

УДК 616-053.2

© М.С. Ильина, В.В. Семенов, Т.П. Макарова, С.А. Сенек

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»

г. Казань, Россия

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА У БОЛЬНЫХ ЮВЕНИЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Аннотация. В статье представлены результаты исследования уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами (БЛМН) у больных с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА) в зависимости от биологических (пол, возраст) и клинических (форма заболевания) параметров. Полученные результаты свидетельствуют о развитии у больных детей феномена нестабильности генома (НГ).

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

© M. Ilina, V. Semenov, T. Makarova, S. Senek

Kazan State University of Medicine

Kazan, Russia

GENOMIC INSTABILITY IN PATIENTS WITH JUVENILE RHEUMATOID ARTHRITIS IN RELATION TO BIOLOGICAL PARAMETERS

Abstract. The article presents the results of the study of the level of binuclear lymphocytes with micronuclei (BLMN) in patients with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) depending on the biological (sex, age) and clinical (forms) parameters. These results indicate the development of the phenomenon of genomic instability (GI) in pediatric patients.

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

Введение. Ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА) – самостоятельная нозологическая форма неизвестной этиологии со сложными аутоиммунными процессами патогенеза, начинающаяся до 16-летнего возраста и характеризующаяся хроническим воспалительным поражением суставов с преимущественно прогрессирующим течением. Заболевание продолжается во взрослом состоянии и оказывает значительное влияние на жизнь пациента в целом, состояние его здоровья, адаптацию в семье и в

обществе. Поэтому основными задачами врачей являются осуществление контроля над возникновением и развитием заболевания, достижение ремиссии, профилактика осложнений, обеспечение наилучшего исхода болезни с благоприятным жизненным и социальным прогнозом [2, 3, 9]. Поскольку этиология ЮРА остается неизвестной, то 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 – фактор некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-6, В – клетки).

Теория мультифакториального генеза ЮРА, к сожалению, только очертила границы возможных индукторов патологии, не назвав конкретных ее виновников. Поэтому реализация концепции *Treat To Target* (лечение до достижения цели), сформулированная Европейской противоревматической лигой, базируется не на этиопатогенетическом знании сущности заболевания, а на коррекции отдельных, значимых для данного заболевания патогенетических отклонений [1, 5, 10]. Так, заметное место в фармакотерапии ревматоидных артритов занимают моноклональные антитела, вызывающие деплецию В-лимфоцитов и ингибиторы фактора некроза опухоли. Особый интерес связан с использованием ингибиторов интерлейкина 6 (ИЛ-6), гиперпродукция которого рассматривается как важный иммунопатологический механизм воспаления, деструкции суставов и аутоиммунных реакций [8].

Спектр исследований патогенеза ЮРА за последние годы начинает смещаться в область молекулярно-биологических разработок иммуногенетических составляющих: детализируются отклонения в биохимических профилях иммунной и генетической системы, определяются алгоритмы их взаимоотношений, оценивается значимость последних в механизме

становления и развития заболевания. В аспекте генетических исследований все 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-эндомутагенов (ЭМ), обладающих выраженной мутагенной активностью: гидроперекисей, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, супероксидного анион-радикала, пероксида водорода, оксид азота, гистамина, серотонина, фактора некроза опухоли, атипичных нуклеотидов–инозин-ди и трифосфатов. Их избыточное накопление при заболевании отмечается не только в клетках и синовиальной жидкости поврежденных суставов, но и в клетках, дистанцированных от очага воспаления [1].

Одним из источников повышенной генерации ЭМ у больных являются мутаген-генерирующие метаболические циклы (МГЦ) [4], функционирующие в различных компартментах клетки. Активация МГЦ в условиях патологии сопровождается усилением генерации ЭМ, интенсификацией процесса эндомутагенеза: формирование у больных ЮРА случайных, ненаправленных мутаций в различных клетках и локусах молекулы ДНК, появление феномена нестабильности генома (НГ) [4]. Повреждения функционально значимых участков ДНК при НГ могут необратимо нарушить экспрессию генов, дестабилизировать молекулярное хозяйство клетки, изменить ее функцию, привести к некрозу или апоптозу. Выявление у больного ЮРА статистически значимого уровня повреждений ДНК на генном или хромосомном уровнях, позволяет ставить вопрос о наличии в патогенезе ЮРА генетической компоненты – НГ и ориентировать тактику лечебных мероприятий на коррекцию этого феномена.

В предлагаемой работе, 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 уровня микроядер в бинуклеарных лимфоцитах крови (БЛМН) детей (*in vitro*) в условиях цитохалазинового блока (HUMN) [6].

Цель исследования – определить состояние генома у больных ЮРА и оценить его зависимость от биологических (пол, возраст) и клинических (формы заболевания) параметров.

Материал и методы 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 5 до 16 лет. Диагноз ЮРА устанавливался на основании клинико-анамнестических данных и инструментальных методов исследования. Исследование проводили дважды – в момент поступления больного в стационар и спустя 2–3 недели после лечения.

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 %).

Средний возраст больных ЮРА составил ПАВ и ОАВ – 10 лет; СВ – 9 лет. Самому младшему ребенку было 4 года, старшему – 16 лет. У большинства больных системным вариантом был поздний ЮРА. Средняя длительность болезни составила 6 лет.

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.

Количество БЛМН оценивалось при просмотре у одного ребенка двух мазков культивированной крови. В каждом мазке просматривалось 1000 бинуклеарных лимфоцитов. Данные выражались в промилли.

Цитохалазин В вводили в культуру на 44 часу от начала культивирования фитогемагглютинин – стимулированных лимфоцитов. На 72 часу клетки фиксировали, отмывали и прокрашивали азурэозином по Романовскому-Гимзе. Цитохалазин, ковалентно связываясь с оперенным концом актинового филамента клетки, блокирует цитокинез в ФГА стимулированных к делению лимфоцитах. Особенность этого метода в том, что он позволяет количественно учитывать много параметров. Для нас важными являются два момента. Во-первых, культура лимфоцитов рекомендована Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в качестве тест-системы при оценке влияния на клетку мутагенных факторов. 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.

В настоящей работе использовали парный (при анализе повторных изменений в одной и той же группе) или двухвыборочный t-тест Стьюдента, тесты Шапиро-Уилкса, Манна-Уитни, Уилкоксона. Использовался программный пакет SAS system version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Результаты собственных исследований. Данные результатов при различных формах заболевания (суставная, системная) сравнивались с результатами в группе условно здоровых детей. Результаты исследования показали, что БЛМН регистрируются в клетках культуры крови, как у здоровых ($9,0 \pm 2,6 \%$), так и больных детей ($21,5 \pm 7,2 \%$). В крови последних уровень выявленных БЛМН был статистически значимо выше ($p < 0,001$), чем у здоровых детей. Это свидетельствует о формировании у

больных ЮРА феномена нестабильности генома. У детей с первичным обращением ($15,3 \pm 3,6 \%$) этот феномен менее выражен, чем у детей повторно обратившихся в клинику ($23,3 \pm 6,9 \%$), но в обоих случаях уровень БЛМН у детей был статистически существенно ($p < 0,001$) выше, чем у здоровых детей. Это позволяет предположить, что НГ у детей формируется параллельно с развитием заболевания, что, в свою очередь, дает основание рассматривать метод HUMN, в комплексе с другими лабораторными методами, в качестве возможного критерия отбора больных ЮРА для госпитализации.

Высокий показатель БЛМН у повторно обратившихся больных свидетельствует о том, что НГ является достаточно стабильным, устойчивым компонентом в патогенезе заболевания. В теоретическом аспекте такое стойкое отклонение каких-либо физиологических параметров от референсного диапазона чаще всего свидетельствует о формировании у больных замкнутых, самоподдерживающихся патологических циклов, интегрированных в систему патогенеза. Возможно, аналогичная архитектура патогенеза свойственна и для развития ЮРА. Если это так, то первоначальные инициаторы заболевания ЮРА могут уже не играть существенной роли в его поддержании и развитии. Отсюда складывается и возможная стратегия поиска эффективных базисных лекарственных препаратов. По нашему мнению, она должна быть направлена на выбор фармакологических соединений, блокирующих прямые и обратные связи в порочном круге патологических реакций, сформированных при ЮРА.

Анализ количества БЛМН у больных с разными формами и вариантами заболевания показал, что у больных с суставной и системной формами заболевания число выявленных БЛМН существенно выше, чем в группе здоровых детей (во всех случаях $p < 0,001$). Причем, наблюдается тенденция к некоторому увеличению количества БЛМН у детей с системной формой ЮРА ($26,8 \pm 2,7 \%$) в сравнении с суставной формой заболевания ($21,7 \pm 3,3$

‰). Возможно, это свидетельствует о том, что по мере прогрессирования патологии вектор ее развития направлен на вовлечение в заболевание внутренних органов, что, в свою очередь, может деформировать патогенез до такой степени, что первоначальное заболевание может приобрести новый нозологический статус. Вполне вероятно, что с такой трансформацией мы встречаемся, когда поднимается вопрос о классификации системного варианта, так как ряд исследователей считают его самостоятельным заболеванием [7].

Содержание уровня БЛМН у больных с разными вариантами течения ЮРА отличались. Так, у детей с полиартикулярным вариантом ЮРА число выявленных БЛМН ($26,8 \pm 2,7\%$) несколько выше, чем при олигоартикулярном варианте ($21,8 \pm 2,7\%$). Несовпадение прогнозируемых и реально полученных результатов в нашем проекте, возможно, связано с недостаточным числом обследованных индивидуумов в сравниваемых выборках.

Оценка количества БЛМН у детей в зависимости от биологических параметров (пола и возраста). Полученные результаты (табл. 1) показали, что половой статус больных в общей когорте обследованных не влиял на уровень регистрируемых БЛМН. Имеющиеся различия в содержании БЛМН у мальчиков и девочек оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$). Более углубленный анализ гендерных влияний на содержании БЛМН в культуре крови показал, что при суставной форме заболевания уровень БЛМН у девочек регистрировался несколько выше, чем у мальчиков, в то время как при системной форме заболевания данные по полу не отличались. Если учесть, что девочки болеют ЮРА чаще, чем мальчики, то вышеприведенный факт свидетельствует о наличии в механизмах формирования заболевания и НГ не только половых составляющих, но и зависимость их от целого ряда других факторов. Можно предположить, что

НГ тесно интегрирована в патогенез заболевания, а также приобретает самостоятельное значение.

Таблица 1

**Уровень БЛМН периферической крови больных ЮРА
в зависимости от пола**

Формы ЮРА	Уровень БЛМН ‰			
	мальчики		девочки	
	n	M(SD)	n	M(SD)
Контроль (n=15)	7	8,6 ± 2,6	8	9,4 ± 2,7
Суставная форма без терапии (n=12)	5	17,5 ± 3,1	7	21,3 ± 3,6*
Суставная форма на терапии (n=58)	22	13,0 ± 2,5	36	13,6 ± 2,7
Системный вариант (n=10) на терапии	1	24,8 ± 2,3*	9	25,3 ± 2,7*

* – $p < 0,001$ – по сравнению с группой контроля

Полученные данные также не дают возможность определить конкретные молекулярные звенья клеточного метаболизма, определяющие гендерные различия процессов, формирующих БЛМН. Не нашли мы объяснение этому феномену и в доступной литературе.

Изучение уровня БЛМН у обследованных в зависимости от возраста в общей когорте заболевших (табл. 2) не выявило каких-либо закономерностей. При проведении исследования у нас был только 1 больной ребенок в возрасте 4 лет. Он не вошел в группу исследования.

В группах детей до 11 лет и старше 11 лет уровень БЛМН статистически не различался ($p > 0,05$), хотя в обоих случаях количество обнаруженных БЛМН значительно ($p < 0,001$) превышало таковое у здоровых детей. Возрастные параметры больных, в отличие от половых, как при суставной, так и при системной форме заболевания, значимо не влияли на уровень БЛМН. Как при суставной, так и при системной формах заболевания, уровень БЛМН у больных в возрасте 6–10 и 11–15 лет достоверно не отличался.

**Уровень БЛМН периферической крови больных ЮРА
в зависимости от возраста**

Формы ЮРА	Уровень БЛМН ‰			
	5–10 лет		11–16 лет	
	n	M(SD)	n	M(SD)
Контроль (n=15)	9	9,3 ± 2,5	6	8,5 ± 2,9
Суставная форма без терапии (n=12)	7	19,9 ± 3,3*	5	19,7 ± 4,1*
Суставная форма на терапии (n=58)	35	12,5 ± 2,0	23	14,5 ± 2,1
Системный вариант (n=10) на терапии	4	25,3±1,7*	6	24,8±2,1*

* – $p < 0,001$ – по сравнению с группой контроля

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 больного ребенка.

Выводы

1. Результаты исследования показали, что БЛМН определяется в крови как здоровых, так и у пациентов с ЮРА. Однако в крови последних уровень БЛМН достоверно 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 пола и возраста пациентов с ЮРА, но зависит от формы заболевания, варианта течения и наличия иммуносупрессивной терапии.

3. Метод HUMN может применяться в качестве возможного критерия изучения вероятности возникновения ЮРА у детей с отягощенной наследственностью по ревматическим заболеваниям.

Список литературы:

1. *Алексеева Е.И.* Принципы патогенетической терапии тяжелых системных вариантов ювенильного ревматоидного артрита / И.Е. Шахбазян // Novartis, специальный выпуск.– 2002. – № 1. – С. 31–36.
2. *Алексеева Е.И., Литвицкий П.Ф.* Ювенильный ревматоидный артрит: руководство для врачей, преподавателей, научных сотрудников. – М.: ВЕДИ, 2007. – 359 с.
3. *Салугина С.О., Кузьмина Н.Н., Федоров Е.С., Мовсисян Г.Р.* Ранний ювенильный артрит – результаты двухлетнего проспективного наблюдения // Научно-практическая ревматология. – 2009. – № 6. – С. 71–77.
4. *Семенов В.В., Гайнетднова Д.Д., Семенов А.В., Кравченко И.Э., Погорельцев В.И.* Хромосомная изменчивость при патологических состояниях ненаследственного генеза // Тезисы 3 Российского конгресса по патофизиологии. – М., 2004. – С. 57–58.
5. *Сигидин Я.А., Лукина Г.В.* Ревматоидный артрит. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
6. *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 / S. Bonassi, J. Turner, et al. // Mutat Res. – 2003. – Vol. 534, № 1–2. – P. 45–64.
7. *Nash P.* Seronegative spondyloarthropathies: to lump or split? / P. Mease, J. Braun et al. // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – № 64. – P. 9–13.
8. *Nelson P.N.* Monoclonal antibodies / G.M. Reynolds, E.E. Waldron et al. // Mol. Pathol. – 2000. – № 53 (3). – P. 111–117.
9. *Smolen J.S.* Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force / D. Aletaha, J.W.J. Bijlma et al // Ann Rheum Dis. – 2010. – № 69. – P. 631.
10. *Woo P.* Cytokines and juvenile idiopathic arthritis // Curr Rheumatol Rep. – 2002. – № 4 (6). – P. 452–457.

Ильина Мария Сергеевна – ассистент кафедры госпитальной педиатрии с курсами ПП и ПДО ГБОУ «Казанский ГМУ» Минздрава; 420138г. Казань, 420138, Оренбургский тракт-140; e-mail: mariyailina_kgmu@mail.ru.

Семенов Валерий Васильевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской биологии и генетики ГБОУ «Казанский ГМУ» Минздрава. 420012, Казань, ул. Бутлерова 49; e-mail: semenov_valera@mail.ru, semenov-valera@yandex.ru.

Макарова Тамара Петровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий курсами ПДО кафедры госпитальной педиатрии с курсами ПП и ПДО ГБОУ «Казанский ГМУ» Минздрава. 420138г. Казань, 420138, Оренбургский тракт-140; e-mail: makarova-kgmu@mail.ru

Сенек Светлана Александровна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры госпитальной педиатрии с курсами ПП и ПДО ГБОУ «Казанский ГМУ» Минздрава. 420138г. Казань, 420138, Оренбургский тракт-140; e-mail: senek@bk.ru.