

ко-лабораторной ремиссии, а также коррекции иммунных нарушений.

Список использованной литературы:

1. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессу: механизмы и защитные пере-крестные эффекты. Нур. Мед. J. 1993; 4: 23-30.
2. Петров К.Б. Способ лечения миофасциальных болевых синдромов методом пневмодеструкции триггерных точек. Медицина на рубеже веков: сборник трудов, посвященный 70-летию юбилею многопрофильной клиниче-

ской больницы № 2 г. Новокузнецка. – Новокузнецк, 1990; 207-210

3. А.Б. Бакиров, Н.С. Кондрова, Э.Т. Валеева, Ш.З. Гильманов, И.В. Сандакова. Профессиональная заболеваемость в Республике Башкортостан. Медицинский вестник Башкортостана 2009; 6: 7-10.
4. Л.М. Масягутова, А.Б. Бакиров, Э.Т. Валеева, С.Х. Чурмантаева, М.К. Гайнуллина. Профессиональная заболеваемость работников агропромышленного комплекса Республики Башкортостан. Пермский медицинский журнал 2012; 29: 6: 92-96.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГАПЛОТИПОВ МИТОХОНДРИЙ С ПАРАМЕТРАМИ ТЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Шафигуллина Альбина Зульфатовна

Магистрант кафедры биохимии,
ФГАОУВОКФУ, Казань, Россия,
ЦНИЛ

ГБОУ ДПО КГМА Минздрава России

Кравцова Ольга Александровна,

к.б.н., доцент кафедры биохимии,
ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Арлеевская Марина Игоревна

к.м.н, с.н.с. ЦНИЛ

ГБОУ ДПО КГМА Минздрава России

THE RELATIONSHIP OF MITOCHONDRIAL HAPLOTYPES WITH THE PARAMETERS OF RHEUMATOID ARTHRITIS SEVERITY

Shafigullina A.Z., The master student, Department of Biochemistry, Kazan (Volga region) Federal University, Central Research Laboratory, Kazan State Medical Academy

Kravtsova O.A., PhD, Senior lecturer, Department of Biochemistry, Kazan (Volga region) Federal University

Arleevskaya M. I., PhD, Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kazan State Medical Academy, Russia

АННОТАЦИЯ

В статье представлены данные, показывающие влияние митохондриальных гаплотипов на тяжесть течения РА и выраженность тривиальных инфекций у больных с этим заболеванием.

ABSTRACT

The article presents data showing the effect of mitochondrial haplotypes on the rheumatoid arthritis severity and the intensity of the trivial infections in the patients with this disease.

Ключевые слова: гаплотипы митохондрий, мтДНК, ревматоидный артрит

Keywords: Mitochondrial haplotype, mtDNA, rheumatoid arthritis

Введение

Развитие ревматоидного артрита (РА) является аномальным ответом генетически предрасположенного организма на воздействие факторов окружающей среды. Как известно, генетическая предрасположенность составляет лишь половину риска, остальные 50% - вклад средовых факторов [1].

Предполагается, что основными средовыми факторами являются инфекции. В процессе длительного мониторинга больных РА, начиная с первых симптомов заболевания, а также родственников этих больных первой степени родства в нашей лаборатории показано, что предрасположенные к развитию заболевания индивидуумы страдают от частых и продолжительных банальных инфекций. Инфекционный синдром максимально выражен в течение года, предшествующего развитию заболевания и затем в течение трех лет от дебюта артрита угасает до

нормальных показателей [2]. Оказалось, что как в раннюю, так и в позднюю стадию РА активность заболевания (по интегральному показателю DAS28-СОЭ) и выраженность функциональной недостаточности суставов (по HAQ) коррелирует с показателями инфекционного синдрома [3].

РА в 2-3 раза чаще развивается у женщин и предрасположенность к нему передается, как правило, по женской линии [4].

Огромное количество исследований посвящено выявлению РА-ассоциированных полиморфизмов генов в геноме. Однако организмом также наследуются генетические особенности, закодированные в митохондриальной ДНК, и эта генетическая информация передается ребенку от матери [5]. Известна ассоциация определенных митохондриальных гаплотипов с противомикробной резистентностью, онкопатологией, сердечно-сосудистыми заболеваниями [6], [7], [8]. Мы предположили, что передаваемые из

поколения в поколение особенности функционирования митохондрий могут иметь значение в провокации РА.

Цель – исследование взаимосвязи гаплотипов митохондрий и параметров тяжести течения и активности РА и выраженности инфекционного синдрома у больных на ранней и развернутой стадиях заболевания.

Методы

Исследование митохондриального генома проведено у 73 пациенток с РА и 30 здоровых женщин с неотягощенной аутоиммунными заболеваниями наследственностью. В данное исследование включены лица, находящиеся под нашим длительным (до 10 лет) наблюдением. Все они 1 раз в 6-12 месяцев проходят обследование с целью выявления стертых клинических признаков нарушенного функционирования иммунной системы (аутоиммунный, инфекционный, аллергический синдромы). Критерии исключения во всех группах – известные факторы риска развития инфекций – курение, бытовой алкоголизм, сахарный диабет, сопутствующие хронические заболевания [9].

Клинические исследования.

Инфекции. В течение ряда лет собирали информацию о частоте, продолжительности и характере перенесенных банальных инфекций у больных РА и здоровых женщин с неотягощенной аутоиммунными заболеваниями наследственностью (контроль). Детализировались параметры инфекционного синдрома за предшествующие 6-12 месяцев, при этом учитывались только очевидные эпизоды инфекции. Диагноз хронических очагов инфекции различной локализации в большинстве случаев был верифицирован соответствующим специалистом.

В процессе обследования также фиксируются клинико-лабораторные признаки активности РА (DAS28-СОЭ, HAQ, ревматоидный фактор, антитела к цитруллиниро-

ванным пептидам, СОЭ по Вестергрену, С-реактивный белок).

Определение гаплогрупп митохондриальной ДНК проводили методом секвенирования гиперварибельного участка II Д-петли на анализаторе Applied Biosystems 3700. Для амплификации использовали праймеры 15989 - 1640 п.н., подобранные на основании референсной кембриджской последовательности. ПЦР проводили на программируемом термоциклере MyCycler. Анализ полученных электрофореграмм проводили с использованием онлайн программы «Mthap - an mtDNA haplogroup analysis tool» (<http://dna.jameslick.com/mthap/advanced.php>).

Фракции, обогащенные гранулоцитами, моноцитами и лимфоцитами выделяли стандартным методом в 3-ступенчатом градиенте плотности фиколла-урографина. Доля жизнеспособных клеток, определявшаяся с помощью окраски трипановым синим, составляла 95-98%.

Измерение концентрации АТФ в гранулоцитах, моноцитах и лимфоцитах проводили при помощи набора «Люмтек» (Москва, Россия) Реагенты набора готовили в соответствии с инструкцией производителя. Для построения концентрационной кривой АТФ-контроль разводили до 10⁻⁷-10⁻⁹ М. В ячейку хемилуминометра вносили 20 мкл образца или АТФ-контроля и 100 мкл АТФ-реагента и измеряли биолуминесцентный сигнал. Измерения проводили при 37°C с постоянным перемешиванием в 2 повторах. Концентрацию АТФ в образце определяли по концентрационной кривой. Концентрацию АТФ в клетках выражали в нМ/5*10⁵ клеток.

Результаты

Статистическая обработка методом χ^2 подтвердила отсутствие различий в соотношении митохондриальных гаплотипов в группах (таблица 1).

Таблица 1.

Частота выявления митохондриальных гаплотипов в группах, %

Митохондриальные гаплотипы	Н	J	К	N	U
Больные РА (n=73)	46,6	20,5	11,0	1,4	20,5
Контроль (n=30)	46,7	13,3	13,3	3,3	23,3

При сравнении параметров инфекционного синдрома и показателей тяжести течения и активности РА оказалось, что по сравнению с носителями Н, J, U гаплотипов носители K митохондриального гаплотипа достоверно меньше подвержены банальным инфекциям в дебюте РА (таблица 2). При этом больных РА - носителей K гаплотипа в ранней стадии заболевания отмечается достоверно более низкая активность РА (по DAS28-СОЭ) и менее выраженная функциональная недостаточность суставов (по HAQ) при сравнении с показателями в подгруппе носителей J гаплотипа. В развернутой стадии РА носители K гаплотипа функционально достоверно более сохранены по сравнению с носителями J гаплотипа. Следует также

отметить, что в подгруппе носителей K гаплотипа достоверно доли РФ- и антиЦЦП-положительных случаев РА были достоверно меньшими, чем в других подгруппах больных РА. Таким образом, по всем проанализированным параметрам у носителей J гаплотипа отмечалось более тяжелое течение РА и более выраженный инфекционный синдром, у носителей K гаплотипа поражение суставов и выраженность инфекций были относительно более мягкими. Все изучавшиеся параметры у носителей гаплотипа Н имели промежуточные значения. Поскольку в выборке больных был лишь 1 пациент – носитель N гаплотипа, он исключен из анализа.

Таблица 2.

Взаимосвязь митохондриальных гаплотипов с клинико - лабораторными параметрами РА и параметрами инфекционного синдрома

Гаплотипы	Возраст дебюта РА, годы	Инфекционный синдром				DAS28-СОЭ, баллы ^{^^^}		HAQ, баллы ^{^^^^}		Частота выявления, %	
		Дебют РА [^]		Развернутая стадия РА ^{^^}		Ранний	Развернутый	Ранний	Развернутый	РФ	АнтиЦЦП
		1	2	1	2						
Н	47,5	7,3	74,0	2,7	18,8	5,0	4,5	3,0	2,5	78,9	70,3
Ј	46,0	6,9	90,9	1,96	20,4	6,6	5,1	3,6	3,9	80,0	88,9
К	47,5	3*	51,0*	1,6	14	3,4*	4,0	1,05*	1,3*	50,0&	40,0&
U	52,0	6,7	87,6	2,3	24,3	5,5	5,3	2,8	2,6	80,0	85,6,0

1 – частота инфекционных эпизодов в год

2 – суммарная продолжительность инфекционных эпизодов за год

[^] частота и продолжительность банальных инфекций за год, предшествовавший дебюту суставного синдрома

^{^^} - частота и продолжительность банальных инфекций за год, предшествовавший последнему обследованию больного.

^{^^^} ранний РА - анализировались показатели DAS28 при первом обследовании, развернутый РА – анализировались средние показатели пациентов за все годы наблюдения

^{^^^^} Ранний РА – показатель HAQ при первом обследовании, развернутый РА – показатель HAQ при последнем обследовании

РФ – ревматоидный фактор,

АнтиЦЦП – антитела к циклическим цитруллинированным пептидам

Во всех подгруппах

Ранний РА – стаж болезни 0,6±0,25 года

Развернутый РА – стаж болезни 6,0±3,8 лет

* различия достоверны при сравнении К-подгруппы с остальными подгруппами (параметры инфекционного синдрома) и с Ј- подгруппой (DAS-28- СОЭ и HAQ), критерий Вилкоксона, представлены медианы

& различия достоверны при сравнении К-подгруппы с остальными подгруппами (критерий 2)

При анализе зависимости параметров инфекционного синдрома от митохондриального гаплотипа в контрольной группе выявлены те же закономерности – продолжительность банальных инфекций у носителей К гаплотипа 24 дня / год (медиана), у носителей Ј гаплотипа – 33 дня. У носителей Н и U гаплотипов были промежуточные значения

этого показателя.

Важным показателем функционирования митохондрий является уровень АТФ в клетках.

Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация АТФ в лимфоцитах и моноцитах носителей Ј митохондриального гаплотипа достоверно снижена.

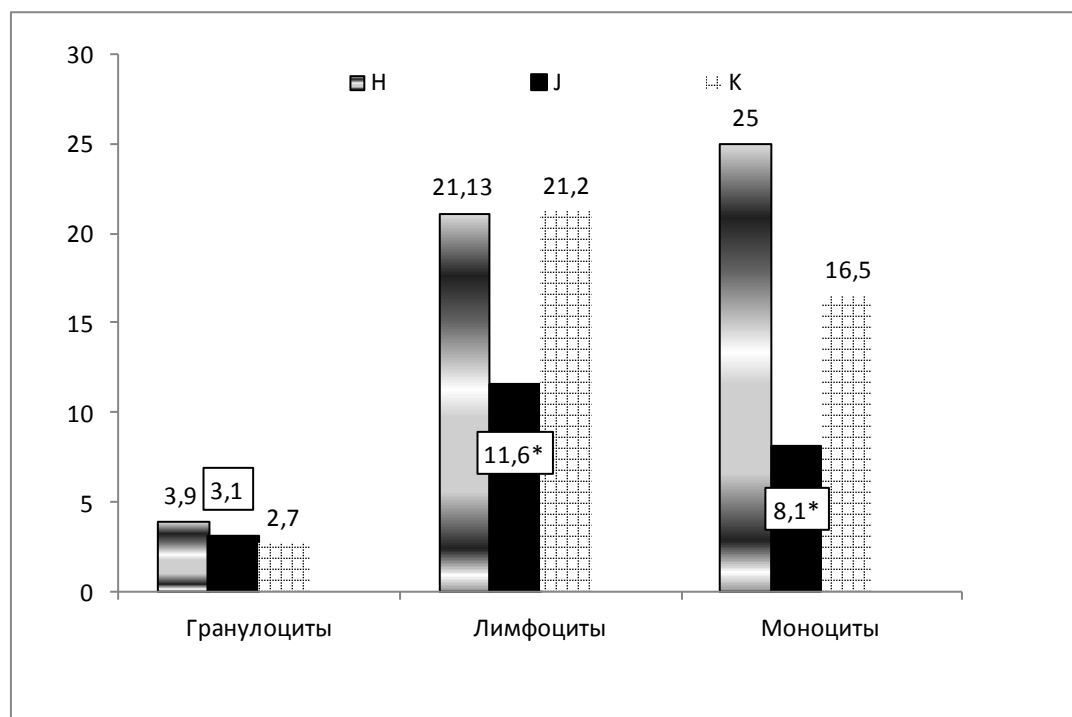


Рисунок 1. Концентрация АТФ в гранулоцитах, лимфоцитах и моноцитах (нМ/5х10⁵ клеток) у носителей К, J и H-гаплотипов

По оси Y – концентрация АТФ в клетках, нМ/5х10⁵ клеток

Представлены медианы

* Достоверное снижение концентрации АТФ у носителей J гаплотипа при сравнении с носителями К и H гаплотипов (критерий Манн-Уитни)

Таким образом, несмотря на предварительный характер представленных результатов, полученные нами данные свидетельствуют об определенном влиянии митохондриальных гаплотипов на тяжесть течения РА и выраженность инфекционного синдрома у больных с этим заболеванием.

Список литературы:

- 1) Kobayashi S1, Momohara S, Kamatani N, Okamoto H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. FEBS J. – 2008 - 275(18) - 4456-62.
- 2) Arleevskaya M.I., Gabdoulkhakova AG1, Filina YV1, Miftakhova RR2, Bredberg A2, Tsybulkin AP3. A transient peak of infections during onset of rheumatoid arthritis: a 10-year prospective cohort study. BMJ Open. – 2014. - 1;4(8) - e005254.
- 3) Арлеевская М.И. неопубликованные данные
- 4) Насонова В.А. Ревматология : взгляд в XXI век. Вестн. РАМН. – 2003 – 7 - 3-6.
- 5) Sato M.I., Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. BiochimBiophysActa. – 2013 -

1833(8) - 1979-84.

- 6) Guzman-Fulgencio M., et al. European mitochondrial haplogroups are associated with CD4+ T cell recovery in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. The Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2013. - 68(10) - 2349-57.

- 7) Lorente L., et al. Severe septic patients with mitochondrial DNA haplogroup JT show higher survival rates: a prospective, multicenter, observational study. PLoS One. – 2013 - 12;8(9) - e73320.

- 8) Jiménez-Sousa M.A. Mitochondrial DNA haplogroups are associated with severe sepsis and mortality in patients who underwent major surgery. The Journal of infection. – 2015 - 70(1) - 20-9.

- 9) Golubenko M.V. Mitochondrial DNA polymorphism association with myocardial infarction and prognostic signs for atherosclerosis. Molekuliarnaia biologiya. – 2015 - 49(6) - 968-76.

- 10) Doran M.F., Crowson CS, Pond GR, O’Fallon WM, Gabriel SE. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls. Arthr Rheum. – 2002.- -46 - 2287-93.