

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЛЕННОГО СУСТАВА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

*Костюк С.А., Бенько А.Н., Герасименко М.А., Кезля О.П.,
Езерский К.Ф.*, Полуян О.С. Королько А.С.***

ГУО Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

**УЗ Минская областная клиническая больница, Беларусь

*432 Главный военный клинический медицинский центр, г. Минск, Беларусь

В ближайшем будущем прогнозируется увеличение количества больных ОА (2). Данное заболевание (группа заболеваний) относится к категории мультифакториальных – в его этиологии имеют место как генетические, так и приобретенные факторы (3). В последние десятилетия отмечается заметный рост количества дегенеративно-воспалительных заболеваний суставов у молодых активных пациентов не всегда понятной этиологии. Биология остеоартрита обширна - заболевание не ограничивается поражением только одной ткани, а развивается в результате комплексного взаимодействия общих и локальных факторов, постепенного вовлечения новых тканей, из чего и складывается достаточно сложная патогенетическая картина. Диагностика ранних стадий ОА часто вызывает трудности – рентгенологические признаки отсутствуют, симптоматика выражена неярко. Артрозо-артрит, разрушение хряща, деформации, глубокие патологические изменения кости являются конечной стадией патологического процесса.

Цель пилотного исследования: определить возможности и диагностическую ценность молекулярно-биологических тестов для раннего выявления, дифференциации, прогнозирования и этиопатогенетического лечения дегенеративных и воспалительных заболеваний коленного сустава

В данное пилотное исследование были включены 17 активных молодых мужчин в возрасте от 18 до 40 лет с различными заболеваниями коленных суставов. Комплекс клиничко-диагностических мероприятий включал: клиническое, лабораторное, рентгенологическое (передняя, боковая проекции, нагрузочная рентгенография, рентгенограммы конечностей в положении стоя (топограмма), вырезка надколенника) исследования, МРТ. Всем обратившимся пациентам была выполнена артроскопия коленных суставов с взятием синовиальной жидкости и синовиальной ткани для молекулярно-биологических исследований.

В соответствии с данными анамнеза и клиничко-лабораторных тестов пациенты были разделены на следующие: 1а – пациенты с начальными минимальными проявлениями дегенеративных процессов в коленном суставе (n=2), 1б – пациенты с имеющимися дегенеративными изменениями в коленных суставах с указанием на травму в анамнезе (n=7), 1в – пациенты с имеющимися дегенеративными изменениями в коленных суставах без указания на травму в анамнезе (n=5), 2а – пациенты с имеющимися дегенеративными

изменениями в коленных суставах с указанием на инфекционный фактор (n=2).

Все образцы синовиальной жидкости исследовались методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на наличие ДНК артритогенных возбудителей *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes simplex virus I/II* типов.

Для анализа уровней экспрессии нами были выбраны следующие гены: гены иммуноглобулинов, гены ростового фактора фибробластов $\beta 2$ (TGF $\beta 2$), гены компонентов матрикса коллаген 2 (Col-2) и коллаген 6 (Col-6), гены внеклеточного матрикса металлопротеиназа 2 (MMP-2) и металлопротеиназа 9 (MMP-9).

Определение уровней экспрессии генов проводилось в образцах синовиальной ткани с выделением РНК с применением реагента TRIzol.

Для определения концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты проводили спектрофотометрические исследования на длине волны $\lambda=230$ нм. Степень чистоты, выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230.

При проведении мультиплексной ПЦР в режиме реального времени детекция специфических фрагментов проводилась по каналу FAM (Green), а house-keeping гена HGUS – по каналу JOE (Yellow).

В связи со сложностью формирования группы контроля для проведения молекулярно-биологических исследований (невозможность взятия синовиальной жидкости и синовиальной ткани у практически здоровых лиц), расчет уровней экспрессии проводился относительно house-keeping гена HGUS за сравнимый уровень нормализованной экспрессии взят уровень 0,8-1,0. Т.о. при определении уровней нормализованной экспрессии при получении значений $\geq 1,0$ мы говорим о повышении экспрессии, а при получении значений $\leq 0,8$ – о снижении уровней экспрессии исследуемых генов.

В ходе проведенных молекулярно-биологических исследований установлено, что в 2-х образцах синовиальной жидкости выявлялась ДНК *Chlamydia trachomatis*. Данные пациенты были отнесены в группу 2а, что полностью согласуется с клинической картиной заболевания, данными артроскопии, подтверждающими наличие воспалительного процесса в коленных суставах, и данными анамнеза (указание на перенесенную инфекцию, частые ангины и т.д.).

Далее нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению уровней экспрессии генов иммуноглобулинов Ig. При этом установлено, что в группах 1а, 1б, 1в уровни нормализованной экспрессии составили $< 1,0$, тогда как в группе 2а – $> 1,0$, а именно 256,41 и 641,08, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса в группе 2а.

Далее нами были проведены исследования по определению уровней экспрессии ростового фактора фибробластов $\beta 2$ (TGF $\beta 2$). В ходе проведенных исследований было установлено повышение уровней экспрессии данного гена в группах пациентов 1б и 1в, а также снижение уровней экспрессии в группе 1а.

Аналогичные данные были получены при определении уровней экспрессии генов компонентов матрикса коллагена 2 (Col-2) и коллагена 6

(Col-6): в группах 1б и 1в наблюдалось увеличение уровней экспрессии, а в группе 1а – снижение уровней экспрессии по исследуемым генам.

На следующем этапе нами были проведены исследования по определению уровней экспрессии генов внеклеточного матрикса: в группе 1а наблюдалось увеличение, а в группах 1б и 1в – снижение уровней экспрессии матричных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9.

На основании полученных данных молекулярно-биологических исследований нами предложен следующий алгоритм диагностического поиска для воспалительных и невоспалительных заболеваний суставов.

Таким образом, представляется перспективным использование генетического контроля для решения следующих задач:

1. Диагностика генетически детерминированной патологии как изолированной, так и входящей в состав синдромов.

2. Определение тактики адекватного комплексного этиопатогенетического консервативного или хирургического лечения, его этапности, формулировка прогноза, выбор метода реабилитации и последующей активности больного.

3. Определение генетического прогноза, выявление членов семьи с доклинической стадией заболевания.

4. Ведение регистра семей и больных с наследственной патологией, их динамическое наблюдение.

5. Разработка научно-практических программ, информационного обеспечения, рекомендаций по ранней диагностике и профилактике (в том числе и пренатальной), патогенетически ориентированной терапии и адекватной хирургической тактики лечения наследственной патологии.

6. Совершенствование имеющихся и разработка новых эффективных методов оперативного и консервативного лечения

На основании проведенного пилотного исследования был предложен алгоритм диагностического поиска для воспалительных и невоспалительных заболеваний суставов:

