоотношений, оценивается значимость последних в механизме становления и развития заболевания [3, 6, 11]. В аспекте генетических исследований всё большее внимание уделяется изучению в патогенезе ЮРА и других аутоиммунных заболеваний, повреждениям генетического аппарата отдельных клеток и механизмов, инициирующие эти нарушения. Стимулом для такого рода исследований явилось обнаружение у больных ЮРА высокого содержания целого ряда метаболитов, обладающих выраженной мутагенной активностью – эндомутагенов (ЭМ): гидроперекисей, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, супероксидного анион-радикала, пероксида водорода, оксид азота, гистамина, серотонина, фактора некроза опухоли, атипичных нуклеотидов

– трифосфатов. Их избыточное накопление при заболевании отмечалось не только в клетках и синовиальной жидкости поврежденных суставов, но и в клетках, дистанцированных от очага воспаления [1, 8, 9, 11].

Одним из источников повышенной генерации ЭМ у больных являются в основном метаболические циклы эндомутагенеза (МЦЭ) [6], функционирующие в различных клеточных компартментах. Это, прежде всего, перекисное окисление липидов, циклооксигеназный путь метаболизма арахидиновой кислоты, конечный этап катаболизма пуриновых оснований с участием ксантиноксидазы, электронтранспортная цепь на внутренней мембране митохондрий и моноаминоксидазная реакция, протекающая на внешней митохондриальной мембране, активация тромбоцитов, стимуляция активности NO – синтазы серотонином, гистамином, ФНО и ИЛ-1, монооксигеназная система клеток печени и т.д.

Все эти процессы в условиях нормальной жизнедеятельности не представляют серьезной опасности для генома клетки. Однако в условиях нарушенного метаболизма они становятся источником повышенной генерации ЭМ. Высокий пул последних на фоне дисрегуляторных нарушений может привести к формированию у больных ЮРА случайных, ненаправленных мутаций в различных клетках и локусах молекулы ДНК, провоцируя появление феномена нестабильности генома (НГ) [5].

Повреждения функционально значимых участков ДНК при НГ могут привести к необратимому нарушению экспрессии генов, дестабилизации молекулярного хозяйства клетки, изменению её функций, некрозу или апоптозу. Это особенно опасно, если в сферу действия эндомутагенов попадают клетки, формирующие и контролирующее функциональное состояние нейро-эндокринной, сердечно-сосудистой, иммунной и других систем. При хронизации заболевания такой массивный негативный эффект неминуемо приведёт к утяжелению заболевания, снижению эффективности лечения и неблагоприятному прогнозу.

В любом случае, обнаружение у больного ЮРА повреждений ДНК на геномном или хромосомном уровнях позволяет ставить вопрос о наличии в патогенезе ЮРА генетической компоненты – нестабильности генома со всеми вытекающими отсюда последствиями. В специальной литературе дискутируется вопрос о формировании нестабильности генома в патогенезе соматических заболеваний, несущих аутоиммунную составляющую [3, 5, 6]. Однако публикаций, изучающих повреждения генетического аппарата клеток больных ЮРА, мы не обнаружили.

Цель исследования: определить состояние генома у больных ЮРА и оценить его зависимость от биологических (возраст и пол) и клинических (формы, варианты течения ЮРА и её активности) параметров.

Объем исследования. Обследовано 95 детей. Из них 68 (39 девочки и 29 мальчиков) с различными формами ЮРА, 12 — находящихся без лечения (на этапе верификации диагноза). Контрольную группу составили условно-здоровые дети (15 человек) в возрасте от 3 до 16 лет. Диагноз ЮРА устанавливался на основании клинико-anamnestических данных и инструментальных методов исследования. Исследование проводили дважды: в момент поступления больного в стационар и спустя 2-3 недели после лечения.

Все больные были разделены на 3 группы. При классификации заболевания мы придерживались рекомендаций Американской ассоциации ревматологов (JRA). Диагноз устанавливался на основании восточноевропейских диагностических критериев, разработанных ревматологами стран Восточной Европы и России в конце 70-х годов и рекомендованных Союзом педиатров России в 2005 г. практикующим врачам. Наш выбор основывается также на том, что большинство исследователей-ревматологов, какой бы классификации они ни придерживались, едины во мнении, что существенным является триада клинических вариантов дебюта ЮРА: системный, полиартикулярный и олигоартикулярный.

У 38 (56%) больных был полиартикулярный вариант (ПАВ), у 20 (30,0%) – олигоартикулярный вариант (ОАВ), у 10 (14,0%) – системный вариант (СВ). Во всех трех группах преобладали девочки (63,0%). Самому младшему ребенку было 5 лет, старшему – 16 лет. Средняя длительность болезни составила 6 лет.

Методика исследования

Для оценки нестабильности генома использовался метод, рекомендованный Международным протоколом (Human MicroNucleus project: Fenech M., 2003) для изучения особенностей и механизмов формирования индивидуальной чувствительности генома человека в норме и при различной патологии – оценка микроядер (МЯ) в бинуклеарных лимфоцитах крови детей (in vitro) в условиях цитохалазинового блока (СВМН). Культивирование лимфоцитов проводилось по традиционной методике Fenech и Moreley – метод СВМН [10]. Анализировали уровень бинуклеарных лимфоцитов (БЛ) с микронуклеусами (МН) – БЛМН. Уровень двуядерных лимфоцитов, содержащих микроядра, подсчитывался в 1000 просмотренных двуядерных лимфоцитах периферической крови человека. Результаты выражены в промилях. Индекс пролиферации рассчитывался по формуле – (число 1-яд.кл. + 2 x число 2-яд.кл. + 3 x число полияд.кл.) / число проанализированных клеток.

Цитохалазин В вводили в культуру на 44 часу от начала культивирования ФГА-стимулированных лимфоцитов. На 72 часу клетки фиксировали, отмывали и прокрашивали азурэозином по Романовскому-Гимзе. Цитохалазин, ковалентно связываясь с оперенным концом актинового филамента клетки, блокирует цитокinesis в ФГА стимулированных к делению лимфоцитах.

Особенность этого метода в том, что он позволяет количественно учитывать много параметров. Культура лимфоцитов рекомендована Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в качестве тест-системы при оценке влияния на клетку мутагенных факторов [10]. Это позволяет сравнить полученные нами данные с данными других авторов. Кроме того, регистрация микроядер позволяет судить не только об интенсивности процесса повреждения хромосом, но и о повреждении митотического аппарата клетки контролирующего кинетику хромосом.

Полученные результаты

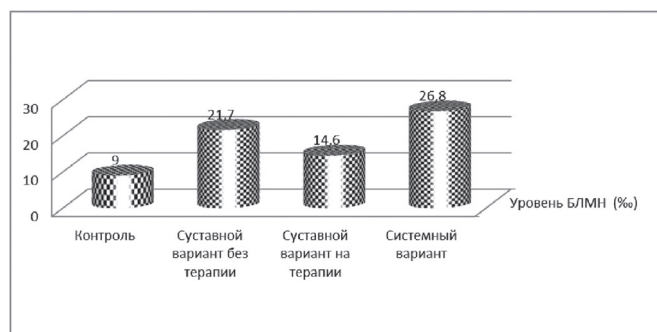
Изучение уровня БЛМН проводилось у больных с различными формами и вариантами течения ЮРА, а также в зависимости от наличия базисной терапии. Данные результатов при различных формах заболевания (суставная, системная) сравнивались с результатами в группе условно здоровых детей.

Результаты исследования показали (рис. 1), что в целом по группе больных с ЮРА уровень выявленных

БЛМН был статистически значимо выше ($p < 0,001$), чем в группе условно здоровых детей. Эти данные могут свидетельствовать о формировании у больных ЮРА феномена нестабильности генома, поскольку БЛМН является одним из признаков данного феномена.

При суставной форме заболевания (ПАВ и ОАВ) выделяли группу больных, не получающих базисную терапию, т.е. находящихся на этапе верификации диагноза (12 чел.) и группу пациентов, получающих базисную терапию (метотрексат, НПВП) (58 чел.).

Рисунок 1.
Уровень БЛМН у больных ЮРА в зависимости о формы заболевания



Анализ результатов при изучении уровня БЛМН в крови у всех обследуемых детей с ЮРА показал (табл. 1) достоверное его увеличение независимо от пола, по сравнению с группой условно здоровых детей ($p < 0,001$) (табл. 1). Если учесть, что существенные изменения в функционировании организма, связанные с эндокринными перестройками, происходят в начале подросткового возраста (11-12 лет у девочек и 12-14 лет у мальчиков), то можно предположить, что отсутствие связи между частотой заболевания, физиологической составляющей и уровнем БЛМН в различных возрастных периодах свидетельствует об определенном автономном формировании БЛМН, его неполной зависимости от биологических параметров пациента.

Таблица 1.
Уровень БЛМН периферической крови больных ЮРА в зависимости биологических параметров (от пола и возраста)

Формы ЮРА	Уровень БЛМН ‰			
	Мальчики	Девочки	5-10 лет	11-16 лет
	n = 35	n = 60	n = 55	n = 40
Контроль (n=15)	8,6 ± 2,6	9,4 ± 2,7	9,3 ± 2,5	8,5 ± 2,9
Суставной вариант без терапии (n=12)	17,5 ± 3,1	21,3 ± 2,6**	19,9 ± 3,3*	19,7 ± 4,1*
Суставной вариант (n=58) на терапии	13,9 ± 2,5	13,6 ± 2,7	12,5 ± 2,0	14,5 ± 2,1
Системный вариант (n=10) на терапии	24,8 ± 2,3*	25,3 ± 2,7**	25,3 ± 1,7*	24,8 ± 2,1*

Примечание. Выделены достоверно различающиеся по сравнению с контролем значения: * - $p < 0,001$.

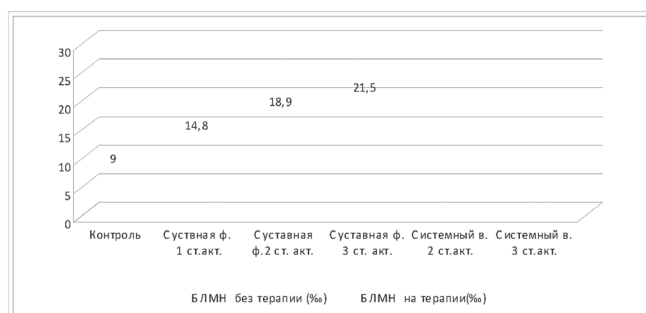
При сравнении изучения уровня БЛМН у больных с разными формами заболевания показал (табл. 1), что у больных с диагнозом «системная форма ЮРА» число выявленных БЛМН существенно выше, чем при суставной форме заболевания ($p < 0,001$).

На фоне проводимой терапии через 21 день у детей с суставной формой независимо от пола было выявлено статистически значимое снижение уровня БЛМН в крови, чем в аналогичных группах без лечения ($p < 0,001$), однако данные показатели по сравнению с группой контроля достоверно повышенными по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Нами проводилось изучение показателей уровня БЛМН у больных с суставной формой ЮРА, в зависимости от возраста, в группах детей от 5 до 10 лет и от 11 до 16 лет. Анализ полученных данных не выявил каких-либо закономерностей: в группах детей до 11 лет ($20,6 \pm 5,9$) и старше 11 лет ($19,8 \pm 6,6$) уровень данного показателя статистически не различался ($p > 0,05$), хотя в обоих случаях количество обнаруженных БЛМН значительно ($p < 0,001$) превышало показатели здоровых детей.

Анализ уровня БЛМН у больных в зависимости от степени активности процесса при суставной форме ЮРА показал, что максимальное увеличение уровня БЛМН отмечается при высокой степени активности процесса по сравнению с низкой степенью активности и контрольной группой ($p < 0,05$) (рис. 2).

Рисунок 2.
Уровень БЛМН в зависимости от степени активности заболевания у больных с ЮРА



Анализ уровня БЛМН у детей с системной формой ЮРА показал максимально выраженные изменения НГ, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) (табл. 1). По нашему мнению, прогрессирование заболевания с вовлечением в процесс внутренних органов, сопровождается усугублением НГ, которая, в свою очередь, влияет на патогенетические механизмы развития заболевания.

Проводимая терапия сопровождалась статистически значимым снижением уровня БЛМН в крови ($p < 0,001$), но они по-прежнему не достигли показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

При сравнительном анализе содержания БЛМН в крови в зависимости от степени активности заболевания при висцеральной форме ЮРА (рис. 2) выявлена такая же закономерность, как и при суставной форме заболевания — максимальные значения показателей БЛМН при высокой степени активности по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Необходимо отметить, что достоверное снижение содержания БЛМН у пациентов с суставной формой заболевания на фоне терапии выявлено только у больных с 3 степенью активности процесса, ($p < 0,05$).

Обсуждение

Таким образом, изучение состояния генома у больных ЮРА, проведенное цитогенетическим методом, показало, что у больных детей происходит статистически значимое повышение уровня БЛМН в периферической крови, что может свидетельствовать о формировании нестабильности генома при ЮРА. Полученные данные позволяют предположить, что НГ у детей формируется параллельно с развитием заболевания. Поскольку выявленный феномен не является характерным только для больных ЮРА, а регистрируется при других заболеваниях [1, 5, 6], то его можно отнести к категории типовых патологических процессов.

Выводы:

1. Результаты исследования показали, что БЛМН определяется в крови как здоровых, так и больных детей. Однако в крови последних уровень БЛМН существенно выше, что свидетельствует о развитии у больных детей феномена нестабильности генома.

2. Нестабильность генома при ЮРА, тестируемая по уровню БЛМН в крови, не зависит от биологических (пол, возраст) параметров, но зависит от клинических параметров, таких как форма и активность заболевания.

3. Проводимая терапия сопровождается статистически значимым снижением уровня БЛМН при ЮРА, что является благоприятным фактором в коррекции анеугенного эффекта. Однако проводимая базисная терапия явно недостаточна для полного снятия эффекта нестабильности генома у больных ЮРА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева, Е.И. Факторы неблагоприятного прогноза ювенильного ревматоидного артрита и возможности его изменения средствами лекарственной терапии / Е.И. Алексеева, И.Е. Шахбазян, Е.С. Жолобова // Рос. педиатрич. журн. — 2003. — № 4. — С. 48-52.
2. Алексеева, А.М. Цитокиновый статус при ювенильном ревматоидном артрите / А.М. Алексеева, Е.И. Алексеева, Т.Б. Сенцова [и др.] // XIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов. — М., 2006. — С. 50.
3. Инфекционная кардиопатология / Под ред. Н.Н. Ильинского // Сибирский медицинский университет (Томск). — Томск: Издательство Томского университета, 2005. — 168 с.
4. Михельс, Х. Генно-инженерная биологическая терапия ювенильного артрита / Х. Михельс, И.П. Никишина, Е.С. Федоров [и др.] // Научно-практическая ревматология. — 2011. — № 1. — С. 78-93.
5. Семёнов, В.В. Хромосомная изменчивость при патологических состояниях ненаследственного генеза / В.В. Семёнов, Д.Д. Гайнетдинова, А.В. Семёнов [и др.] // Тезисы 3 Российского конгресса по патофизиологии. — М., 2004. — С. 57-58.
6. Семёнов, В.В. Нестабильность генома при патологических состояниях ненаследственного генеза / В.В. Семёнов, Е.С. Кошпаева, В.И. Погорельцев // Сб.: Естествознание и гуманизм. Современный мир, природа и человек. — Томск, 2007. — Т. 4, № 2. — С. 87-88.
7. Сигидин, Я.А. Двойное слепое исследование эффективности антител к интерферону-гамма и фактору некроза опухоли альфа при ревматоидном артрите / Я.А. Сигидин, Г.В. Лукина // Терапевтический архив. — 2001. — № 5. — С. 12-15.
8. Сигидин, Я.А. Ревматоидный артрит / Я.А. Сигидин, Г.В. Лукина. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.
9. Одинаев, Ф.И. Некоторые патогенетические аспекты ревматоидного артрита / Ф.И. Одинаев, З.И. Сухонова, З.Е. Краснокутская // Сборник трудов ТНИИПМ. — 2000. — С. 150-152.
10. Fenech, M. Human Micro Nucleus project. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project / M. Fenech, S. Bonassi, J. Turner [et al.] // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 534, № 1-2. — P. 45-64.
11. Scott, D.L. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis / D.L. Scott, G.H. Kingsley // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 355, № 7. — P. 704-712.

НОВОЕ В МЕДИЦИНЕ. ИНТЕРЕСНЫЕ ФАКТЫ

НЕ ВСЕ АНТИОКСИДАНТЫ ПОЛЕЗНЫ ДЛЯ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Пожилые люди, потребляющие продукты, богатые антиоксидантами, на самом деле, не помогают своему здоровью. Новое исследование сообщает, что подобный рацион не спасет их от деменции или инсульта. Как передает Reuters, люди, съевшие много апельсинов, пившие чай, кофе, красное вино, имели те же шансы столкнуться с неврологическими проблемами в последующие 14 лет, что и остальные. Автором соответствующего изыскания выступила Элизабет Девор из Женского госпиталя Бригама. По ее словам, хотя некоторые определенные витамины способны производить защитный эффект на мозг, это не значит, что все антиоксиданты защищают мозг. В исследовании приняли участие 5395 человек 55 лет и старше. Они сообщали о количестве потребления предложенных в списке в 170 продуктов. За время наблюдения у 599 человек диагностировали слабоумие. В 484 случаях оно было вызвано болезнью Альцгеймера, а у 601 человека произошел первый инсульт. Однако выявить связь общего потребления антиоксидантов и объема серого или белого вещества мозга не удалось. В любом случае, Девор рекомендует не отказываться от продуктов с антиоксидантами. Также можно принимать витамин Е и витамин С — они снизят риск деменции и инсульта.

Источник: Medportal.ru (2013)