

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕАКТИВНОЙ АРТРОПАТИИ КОЛЕННОГО СУСТАВА

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»¹,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

Целью настоящего исследования явилось определение частоты выявления ДНК артритогенных возбудителей бактериальной и вирусной этиологии, а также установление уровней нормализованной экспрессии генов матричных металлопротеиназ MMP-1, MMP-3, MMP-9 в синовиальной жидкости. Группу исследования составили 69 пациентов с реактивной артропатией коленного сустава. Проведенные молекулярно-генетические исследования позволили разделить всех пациентов на группы: бактериальный фактор инфицирования был детектирован у 21 пациента ($30,88 \pm 4,90$ % случаев), вирусный – у 23 пациентов ($64,70 \pm 5,98$ % случаев), у 25 пациентов ($36,76 \pm 5,21$ % случаев) ДНК исследуемых возбудителей выявлена не была. Для определения уровней нормализованной экспрессии генов MMP-1, MMP-3 и MMP-9 были подобраны оригинальные олигонуклеотидные праймеры и молекулярные зонды, усовершенствованы состав реакционной смеси и температурный профиль амплификации. В качестве house-keeping гена для расчета нормализованной экспрессии использовался ген HGUS. Установлены статистически значимые различия уровней нормализованной экспрессии исследуемых генов в зависимости от этиологического фактора инфицирования: при выявлении в синовиальной жидкости бактериального инфицирующего фактора наблюдается увеличение экспрессии гена MMP-9, тогда как вирусное поражение коленного сустава ассоциировано с увеличением экспрессии гена MMP-1.

Ключевые слова: реактивная артропатия коленного сустава, артритогенные возбудители бактериальной и вирусной этиологии, экспрессия генов матричных металлопротеиназ.

O. S. Poluyan, S. A. Kostiuk, A. N. Benko, N. F. Soroka

CURRENT APPROACHES TO MOLECULAR OF THE KNEE JOINT REACTIVE ARTHROPATHY GENETIC DIAGNOSIS

The aim of this study was to determine the frequency of bacterial and viral etiology arthritic pathogens DNA detection and to establish the matrix metalloproteinases MMR-1, MMR-3, MMR-9 normalized genes expression levels in synovial fluid. The study group consisted of 69 patients with reactive knee arthropathy. The molecular genetic studies made it possible to divide all patients into groups: bacterial infection factor was detected in 21 patients (30.88 ± 4.90 % of cases), viral – in 23 patients (64.70 ± 5.98 % of cases), in 25 patients (36.76 ± 5.21 % of cases) studied pathogens DNA was not detected. To determine the levels of normalized expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 genes, the original oligonucleotide primers and molecular probes were selected, the composition of the reaction mixture and the temperature profile of amplification were improved. HGUS gene was used as house-keeping gene to calculate normalized expression. Statistically significant differences in the studied genes normalized expression levels depending on the etiological infection factor were established: the synovial fluid bacterial infectious factor contributes the MMP-9 increasing expression, while the viral knee joint lesion is associated with an increasing of MMP-1 gene expression.

Key words: *reactive knee arthropathy, bacterial and viral etiology arthritic pathogens, matrix metalloproteinases genes expression.*

Артропатии коленного сустава – это дегенеративные заболевания хрящевой ткани, возникающие на фоне дистрофии при нарушении кровоснабжения или иннервации. При длительном течении заболевания происходит деструкция тканей и костной структуры, а также развитие воспалительного процесса [1].

Реактивная артропатия коленного сустава является одним из самых частых диагнозов в ревматологии и отличается от ревматоидного или подагрического артрита отсутствием внесуставной симптоматики. Патология представляет собой целую группу ревматологических заболеваний, сопровождающихся однотипными признаками поражения опорно-двигательного аппарата. Данное заболевание имеет мультифакторную этиологию, при этом ведущие отечественные и зарубежные специалисты имеют общую точку зрения о генетической детерминированности указанной патологии в совокупности с микробным фактором инфицированием [3].

Поиски этиологического фактора развития реактивной артропатии коленного сустава направлены на выделение экзо- и эндогенных агентов, запускающих каскад реакций, приводящих к развитию патологического процесса. В качестве экзогенного фактора могут выступать микроорганизмы. Это обусловлено, в первую очередь, участием различных инфекционных агентов в развитии данного заболевания, при этом микроорганизмы играют триггерную роль, запуская иммунопатологические механизмы воспаления [8].

Микробный агент способен достигать полости сустава гематогенным или лимфогенным путем, стимулируя активность иммунной системы в ответ на попадание чужеродного агента в «стерильную» полость сустава, при этом персистенция возбудителя может наблюдаться как непосредственно в суставной ткани, так и вне ее [7].

Наиболее часто встречающимися возбудителями реактивной артропатии являются:

1. Возбудители инфекций желудочно-кишечного тракта: *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*.
2. Возбудители инфекций урогенитального тракта: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*.
3. Возбудитель Лайм-артрита *Borrelia burgdorferi*.
4. Возбудители инфекций респираторного тракта: *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*.
5. Вирусные инфекционные агенты: *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*, *Parvovirus B19* [7, 9].

В развитии реактивной артропатии коленного сустава активное участие принимают генетические, внешнесредовые, иммунологические, гормональные, инфекционные и другие факторы. В отличие от классических генетических заболеваний, при которых множество различных генов и их комбинаций предрасполагают к развитию заболевания, реактивная артропатия представляет собой гетерогенное заболевание, в первую очередь, обусловленное генетически детерминированным нарушением иммунорегуляторных процессов [5].

В настоящее время активно обсуждается роль гена матриксной металлопротеиназы (ММР) в развитии предрасположенности к реактивной артропатии. Ген ММР расположен на длинном плече 20-й хромосомы между позициями 11,2 и 13,1. Семейство ММР представляет собой цинк- и кальций-зависимые эндопептидазы, способные специфически гидролизовать основные компоненты внеклеточного матрикса. Протеиназы присутствуют во всех без исключения клетках, внеклеточном матриксе и различных биологических жидкостях организма. Физиологически представители семейства ММР синтезируются как препробелки и секретрируются как проферменты в очень незначительных количествах. В основном ММР секретрируются под действием провоспалительных цитокинов, а главными источниками их продукции считаются активированные макрофаги, нейтрофилы, фибробласты [4].

При реактивной артропатии формируется особый тип воспаления с повреждающим действием семейства ММР на соединительную ткань. Среди ферментов системы протеолиза наибольшее значение принадлежит семейству ММР, которые, имея особенности доменных структур и функций, действуют на коллаген и протеогликановый матрикс, разрушая основное внеклеточное вещество соединительной ткани. Предполагается, что семейство ММР проявляет более выраженный деструктивный эффект в присутствии оксида азота, выработку которого усиливает индуцибельная NO-синтетаза. Совместное действие медиаторов интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли- α вносит значительный вклад в развитие периартикулярного и системного разрушения хрящевой ткани [6].

Цель исследования – определить частоту выявления ДНК артритогенных возбудителей бактериальной и вирусной этиологии, установить уровни нормализованной экспрессии генов матриксных металлопротеиназ ММР-1, ММР-3, ММР-9 в синовиальной жидкости пациентов с реактивной артропатией коленного сустава.

Материал и методы. В данное исследование было включено 69 пациентов с реактивной артропатией. В качестве биологического материала для проведения молекулярно-генетических исследований по выявлению ДНК артритогенных возбудителей бактериальной (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma species*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) и вирусной (*Herpes simplex virus I, II, VI* типов), *Epstein-Barr virus*, *Parvovirus B19*) этиологии, а также опреде-

ления уровней нормализованной экспрессии генов ММР использовали синовиальную жидкость.

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «Экстракция 100» («Вектор-Бест», РФ). Постановка реакции амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*), *Ureaplasma species* (*Ur. species*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Herpes simplex virus* (HSV) I/II, VI типов, *Epstein-Barr virus* (EBV), *Parvovirus B19* (B19) проводилась с использованием тест-систем «РеалБест» («Вектор-Бест», РФ). Детекция результатов проводилась в режиме реального времени с использованием программного обеспечения прибора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Для проведения молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии генов ММР-1, ММР-3, ММР-9 выделение РНК из синовиальной жидкости проводили с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США). Для определения концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda = 230$ нм. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript III reverse transcriptase, dNTP и Ribonuclease inhibitor (Invitrogen, США). Полученную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки ПЦР в режиме реального времени с участием специально подобранных олигонуклеотидных пар праймеров и молекулярных зондов для каждого гена, включая house-keeping ген HGUS (*human β -glucuronidase*), который экспрессируется всеми клетками человека.

Расчет уровней нормализованной экспрессии генов ММР-1, ММР-3, ММР-9 с нормализацией относительно референсного гена проводили по формуле:

$$\% \text{ уровня экспрессии} = \frac{2_{-(Ct \text{ интересующего гена} - Ct \text{ гена HGUS})}}{\times 100 \%,$$

где Ct – пороговый цикл (cycle threshold).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение (критерий Колмогорова-Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей Me (Q25/75). Для относительных показателей определяли 95 % доверительный интервал (ДИ).

Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни. Для установления взаимосвязи между молекулярно-генетическими показателями использовали критерий независимости хи-квадрат (χ^2). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$ [2].

Результаты и обсуждение. В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований было установлено, что при реактивной артропатии инфекционное поражение коленного сустава было верифицировано в $64,70 \pm 5,98\%$ ($n = 44$), при этом бактериальный фактор был выявлен в $30,88 \pm 4,90\%$ ($n = 21$) случаев, вирусный – в $33,82 \pm 5,07\%$ ($n = 23$) случаев. В синовиальной жидкости 25 пациентов ($36,76 \pm 5,21\%$ случаев) с реактивной артропатией коленного сустава указанные возбудители выявлены не были. На основании полученных результатов все пациенты были разделены на соответствующие группы: группа 1 – пациенты с реактивной артропатией коленного сустава бактериальной этиологии; группа 2 – пациенты с реактивной артропатией коленного сустава вирусной этиологии; группа 3 – пациенты с реактивной артропатией коленного сустава неустановленной этиологии.

В группе 1 пациентов с реактивной артропатией коленного сустава (рисунок) основным артритогенным возбудителем являлась *S. trachomatis* – возбудитель был детектирован в биологического материала 14 пациентов ($66,67 \pm 7,57\%$ случаев). ДНК *S. pneumoniae* была выявлена в синовиальной жидкости 8 пациентов ($38,09 \pm 5,92\%$ случаев), *M. pneumoniae* – 1 пациента ($4,76 \pm 2,17\%$ случаев). У 2 пациентов ($9,52 \pm 3,05\%$ случаев) указанные возбудители были выявлены в виде ассоциаций ДНК *S. trachomatis* + *S. pneumoniae*.

В группе 2 пациентов с реактивной артропатией (рисунок) наиболее часто ($n = 11$) выявлялась ДНК HSV I/II типов ($47,83 \pm 6,26\%$ случаев). ДНК B19 де-

тектировали в биологическом материале 8 пациентов ($34,78 \pm 5,42\%$ случаев), ДНК HSV VI и EBV – в синовиальной жидкости 3 ($13,04 \pm 3,41\%$ случаев) и 4 ($17,39 \pm 3,92\%$ случаев) пациентов с реактивной артропатией коленного сустава соответственно. В исследуемом биологическом материале 2 пациентов ($8,70 \pm 2,92\%$ случаев) было выявлено микстинфицирование полости сустава в виде ассоциации HSV I/II + HSV VI, у 1 пациента ($4,35 \pm 2,07\%$ случаев) была выявлена ассоциация ДНК HSV I/II + B19.

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению уровней нормализованной экспрессии генов MMP-1, MMP-3 и MMP-9.

Состав реакционной смеси был универсален для указанных генов и различался только вносимыми парой праймеров и зондом: 19,8 мкл Mastermix, 1,1 мкл смеси forward-праймер – reverse-праймер – зонд (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 нмоль/мкл), 1,1 мкл смеси праймеров HGUS и 3 мкл кДНК. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Программа амплификации: 95°C – 5 минут, циклирование (45 циклов) 95°C – 10 сек, 60°C – 60 сек (детекция). При проведении мультиплексной ПЦР в режиме реального времени детекция специфических фрагментов проводилась по каналу FAM (Green), а house-keeping гена HGUS – по каналу ROX (Orange).

При проведении молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии генов MMP-1, MMP-3, MMP-9 в образцах синовиальной жидкости 69 пациентов с реактивной артропатией было установлено, что средние значения уровней экспрессии MMP-1 составили: Me (Q25/75) для группы 1 95,67 (64,15/140,72), для группы 2 – 36,27 (11,48/59,16), для группы 3 – 104,59 (77,36/155,91); критерий Манна-Уитни для групп 1-2 $Z = -5,903$, $p = 0,037$, для групп 2-3 $Z = -6,118$, $p = 0,012$, что свидетельствует о наличии статистически значимых различий по исследуемому показателю, тогда как

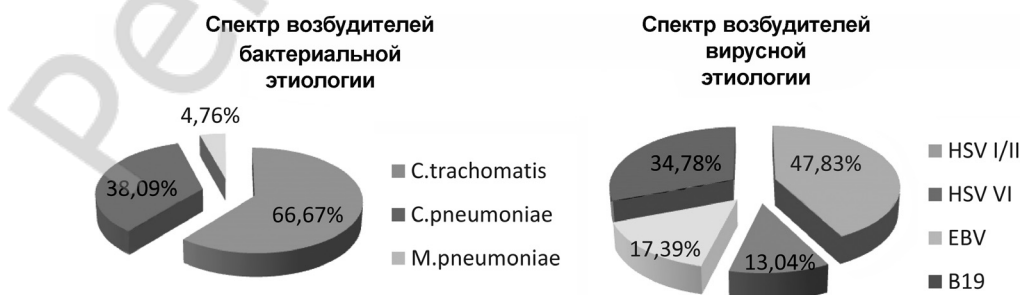


Рисунок. Спектр инфекционных возбудителей и частота их выявления в синовиальной жидкости пациентов с реактивной артропатией

для групп 1-3 статистически значимых различий в уровне экспрессии гена MMP-1 выявлено не было ($Z = -1,948$, $p = 0,91$).

Уровни нормализованной экспрессии гена MMP-3 для группы 1 составили Me (Q25/75) 76,19 (47,99/95,27), для группы 2 – 85,14 (59,67/101,35), для группы 3 – 21,94 (7,59/40,07). Использование критерия Манна-Уитни позволило сделать вывод о наличии статистически достоверных различий для исследуемых групп 1-3 ($Z = -6,171$, $p = 0,010$) и 2-3 ($Z = -6,171$, $p = 0,022$).

При сравнении уровней нормализованной экспрессии гена MMP-9 были получены следующие Me (Q25/75): для группы 1 – 15,07 (2,84/31,40), для группы 2 – 84,47 (59,60/97,09), для группы 3 – 91,15 (70,96/106,74). Критерий Манна-Уитни выявил наличие статистически достоверных различий для групп 1-2 ($Z = -5,663$, $p = 0,018$) и 1-3 ($Z = -6,031$, $p = 0,034$). Для групп 2-3 $Z = -0,663$, $p = 0,507$, что свидетельствует об отсутствии статистических различий полученных результатов.

Проведенный статистический анализ позволил установить наличие взаимосвязи между наличием в полости сустава инфекционных агентов вирусной этиологии и уровнем нормализованной экспрессии гена MMP-1 ($\chi^2 = 68,343$, $p = 0,042$), а также наличием в полости сустава инфекционных агентов бактериальной этиологии и уровнем нормализованной экспрессии гена MMP-9 ($\chi^2 = 72,000$, $p = 0,014$), что подтверждается высокими значениями χ^2 и соответственно высокой статистической значимостью; тогда как для оценки взаимосвязи между показателями «этиологической фактор инфицирования полости сустава – уровень нормализованной экспрессии гена MMP-3» $\chi^2 = 47,111$, $p = 0,237$, что свидетельствует о независимости данных переменных.

Установлено, что увеличение экспрессии гена MMP-1 взаимосвязано с наличием эрозии в суставе ($\chi^2 = 65,911$, $p = 0,027$), а уровень нормализованной экспрессии гена MMP-3 – с активностью воспалительного процесса в суставе ($\chi^2 = 71,210$, $p = 0,039$). Усиление экспрессии данных генов способствует развитию деструктивных нарушений структуры соединительной ткани, формированию аутоиммунного воспаления и, как следствие, приводит к эрозированию коленных суставов при реактивной артропатии.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что в синовиальной жидкости пациентов с реактивной артропатией выявляются инфекционные агенты как бактериальной, так

и вирусной этиологии, при этом наиболее часто выявляемый бактериальный агент – *C. trachomatis* ($66,67 \pm 7,57$ % случаев), вирусный агент – HSV I/II типов ($47,83 \pm 6,26$ % случаев).

Матриксные металлопротеиназы MMP действуют на коллаген и протеогликановый матрикс, разрушая основное внеклеточное вещество соединительной ткани, при этом в процесс формирования эрозий вовлечено несколько подсемейств MMP, которые играют основную роль в разрушении внеклеточного матрикса, хряща и субхондральной кости.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что уровень экспрессии генов MMP, воздействующих на коллаген и протеогликановый матрикс, способствует разрушению основного внеклеточного вещества соединительной ткани.

Установлено наличие взаимосвязи между уровнем нормализованной экспрессии гена MMP-1 в синовиальной жидкости и темпами эрозивного процесса. Уровень нормализованной экспрессии гена MMP-3 является показателем активности заболевания и отражает степень воспаления синовиальной оболочки сустава. Увеличение экспрессии данного гена ассоциируется с рентгенологическими изменениями в суставе, а также является предиктором тяжести деструктивного поражения. Определение уровня нормализованной экспрессии генов MMP-1 и MMP-3, участвующих в процессах деструкции соединительной ткани, может использоваться в качестве маркера указанной деструкции. MMP-9 участвуют в суставном разрушении и формировании ангиогенеза, отвечая за распад желатина и мембранных коллагеназ. MMP-9 с коллагеназами повреждают фибриллярные коллагены, основные мембранные компоненты и стромальные молекулы внеклеточного матрикса, приводя тем самым к развитию эрозий суставов.

На основании проведенного статистического анализа установлено, что при бактериальном поражении сустава происходит увеличение уровней нормализованной экспрессии гена MMP-9, тогда как при реактивной артропатии вирусной этиологии наблюдается усиление экспрессии гена MMP-1 ($p < 0,05$).

Проведение дальнейших исследований по установлению пороговых значений уровней нормализованной экспрессии генов MMP-1, MMP-3 и MMP-9 будет способствовать выявлению дополнительных генетических факторов предрасположенности к развитию реактивной артропатии коленного сустава.

Литература

1. Бургасова, О. Л. Этиологические и патогенетические аспекты реактивных артритов / О. Л. Бургасова, Г. Я. Ценева, Н. Д. Ющук // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 5. – С. 49–52.

2. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных // А. Д. Наследов. – СПб.: Питер, 2008. – 416 с.

3. Сорока, Н. Ф. Количественная клиническая ревматология / Н. Ф. Сорока, В. Е. Ягур. – Минск: Ризола-Принт, 2011. – 96 с.

4. *Biomarkers* in early rheumatoid arthritis: longitudinal associations with inflammation and joint destruction measured by magnetic resonance imaging and conventional radiographs / S. Syversen [et al.] // *Ann Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69. – P. 845–850.

5. *Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy* / S. H. Venkatesha [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 16, iss. 1. – P. 887–906.

6. High serum cartilage oligomeric protein determines the subset of patients with early stage rheumatoid arthritis with high serum C-reactive protein, matrix metallo-proteinase-3, and MRI-proven bone erosion / K. Fujikawa [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 36. – P. 1126–1129.

7. *Short- and long-term effects of bacterial gastrointestinal infections* / A. Ternhag [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14, iss. 1. – P. 143–148.

8. *The incidence of sexually acquired reactive arthritis: a systematic literature review* / H. J. Denison [et al.] // *Clin. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 35, iss. 11. – P. 2639–2648.

9. Townes, J. M. Reactive arthritis after enteric infections in the United States: the problem of definition / J. M. Townes // *Clin. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 50, iss. 2. – P. 247–254.

Поступила 15.04.2019 г.