

УДК 616.72-007.17-08-036.838:615.83

ВЛИЯНИЕ РАДНОТЕРАПИИ НА ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ И УРОВЕНЬ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ В КЛЕТКАХ СИНОВИИ У БОЛЬНЫХ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ ОСТЕОАРТРОЗОМ

¹Ударцев Е.Ю., ²Ильинских Н.Н.¹Санаторий «Алтай-WEST», Белокуриха, e-mail: info@altai-west.ru;²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, e-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

В настоящем исследовании представлены данные хромосомного анализа и определения уровня антинуклеарных антител к клеткам синовиоцитов у 28 больных в возрасте 35–50 лет с посттравматическим остеоартрозом коленных суставов. Было установлено, что в синовиоцитах больных посттравматическим остеоартрозом возрастает – в зависимости от титра антинуклеарных антител – на 80,6–84,4% количество синовиоцитов с цитогенетическими нарушениями в виде различных хромосомных aberrаций с прямо пропорциональной связью между этими явлениями, что подтверждает непосредственное влияние антинуклеарных антител на изменения ядерного аппарата синовиоцитов. После проведения радонотерапии в эквивалентной дозе альфа-излучения 280 мкЗв зафиксировано снижение на 50–75% титра антинуклеарных антител к клеткам синовиоцитов, уменьшение на 48,9% количества хромосомных aberrаций синовиоцитов и числа аномалий в их ядерном аппарате. Эти изменения способствовали повышению митотической активности синовиоцитов, увеличению на 52,5% активности белкового синтеза в них, снижению на 63,4% числа клеток с микроядрами и усилению пролиферативных процессов в синовиальной среде пораженного сустава.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, антинуклеарные антитела, посттравматический остеоартроз, радонотерапия

INFLUENCE RADONOTHERAPY TO CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND LEVEL OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES INTO SYNOVIAL CELLS OF PATIENTS WITH POSTTRAUMATIC OSTEOARTHRITIS

¹Udartsev Y.Y., ²Ilyinskikh N.N.¹Sanatorium «Altai-WEST», Belokurikha, e-mail: info@altai-west.ru;²The Siberian state medical university, Tomsk, e-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

At true study evidence results of chromosomal analysis and detection level of antinuclear antibodies for synovial cells of 28 patients at age 35-50 years with posttraumatic osteoarthritis of knee. Established increase into synovial of patients posttraumatic osteoarthritis depending to on titre of antinuclear antibodies on 80,6–84,4% number synoviocytes with cytogenetical disorders such as various chromosomal aberrations with straightproportional connection between this phenomena. After radonotherapy in 280 mkZv dose equivalent noted decrease on 50–75% titre antinuclear antibodies for synovial cells, reduction on 48,9% number chromosomal aberrations of synoviocytes find number anomalies in their nuclear apparatus. This changes promoted to elevation mitotical activity of synoviocytes, increase on 52,5% intensivity of protein syntesis, reduction on 63,4% number of cells with micronucleus, enhancement proliferatively processes in synovial medium of damaged joint.

Keywords: chromosomal aberrations, antinuclear antibodies, posttraumatic osteoarthritis, radonotherapy

Воспалительный процесс, сопровождающий развитие посттравматического остеоартроза (ПТОА), приводит к существенному изменению состава клеток синовиоцитов [2, 3]. В лечении этого заболевания широко используется радонотерапия (РТ), спецификой лечебного действия которой является ионизирующее альфа-излучение дочерних продуктов радона (ДПР) – радия А, В, С, С¹. Одним из обоснований к применению РТ при лечении ПТОА считается её способность стимулировать репаративные процессы в синовиоцитах, что, в конечном итоге, по-видимому, оказывает лечебный эффект при остеоартрозах [4, 5]. Однако данные о влиянии РТ на морфофункциональное состояние клеток синовиальной среды сустава получены визуально, без морфометрии и без привлечения компьютерных методов анализа этих клеток. Практически отсутствуют также данные по цитологическому

количественному изучению ядерного аппарата синовиоцитов, изменения в котором может свидетельствовать о внутриклеточных процессах на уровне генетических структур клетки. В исследованиях, проведенных нами ранее, было установлено, что под влиянием малых доз ионизирующего излучения у больных с посттравматическими остеоартрозами наблюдается существенное изменение в морфологии ядерного аппарата клеток синовиоцитов, что мы связывали с процессами полиплоидизации этих клеток и о возможном изменении активности апоптотических процессов и ДНК-репарации синовиоцитов [6]. Также имеются данные о том, что при некоторых заболеваниях суставов наблюдается повышенный уровень клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом, что коррелирует с повышенным уровнем антинуклеарных антител в сыворотке крови больных [7, 8, 9]. В связи

с тем, что при некоторых формах дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов наблюдается повышенный уровень антинуклеарных антител [10], закономерно предположить, что изменения ядерного аппарата наблюдаемые нами при посттравматических остеоартрозах, обусловлены проникновением в ядра клеток синовию антинуклеарных антител, что способствует появлению различных аномалий ядра синовиоцитов. Данные такого рода могут представлять особое значение при постановке точного диагноза, степени изменений синовию и эффективности терапии остеоартрита.

Цель исследования: изучить влияние радонотерапии на уровень антинуклеарных антител и хромосомные aberrации в клетках синовию больных посттравматическим остеоартрозом.

Материал и методы исследования

Под наблюдением находились 28 больных в возрасте 31–58 лет с посттравматическим остеоартрозом (ПТОА) коленных суставов (КС) I–II стадии по классификации Келлгрена-Лоуренса (1957). Больных для исследования отбирали методом сплошной выборки при добровольном письменном согласии в соответствии с решением Департамента государственной аттестации научных и научно-практических работников Минобробразования России «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (2002 г.) и «Правилами клинической практики» (Приказ МЗ РФ № 266 от 19.06.03). Исследование одобрено Этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета (протокол № 26 от 30.04.2008).

Пациентам назначали общие радоновые ванны с концентрацией радона 0,19 кБк/л, температурой 36 °С, экспозицией 15 минут, на курс 14 процедур, эквивалентная доза (ЭД) альфа-излучения за курс составила 280 мкЗв.

Синовиальную жидкость получали пункцией коленного сустава в объеме 0,1–0,2 мл до лечения при поступлении больного в санаторий и через 3 недели (по окончании лечения). Культивирование синовиоцитов проводили по методу P.S. Moorhead (1989) с некоторыми модификациями. Культуры инкубировали в термостате при 37° в течение 48–55 часов. За 3 часа до приготовления препаратов во флаконы с культурами синовиоцитов вводили колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг на 1 мл среды. Гипотоническую обработку производили 6 минут 0,56% раствором КС1. Фиксировали клетки в трех сменах смеси ледяной уксусной кислоты с метанолом (1:3). В последней смене фиксатора оставляли 0,5 мл надосадочной жидкости, в которой тщательно ресуспендировали клетки и капали по 1–2 капли на охлажденные предметные стекла, высушивали. Через 1–2 недели хранения препаратов проводили дифференциальное окрашивание хромосом, используя технику G-окраски. Препараты помещали в 0,025% раствор трипсина, подогретый до 37° на 1–2 минуты, ополаскивали в 2xSSC (стандартном солевом растворе), в трех сменах этилового спирта (70°, 96°, 100°), окрашивали по Романовско-Гимза разведенным 1:50 фосфатным буфером Зе-

ренсена pH 6,8 в течение 5–15 минут. Изучение хромосом проводили при увеличении 10x90, используя микроскоп Reichert NP-1640 (Австрия). Для анализа отбирали метафазы с учетом предложений Н.П. Бочкова (1974).

Для идентификации хромосом человека использовалась система классификации хромосом, принятая в 1971 году на Парижской конференции по цитогенетике человека [1]. У каждого человека изучено не менее 100 метафаз, а при использовании микроядерного теста – 3000 клеток. У каждого больного при использовании компьютерного метода анализировали 250–300 интерфазных клеток. Кроме того, визуально на препаратах просматривали у каждого больного в каждом случае (до и после лечения) не менее 10000 клеток, отмечая особенности морфологии ядра, наличие апоптотически измененных клеток, митозов, патологически измененных делящихся клеток согласно критериям, представленным нами ранее [2].

Из структурных нарушений хромосом учитывались хроматидные и хромосомные разрывы, ацентрические одиночные и парные фрагменты и обмены. Критерием отличия разрыва от пробела считалось обязательное его смещение, а не расстояние неокрашенного участка, поскольку длина пробела может варьироваться. Кроме того, учитывались аномалии в числе хромосом: анеуплоидные (гипо- и гиперплоидные) и полиплоидные клетки, а также частота ассоциаций ядрышкообразующих хромосом.

Активность эксцизионной ДНК-репарации оценивалась по методу Г.Д. Засухиной (1975). Репаративный синтез (РС ДНК), индуцированный 4-нитрохинолин-1-оксидом (4 НХО), определяли с помощью метода сцинтилляционной радиометрии по включению H^3 – тимидина в общую массу клеток при подавлении репликативного синтеза ДНК гидрохлоридом мочевинной (10 мкмоль/мл). Для индукции репаративного синтеза использовали 4 НХО в концентрации $2,5 \cdot 10^{-6}$ М при экспозиции 30 мин. Концентрация H^3 тимидина – 10 мкК/мл. Изотоп добавляли сразу после обработки мутагенами и инкубировали 2 часа в среде роста. Клетки промывали и определенное их количество осаждали на миллиметровые фильтры (диаметр пор 0,3 м) в 5%-й трихлоруксусной кислоте. Радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтилляторе на счетчике Mark III. Об интенсивности репаративного синтеза судили по величине индекса стимуляции, представляющего собой отношение имп/мин в обработанных мутагеном клетках к имп/мин в контрольных клетках.

Антитела к нДНК (ANA) обнаруживали с помощью реакции связывания комплемента по методу и при использовании тестовых систем разработанных Lahey Hitchcock Medical Center (Massachusetts USA). В зависимости от уровня антител всех обследованных больных разделяли на 3 группы: 1-я группа – больные имели титр антител 1:80 и менее; 2-я группа – 1:160–1:320 и 3-я более 1:320.

Для проверки достоверности различий между исследуемыми группами, в которых данные были распределены по нормальному закону, использовали t-критерий Стьюдента. В случае отличия вида распределения изучаемых переменных от нормального гауссова распределения, достоверность различий проверяли при помощи непараметрических критериев: U-критерия Манна-Уитни, χ^2 и методом ранговой корреляции по Спирмену с применением пакета компьютерных программ Statistica-5. Различия считали

достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Критерий χ^2 употребляли для сравнения эмпирического распределения частоты хроматидных и хромосомных разрывов и анеуплоидии по группам хромосом и по отдельным хромосомам набора с ожидаемым теоретическим распределением цитогенетических нарушений по группам хромосом и отдельным хромосомам. При этом предполагалась равная вероятность моносомий или трисомий для любой хромосомы генома, а также равная вероятность индукции повреждения для

любого участка у любой хромосомы набора, то есть пропорционально ее длине.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что у больных остеоартрозом по сравнению со здоровыми донорами существенно возрастает частота клеток синовии с цитогенетическими нарушениями (табл. 1).

Таблица 1

Частота синовиоцитов с цитогенетическими нарушениями в синовии у больных ПТОА КС в зависимости от уровня антинуCLEARных антител (в %)

Регистрируемый показатель	1-я группа больных	2-я группа больных	3-я группа больных
	Титр ANA 1:80 и ниже	Титр ANA 1:160- 1:320	Титр ANA выше 1:320
Число клеток со структурными нарушениями хромосом	3,5 ± 0,4	21,6 ± 1,5*	29,6 ± 0,9*
Число хромосом с нарушениями	3,9 ± 0,4	27,5 ± 2,1*	34,1 ± 2,2*
хромосомные разрывы	0,3 ± 0,2	2,6 ± 0,8*	3,9 ± 0,7*
хроматидные разрывы	2,5 ± 0,3	19,1 ± 1,6*	22,3 ± 1,7*
обмены	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6**	2,4 ± 0,4*
прочие	0,8 ± 0,2	4,3 ± 1,0*	5,8 ± 1,2*
Число клеток с измененным числом хромосом	4,6 ± 0,7	14,3 ± 0,9*	17,1 ± 1,5*
гипоплоидных	4,2 ± 0,6	9,1 ± 1,0*	11,1 ± 1,1*
гиперплоидных	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6**	3,0 ± 0,7*
полиплоидных	0,1 ± 0,08	3,4 ± 0,5**	3,0 ± 0,8*
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями	6,6 ± 0,7	34,1 ± 2,8*	42,3 ± 1,9*

Примечание:

* – значения, достоверно отличающиеся от данных 1-й группы больных с $p < 0,01$;

** – значения, достоверно отличающиеся от данных 1-й группы больных с $p < 0,05$.

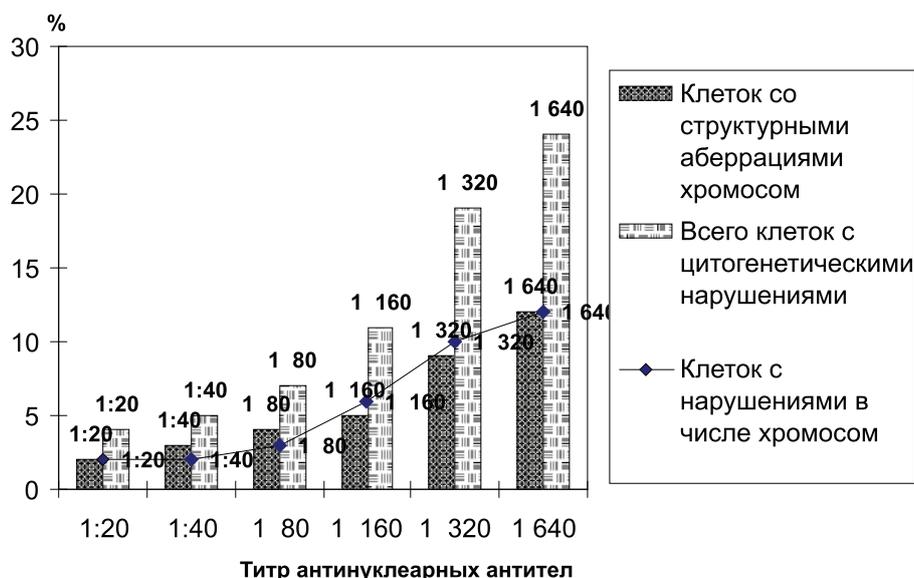
У больных 3-й группы отмечена наибольшая частота клеток с цитогенетическими нарушениями – 42,3 ± 1,9% (в контроле 6,6 ± 0,7%), при этом среди аномальных клеток наблюдались как с нарушениями в структуре хромосом (29,6 ± 1,5% при 3,5 ± 0,4% в контроле; $p < 0,01$), так и с нарушениями в числе хромосом (17,1 ± 1,5% при 4,6 ± 0,7% в контроле; $p < 0,01$). При этом у больных 2-й группы частота клеток с цитогенетическими нарушениями составляет соответственно 34,1 ± 0,8 и 14,3 ± 0,9%, что, однако, значительно превышает уровень, наблюдаемый в синовии у больных 1-й группы ($p < 0,01$). Корреляционный анализ полученных результатов свидетельствовал о том, что у больных наблюдается достоверная ($p < 0,01$) прямо пропорциональная зависимость ($r = 0,82$) между частотой клеток с цитогенетическими нарушениями и уровнем показателей антинуCLEARных антител (рисунок).

Полученные данные свидетельствовали (табл. 2), что после лечения у больных 3-й группы происходит достоверное снижение основных показателей цитогенетиче-

ского анализа синовиоцитов, в то же время эти данные были существенно выше наблюдаемого уровня у больных с титром антинуCLEARных антител, равным меньше 1:80 (см. табл. 1). Кроме того, после курса лечения с использованием РТ в ЭД альфа-излучения 280 мкЗв у больных отмечено существенное снижение титра антинуCLEARных антител в синовии. Так, если до лечения титр у больного составлял 1:320 и выше, то после курса лечения титр снизился до величины 1:160 или 1:80 и ниже.

Анализ ассоциаций ядрышкообразующих хромосом показал, что у больных с титром антинуCLEARных антител 1:320 и выше по сравнению с 1-й группой больных (титр антинуCLEARных антител 1:80 и ниже) наблюдается повышенный уровень числа ассоциирующих хромосом в расчете на одну клетку, при этом увеличивается число клеток с ассоциациями 5 и 4-х хромосом (табл. 3).

Выполненный корреляционный анализ свидетельствовал, что имеется достоверная обратно пропорциональная связь между числом клеток с большим числом ассоци-



Прямо пропорциональная связь между уровнем антинуклеарных антител и частотой клеток с цитогенетическими нарушениями в синовии больных ПТОА КС

Таблица 2

Частота клеток с цитогенетическими нарушениями в культурах синовиоцитов у больных ПТОА КС и изменение титра антинуклеарных антител в синовии до и после РТ с ЭД альфа-излучения 280 мкЗв

Регистрируемый показатель	До РТ (титр ANA выше 1:320)	После РТ (титр ANA ниже 1:160)
Число клеток со структурными нарушениями хромосом	29,6 ± 1,5	15,8 ± 2,2*
Число хромосом с нарушениями	34,1 ± 2,2	17,2 ± 2,4*
хромосомные разрывы	3,9 ± 0,7	1,2 ± 0,3*+*
хроматидные разрывы	22,3 ± 1,7	12,7 ± 2,1*
обмены	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,5
прочие	5,6 ± 1,0	1,4 ± 0,5*
Число клеток с измененным числом хромосом	17,1 ± 1,5	5,8 ± 0,8*
гипоплоидных	11,1 ± 1,1	2,7 ± 0,5*
гиперплоидных	3,0 ± 0,7	1,4 ± 0,5
полиплоидных	3,0 ± 0,8	1,7 ± 0,2**
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями	42,3 ± 1,9	21,6 ± 2,6*

Примечание: * – значения, достоверно отличающиеся от уровня наблюдаемого до лечения с $p < 0,01$; ** – значения, достоверно отличающиеся от уровня наблюдаемого до лечения с $p < 0,05$.

ирующихся акроцентрических хромосом и митотической активностью синовиоцитов ($r = -0,68$; $P < 0,01$). Кроме того, установлена зависимость между величиной ядрышка и числом хромосом, вступающих в ассоциации ($r = +0,72$; $P < 0,01$), а также митотической активностью культуры синовиоцитов ($r = +0,56$; $P < 0,01$).

Уровень цитогенетических aberrаций в клетках больных был определен также микроядерным тестом. Анализ проводили в блокированных цитохалазином В синовиоцитах. ДНК-репаративный синтез, индуцированный 4-нитрохиолин-1-оксидом

(4-НХО), определяли с помощью метода сцинтилляционной радиометрии по включению ^3H -тимидина в общую массу клеток при подавлении репликативного синтеза ДНК гидроксимочевинной (10 мкмоль/мл). Результаты микроядерного и ДНК-репаративного анализа свидетельствовали о том, что больные ПТОА КС 3-й группы независимо от его клинической формы представляют статистически однородную группу. Так, установлено, что у этих больных при поступлении и при выписке содержание синовиоцитов с микроядрами было достоверно выше, чем у больных 1-й группы (табл. 4).

Таблица 3

Число клеток с ассоциациями ядрышкообразующих хромосом в синовиоцитах больных ПТОА КС до и после РТ с ЭД альфа-излучения 280 мкЗв

Регистрируемый показатель		Число ассоциаций хромосом (в %)	
Число ядрышкообразующих хромосом, вступающих в ассоциации в расчете на 1 клетку		1,7 ± 0,3**	2,6 ± 0,4**
Без ассоциаций		8,0±1,1	5,3±0,7
2-х хромосом		30,1 ± 3,6	18,1 ± 3,8
3-х хромосом		31,0 ± 4,5	10,0 ± 4,6
4-х хромосом		15,4 ± 3,4	17,4 ± 3,6
5-ти хромосом		4,4 ± 1,1	15,0 ± 3,8
6-ти хромосом		4,3 ± 1,1	9,8 ± 1,2**
7-ми хромосом		3,2 ± 0,8	5,4 ± 0,9**
8-ми хромосом		2,2 ± 0,4	5,3 ± 0,6
9-ти хромосом		1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,5
10-ти хромосом		0,4 ± 0,2	2,9 ± 0,4

Примечание: * – значения достоверно отличающиеся от уровня наблюдаемого до лечения с $p < 0,01$; ** – значения достоверно отличающиеся от уровня наблюдаемого до лечения с $p < 0,05$.

Таблица 4

Уровень синовиоцитов с микроядрами и ДНК-репаративная активность в клетках синовиоцитов у больных ПТОА КС до и после РТ в ЭД альфа-излучения 280 мкЗв

Показатель	До РТ в ЭД альфа-излучения 280 мкЗв	После РТ в ЭД альфа-излучения 280 мкЗв
Число синовиоцитов с микроядрами (в %)	3,0 ± 0,2*	1,1 ± 0,1*
Индекс стимуляции ДНК-репаративной активности (в усл. ед.)	1,2 ± 0,2*	2,5 ± 0,4*

Примечание: * – достоверность различий $p < 0,05$ показателей 3-й группы от показателей 1-й группы.

Анализ состояния эксцизионной ДНК-репарации синовиоцитов показал, что после РТ с ЭД альфа-излучения 280 мкЗв у больных отмечается возрастание этого показателя до уровня, характерного для здоровых доноров, при этом в синовии наблюдается снижение числа клеток с микроядрами (см. табл. 4). Корреляционный анализ позволяет заключить о наличии обратно пропорциональной достоверной связи между анализируемыми значениями ДНК-репарации и числом клеток с микроядрами.

Выводы

1. В синовии больных с посттравматическим остеоартрозом возрастает – в зависимости от титра антинуклеарных антител – на 80,6–84,4% количество синовиоцитов с цитогенетическими нарушениями в виде различных хромосомных aberrаций с прямо пропорциональной связью между этими явлениями, что свидетельствует о непосредственном влиянии антинуклеарных антител на изменения в ядерном аппарате синовиоцитов.

2. Под влиянием радонотерапии в эквивалентной дозе альфа-излучения 280 мкЗв в синовии больных посттравматическим остеоартрозом происходят:

- снижение на 50–75% титра антинуклеарных антител к клеткам синовиоцитов;
- уменьшение на 48,9% количества хромосомных aberrаций синовиоцитов и числа аномалий в их ядерном аппарате;
- повышение митотической активности синовиоцитов;
- увеличение на 52% активности белкового синтеза в синовиоцитах;

- снижение на 63,4% числа клеток с микроядрами;
- усиление пролиферативных процессов в синовиальной среде пораженного сустава.

Список литературы

1. Захаров А.Ф., Бенюш В.А. Хромосомы человека: Атлас. – М.: Медицина, 1982. – 436 с.
2. Влияние лечения радоном на изменения морфологии синовиоцитов больных артритами / Н.Н. Ильинских, Е.Ю. Ударцев, Е.Н. Ильинских и др. // *Естествознание и гуманизм*. – 2007. – Т 4, № 4. – С. 38–39.
3. Влияние малых доз ионизирующего излучения на морфофункциональное состояние синовиоцитов у больных посттравматическим остеоартрозом / Е.Ю. Ударцев, Н.Н. Ильинских, Е.А. Распопова и др. // *Новые технологии восстановительной медицины и курортологии: XIV Российско-Португальский симпозиум (физиотерапия, реабилитация, спортивная медицина): Тезисы докладов*. – Португалия, 3-10 октября 2008. – С. 93–95.
4. Falkenbach A, Kovacs J, Franke A. et al. Radon therapy for the treatment of rheumatic diseases-review and meta-analysis of controlled clinical trials // *Rheumatol Int.* – 2005. – №25(3). – P. 205–210
5. Franke A, Reiner L, Resch KL. Long-term benefit of radon spa therapy in the rehabilitation of rheumatoid arthritis: a randomised, double-blinded trial // *Rheumatol Int.* – 2007. – №27(8). – P. 703-713.
6. Lee SH, Chang DK, Goel A. et al. Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis // *J Immunol.* – 2003. – №1;170(9). – P. 4869.
7. Knorr J., Sosnov E.R., Rivolta R.D. Induced of chromosomes aberrations in osteoarthritis and antinuclear antitels // *Rheumatol. Int.* . – 2001. – №21 (2). – P. 234–239.
8. Seardoni H., Muller M.J., Hsu E.T. Cellular lasing and aetiology of late somatic effects of ionizing radiation // *Bull.Nat. Inst. Anim. India.* – 2001. – Vol. 19. – P. 37–43.
9. Study on biologic effects of radon and thermal therapy on osteoarthritis / K. Yamaoka, F. Mitsunobu, K. Hanamoto et al. // *J Pain.* – 2004. – Vol. 5(1). – P. 20–25.
10. Yooh N., Unitar G.F., Rooh T. Detecting single antibody-forming cells // In: *Progress in immunology*. – New York, 2008. – Vol. 3. – P. 339–355.

Рецензенты:

Корниязова Е.В., д.м.н., профессор кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет Росздрава РФ», г. Барнаул;

Кулишова Т.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой восстановительной медицины ФПК и ППС ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет Росздрава РФ», г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 30.05.2011.