

Маркеры нестабильности генома у больных ювенильным ревматоидным артритом

Т.П. Макарова, М.С. Ильина

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Россия

Markers of genomic instability in patients with juvenile rheumatoid arthritis

T.P. Makarova, M.S. Ilyina

Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russia

Цель исследования. Определение состояния нестабильности генома у пациентов с ювенильным ревматоидным артритом и оценка его зависимости от биологических (возраст и пол) и клинических (форма, вариант течения, активность, продолжительность, функциональный класс заболевания и серотип больного) параметров.

Материал и методы. Обследованы 95 детей. Из них 68 (39 девочки и 29 мальчиков) — с различными формами ювенильного ревматоидного артрита, 12 — находящихся без лечения (на этапе верификации диагноза). Контрольную группу составили 15 условно-здоровых детей в возрасте от 3 до 16 лет. Для оценки нестабильности генома использовали метод определения микроядер в бинуклеарных лимфоцитах периферической крови в условиях цитохалазинового блока (*in vitro*).

Результаты. У всех обследованных детей в активной форме заболевания независимо от пола выявлено достоверное увеличение уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в лимфоцитах по сравнению с группой условно-здоровых детей. Максимальные значения этого показателя наблюдались в возрастной группе от 5 до 10 лет и у детей с длительностью заболевания менее 1 года. По мере повышения активности процесса уровень бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами увеличивался. После лечения достоверное снижение показателя отмечено у больных со II степенью активности заболевания при обоих вариантах ювенильного ревматоидного артрита.

Заключение. Статистически значимое повышение уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в лимфоцитах периферической крови может свидетельствовать о формировании у детей нестабильности генома как патогенетического звена ювенильного ревматоидного артрита.

Ключевые слова: дети, ювенильный артрит, нестабильность генома, микроядра, бинуклеарные лимфоциты с микронуклеусами, патогенез.

Для цитирования: Макарова Т.П., Ильина М.С. Маркеры нестабильности генома у больных ювенильным ревматоидным артритом. Рос вестн перинатол и педиатр 2019; 64:(6): 73–78. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-6-73-78

Research purpose. To determine the state of the genome instability in patients with juvenile rheumatoid arthritis and to assess its dependence on biological (age and sex) and clinical (form and variant of the flow of juvenile rheumatoid arthritis, its activity, duration, functional class and serotype of the patient) parameters.

Material and methods: 95 children were surveyed. Among them, 68 (39 girls and 29 boys) — with various forms of juvenile rheumatoid arthritis, 12 — without treatment (at the stage of verification of the diagnosis). The control group consisted of 15 conditionally healthy children aged 3 to 16 years. To assess the genome instability, the method of determination of micronuclei in peripheral blood binuclear lymphocytes under the conditions of a cytochalasin block (*in vitro*) was used.

Results: All examined children in the active form of the disease showed a significant increase in the level of binuclear lymphocytes with micronuclei in lymphocytes compared with a group of conditionally healthy children. The maximum values of this indicator were observed in the age group from 5 to 10 years and in children with a disease duration of up to 1 year. As the activity of the process increases, the level of binuclear lymphocytes with micronuclei rises. After treatment, a significant decrease in the indicator content was detected in patients with the II degree of disease activity in both cases of juvenile rheumatoid arthritis.

Conclusion. Statistically significant increase in the level of binuclear lymphocytes with micronuclei in peripheral blood lymphocytes may indicate the formation of genome instability in children as a pathogenetic part in juvenile rheumatoid arthritis.

Key words: children, juvenile arthritis, genome instability, microkernels, binuclear lymphocytes with micronuclei, pathogenesis.

For citation: Makarova T.P., Ilyina M.S. Markers genomic instability in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2019; 64:(6): 73–78 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-6-73-78

Ювенильный ревматоидный артрит — артрит неустановленной причины, продолжающийся в течение 6 нед и возникший до 16-летнего возраста, при исключении других форм патологии. Заболе-

вание нуждается в ранней диагностике и назначении адекватной терапии [1, 2].

Анализ литературы показал, что спектр исследований, направленных на формирование научно-обоснованной концепции патогенеза ювенильного ревматоидного артрита, за последние годы начинает смещаться в область молекулярно-биологических работ иммуногенетического статуса пациентов: детализируются отклонения в иммунной системе и генетических показателях, определяются алгоритмы их взаимоотношений, оценивается роль последних в механизме становления и развития заболевания [3, 4]. Поя-

© Макарова Т.П., Ильина М.С., 2019

Адрес для корреспонденции: Макарова Тамара Петровна — д.м.н., проф. кафедры госпитальной педиатрии Казанского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0002-5722-8490 makarova-kgmu@mail.ru

Ильина Мария Сергеевна — асс. кафедры госпитальной педиатрии Казанского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0001-8050-7693

420012 Казань, ул. Бутлерова, д. 49

РОССИЙСКИЙ ВЕСТНИК ПЕРИНАТОЛОГИИ И ПЕДИАТРИИ, 2019; 64:(6)

ROSSIYSKIY VESTNIK PERINATOLOGII I PEDIATRII, 2019; 64:(6)

вились сведения, что заболевание инициируется множеством экзо и/или эндогенных активных факторов, которые действуют на фоне генетической предрасположенности, постоянно поддерживая аутоиммунный ответ на компоненты синовиальной оболочки [1, 5].

В патогенезе ювенильного ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний все большее внимание уделяется изучению повреждений генетического аппарата отдельных клеток и механизмов, инициирующих эти нарушения [5]. Стимулом для такого рода исследований явилось обнаружение у больных ювенильным ревматоидным артритом высокого содержания целого ряда метаболитов, обладающих выраженной мутагенной активностью (эндомутагенов): гидроперекисей, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, супероксидного аниона, пероксида водорода, оксида азота, гистамина, серотонина, фактора некроза опухоли, атипичных нуклеотидов — трифосфатов. Их избыточное накопление отмечалось не только в клетках и синовиальной жидкости поврежденных суставов, но и в клетках, дистанцированных от очага воспаления [3].

Все эти процессы при нормальной жизнедеятельности не представляют серьезной опасности для генома клетки. Однако в условиях нарушенного метаболизма они становятся источником повышенной генерации эндомутагенов. Высокое содержание их на фоне дисрегуляторных явлений способствует возникновению у больных ювенильным ревматоидным артритом случайных, ненаправленных мутаций ДНК в различных клетках, провоцируя появление феномена нестабильности генома [4]. В такой ситуации повреждения функционально значимых участков ДНК могут привести к необратимому нарушению экспрессии генов, дестабилизации молекулярных свойств клетки, изменению ее функций, некрозу или апоптозу. Это особенно опасно, если в сферу действия эндомутагенов попадают клетки, формирующие и контролирующее функциональное состояние нейро-, эндокринной, сердечно-сосудистой, иммунной и других систем [5]. При хронизации процесса массивный негативный эффект неминуемо приведет к утяжелению заболевания, снижению эффективности лечения и неблагоприятному прогнозу [6, 7].

Обнаружение у больного ювенильным ревматоидным артритом повреждений ДНК на геномном или хромосомном уровне позволяет ставить вопрос о наличии в патогенезе болезни генетической компоненты в виде нестабильности генома со всеми вытекающими отсюда последствиями. В специальной литературе обсуждается вопрос о формировании нестабильности генома в патогенезе соматических заболеваний, несущих аутоиммунную составляющую: системная красная волчанка, детский церебральный паралич, бронхиальная астма, заболевания вирусной этиологии [8]. Однако публикаций, изучающих повреждения генетического

аппарата клеток больных ювенильным ревматоидным артритом, мы не обнаружили.

Цель исследования: определить состояние нестабильности генома у больных ювенильным ревматоидным артритом и оценить его зависимость от биологических (возраст и пол) и клинических (форма, вариант течения, активность, продолжительность, функциональный класс заболевания и серотип больного) параметров.

Характеристика детей и методы исследования

Обследованы 95 детей, из них 68 (39 девочек и 29 мальчиков) — с различными формами ювенильного ревматоидного артрита и 12 детей, находящихся на этапе верификации диагноза и не получающих лечение. Контрольную группу составили 15 условно-здоровых детей в возрасте от 3 до 16 лет.

Диагноз ювенильного ревматоидного артрита устанавливали на основании клинико-анамнестических данных и результатов инструментальных исследований в соответствии с восточноевропейскими диагностическими критериями, разработанными ревматологами стран Восточной Европы и России в конце 70-х годов XX века и рекомендованных Союзом педиатров России практикующим врачам. Исследования проводили дважды — в момент поступления больного в стационар и спустя 2–3 нед после курса лечения.

Все больные были разделены на 3 группы. При классификации заболевания мы придерживались рекомендаций Американской ассоциации ревматологов. Наш выбор основывается также на том, что большинство исследователей-ревматологов едины во мнении, что существенной является триада клинических вариантов дебюта ювенильного ревматоидного артрита: системный, поли- и олигоартикулярный. У 44 (60%) больных диагностирован полиартикулярный вариант, у 20 (25%) — олигоартикулярный, у 4 (5%) — системный вариант. Во всех 3 группах преобладали девочки (56,25%).

При поли- и олигоартикулярном варианте средний возраст больных составил 10 лет, при системном варианте — 9 лет. Самому младшему ребенку было 5 лет, старшему — 16 лет. У большинства больных системным вариантом был поздний ювенильный ревматоидный артрит. Средняя длительность болезни составила 6 лет. По степени активности процесса распределение было следующим: 13 (20,3%) детей с олигоартикулярным вариантом I степени, 7 (10,9%) — с олигоартикулярным вариантом II степени, 16 (25%) — с полиартикулярным вариантом I степени, 28 (43,7%) — с полиартикулярным вариантом II степени.

Все пациенты и/или их родители подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Работа выполнена на базе кардиологического отделения ГАУЗ «Детская республикан-

ская клиническая больница» Минздрава Республики Татарстан. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета Минздрава России.

Регистрация нестабильности генома в клетках человека может осуществляться различными путями. В настоящей 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 различных патологиях, — оценка микроядер в бинуклеарных лимфоцитах крови детей (*in vitro*) в условиях цитохалазин-нового блока. Культивирование лимфоцитов проводили по традиционной методике [9]. Анализировали уровень бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами. Уровень двуядерных лимфоцитов, содержащих микроядра, подсчитывали в 1000 просмотренных двуядерных лимфоцитах периферической крови человека. Результаты выражены в промилиях.

Количество бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами у больных определяли в момент поступления детей в стационар и после лечения. Индекс пролиферации рассчитывали по формуле: (число одноядерных клеток + 2 • число двуядерных клеток + 3 • число полиядерных клеток) / число проанализированных клеток.

Цитохалазин В вводили в культуру на 44-м часу от начала культивирования фитогемагглютинин — стимулированных лимфоцитов. На 72-м часу клетки фиксировали, отмывали и прокрашивали азуэрозином по Романовскому—Гимзе. Цитохалазин, ковалентно связываясь с оперенным концом актинового филамента клетки, блокирует цитокинез в лимфоцитах, стимулированных к делению фитогемагглютинином.

Особенность представленного метода в том, что он позволяет количественно учитывать много параме-

тров. Для нас важными были два момента. Во-первых, культура лимфоцитов рекомендована Всемирной организацией здравоохранения в качестве тест-системы при оценке влияния на клетку мутагенных факторов. Это позволяет сравнить полученные нами результаты с данными других авторов. Кроме того, регистрация микроядер дает возможность судить не только об интенсивности процесса повреждения хромосом, но и о повреждении митотического аппарата клетки, контролирующего кинетику хромосом.

При обработке данных применяли парный (при анализе изменений в одной и той же группе) или двухвыборочный *t*-тест Стьюдента, тесты Шапиро—Уилкса, Манна—Уитни, Вилкоксона. Использовали программный пакет SAS system version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, США).

Результаты и обсуждение

При суставной форме заболевания (поли- и олигоартикулярный варианты) выделяли группу больных, не получающих базисную терапию на этапе верификации диагноза ($n=12$), и группу пациентов ($n=64$), находящихся на базисной терапии — метотрексат, нестероидные противовоспалительные препараты.

Анализ результатов определения уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в крови у всех обследуемых детей в активной форме заболевания показал достоверное его увеличение независимо от пола по сравнению с группой условно-здоровых детей, $p<0,001$ (см. таблицу). Максимальные значения данного показателя определялись при полиартикулярном варианте, достоверно отличаясь от показателей как контрольной группы ($p<0,001$), так и у больных с олигоартикулярным вариантом ($p<0,001$).

Статистически значимых отличий данного показателя в зависимости от пола не обнаружено ($22,3\pm6,0\%$ — у мальчиков; $20,5\pm6,0\%$ у девочек), соответственно ($p>0,05$).

Таблица. Уровень бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами (%; $M\pm SD$) в лимфоцитах периферической крови у больных ювенильным ревматоидным артритом в зависимости от пола и возраста

Table. The level of binuclear lymphocytes with micronuclei (%; $M\pm SD$) in the peripheral blood lymphocytes of patients with juvenile rheumatoid arthritis depending on gender and age

Параметр	Контрольная группа ($n=15$)	дети, не получающие терапию (на этапе верификации диагноза; $n=12$)	Ювенильный ревматоидный артрит			
			дети с полиартикулярным вариантом ($n=44$)		дети с олигоартикулярным вариантом ($n=20$)	
			до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Пол						
мальчики	$8,6\pm2,6$	$16,0\pm4,0^*$	$20,5\pm6,0^*$	$13,9\pm3,5^*$	$17,5\pm6,1^*$	$13,0\pm3,5^*$
девочки	$9,4\pm2,7$	$15,5\pm3,6^*$	$22,3\pm6,0^*$	$13,4\pm3,4^*$	$21,3\pm6,6^*$	$13,6\pm3,7^*$
Возраст, годы						
5—10	$9,3\pm2,5$	$16,2\pm4,5^*$	$21,7\pm5,8^*$	$13,0\pm3,1^*$	$19,9\pm6,3^*$	$12,5\pm3,0^*$
11—16	$8,5\pm2,9$	$14,2\pm2,3^*$	$21,3\pm6,6^*$	$14,6\pm3,7^*$	$19,7\pm7,1^*$	$14,5\pm4,1^*$

Примечание. * Достоверность различий при сравнении с показателями контрольной группы ($p<0,001$).

После лечения через 21 день у детей с полиартикулярным и олигоартикулярным вариантами независимо от пола было выявлено достоверное и более выраженное снижение уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в крови по сравнению с таковым в аналогичной группе без лечения ($p<0,001$). В то же время этот показатель оставался достоверно выше, чем в контрольной группе ($p<0,05$).

Проведен сравнительный анализ уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами у детей от 5 до 10 лет и от 11 до 16 лет. Группы были разделены по такому принципу в связи дебютом заболевания у большинства детей в возрасте 5 лет. Максимальные значения наблюдались в возрастной группе от 5 до 10 лет (см. таблицу) как при олигоартикулярном, так и при полиартикулярном варианте ($21,7\pm 5,8$ и $19,9\pm 6,3\%$ соответственно; $p<0,001$) и достоверно отличались от показателей в группе детей в возрасте 11–16 лет ($p<0,001$).

Таким образом, уменьшение количества бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в крови у больных с суставной формой ювенильного ревматоидного артрита, находящихся на лечении, по нашему мнению, является благоприятным фактором в коррекции анеугенного эффекта (образование микроядер в процессе клеточного деления, возникших при разрыве хромосом в лимфоцитах). Однако эффективность базовой терапии явно недостаточна для полного устранения признаков нестабильности генома у больных с данным заболеванием.

Интересные данные нами получены при анализе результатов по изучению уровня бинуклеарных лим-

фоцитов с микронуклеусами у больных с суставной формой ювенильного ревматоидного артрита в зависимости от продолжительности заболевания. Максимальное увеличение этого показателя было выявлено в группе детей с длительностью заболевания менее 1 года по сравнению с контрольной группой, $p<0,001$ (рис. 1). В группе детей с длительностью заболевания больше 1 года этот показатель был достоверно ниже (при олигоартикулярном варианте – 19%, при полиартикулярном варианте – 20,5%; $p<0,05$). Максимальное увеличение уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами отмечено у больных с полиартикулярным вариантом – $23,1\pm 6,3\%$ (по сравнению с группой условно-здоровых детей $p<0,001$). Следовательно, характер выраженности повреждения генома может зависеть от клинических форм и продолжительности течения заболевания.

При анализе содержания бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в крови в зависимости от степени активности заболевания (рис. 2) выявлено, что по мере повышения активности процесса увеличивается уровень бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами по сравнению с показателями как контрольной группы ($p<0,05$), так и группы больных без терапии ($p<0,05$), что может демонстрировать тяжесть клинических проявлений. После лечения достоверное снижение содержания бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами выявлено у больных со II степенью активности заболевания при обоих вариантах ювенильного ревматоидного артрита ($p<0,05$).

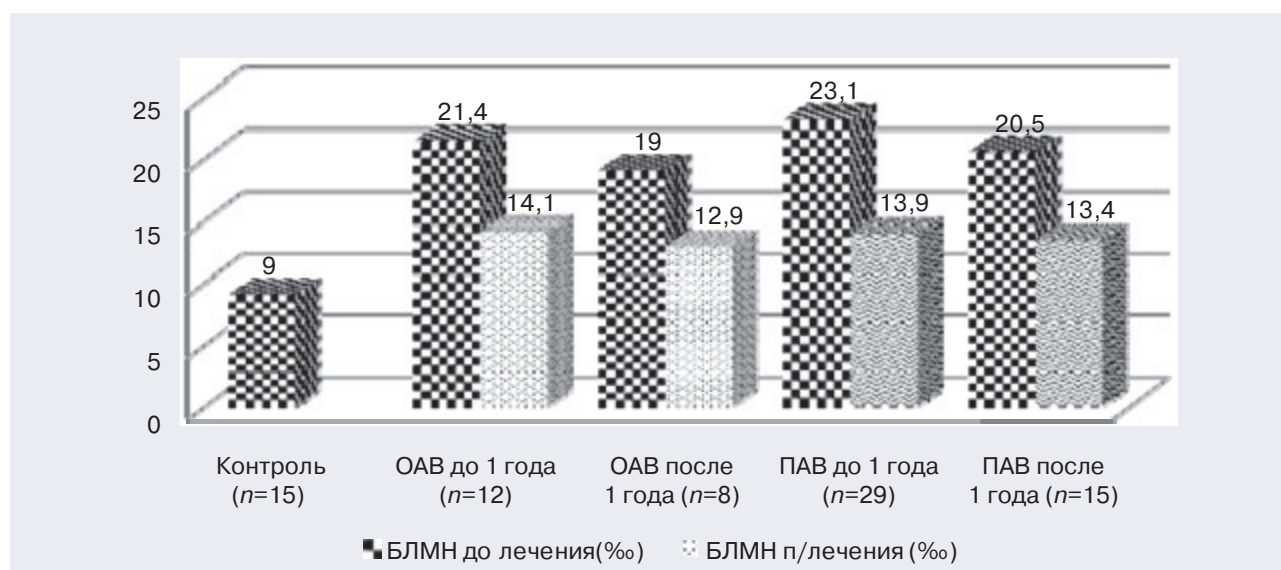


Рис. 1. Уровень бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в лимфоцитах периферической крови при суставной форме ювенильного ревматоидного артрита в зависимости от продолжительности заболевания.

ПАВ – полиартикулярный вариант; ОАВ – олигоартикулярный вариант; БЛМН – бинуклеарные лимфоциты с микронуклеусами.

Fig. 1. The level of binuclear lymphocytes with micronuclei, depending on the duration of the disease with articular form of juvenile rheumatoid arthritis.

ПАВ – polyarticular variant; ОАВ – oligoarticular variant; БЛМН – binuclear lymphocytes with micronuclei.

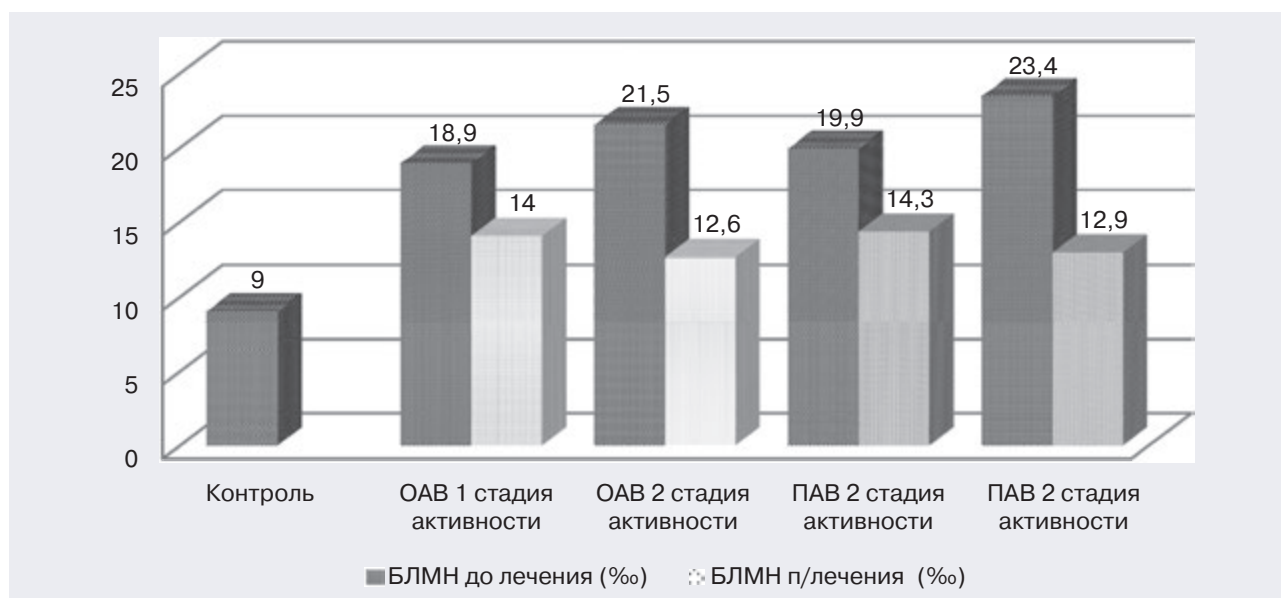


Рис. 2. Уровень бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в зависимости от степени активности заболевания при суставной форме ювенильного ревматоидного артрита.

ПАВ – полиартрикулярный вариант; ОАВ – олигоартрикулярный вариант; БЛМН – бинуклеарные лимфоциты с микронуклеусами.

Fig. 2. Level of binuclear lymphocytes with micronuclei, depending on the degree of activity of the disease with articular form of juvenile rheumatoid arthritis. ПАВ – polyarticular variant; ОАВ – oligoarticular variant; БЛМН – binuclear lymphocytes with micronuclei.

Заключение

Таким образом, изучение состояния генома у больных ювенильным ревматоидным артритом, проведенное цитогенетическим методом, показало, что статистически значимое повышение уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами в периферической крови может свидетельствовать о формировании у детей нового патогенетического звена – нестабильности генома. В свою очередь изучение феномена нестабильности генома при ювенильном ревматоидном артрите позволяет получить новые сведения о патогенезе этого инвалидизирующего заболевания.

Нестабильность генома при ювенильном ревматоидном артрите, тестируемая по уровню бинуклеарных

лимфоцитов с микронуклеусами в крови, не зависит от пола и возраста пациентов, но зависит от формы заболевания, варианта течения, степени активности и наличия иммуносупрессивной терапии. Метод Human MicroNucleus project может применяться для изучения вероятности возникновения ювенильного ревматоидного артрита у детей с отягощенной по ревматическим заболеваниям наследственностью.

Проводимая терапия сопровождается статистически значимым снижением уровня бинуклеарных лимфоцитов с микронуклеусами у детей с ювенильным ревматоидным артритом, что является благоприятным фактором в коррекции анеугенного эффекта. Однако базисная терапия явно недостаточна для полного снятия эффекта нестабильности генома у больных с данной патологией.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Ювенильный ревматоидный артрит. Учебное пособие. Под ред. А.А. Баранова, Е.И. Алексеева, П.Ф. Литвицкого. М.: ВЕДИ, 2017; 368. [Juvenile rheumatoid arthritis. Textbook. A.A. Baranov, E.I. Alekseev, P.F. Litvitsky (eds). Moscow: VEDI, 2017; 368 (in Russ.)]
2. Жолобова Е.С., Шахбазян И.Е., Улыбина О.В. Ювенильный ревматоидный артрит. Руководство по детской ревматологии. Под ред. Н.А. Геппе, Н.С. Подчерняевой, Г.А. Лыскиной. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2011; 162–245. [Zholobova E.S., Shakhbazyan I.E., Ulybina O.V. Juvenile rheumatoid arthritis. Guide to pediatric rheumatology. N.A. Geppe, N.S. Podchernyaeva, G.A. Lyyskina (eds). Moscow: GEOTAR-Media, 2011; 162–245 (in Russ.)]
3. Ramos V.A., Ramos P.A., Dominguez C. The role of oxidative stress inflammation in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Jornal de Pediatria* 2000; 76(2):125–32. DOI: 0.2223/JPED.45
4. Chou P. H., Kageyama S., Matsuda S. Detection of lipid peroxidation – induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues. *Chem Res Toxicol* 2010; 23(9): 1442–1448. DOI: 10.1021 / tx100047d
5. Demirkaya E., Cok I., Durmaz E. Genotoxicity of anti-tumor necrosis factor therapy in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010; 15(62): 73–77. DOI: 10.5935/0004-2749.20150024

6. Рохлина Ф.В., Новик Г.А. Опыт определения концентрации метотрексата в сыворотке крови, у детей больных ювенильным идиопатическим артритом. Сб. материалов I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» 2013; 1: 62–63. [Rokhlina F.V., Novik G.A. Experience in determining serum methotrexate concentration in children of patients with juvenile idiopathic arthritis. Proc. of the 1st All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation “Innovations in the nation’s health” 2013; 1: 62–63 (in Russ.)]
7. Михельс Х., Никишина И.П., Федоров Е.С., Салугина С.О. Генно-инженерная биологическая терапия ювенильного артрита. Научно-практическая ревматология 2011; 1: 78–93. [Mihel’s Kh., Nikishina I.P., Fedorov E.S., Salugina S.O. Genetic engineering biological therapy of juvenile arthritis. Nauchno-prakticheskaya revmatologiya 2011; 1: 78–93 (in Russ.)]
8. Кравченко И.Э., Фазылов В.Х., Семенов В.В. Нестабильность клеточного генома при патологических состояниях инфекционного генеза. Эпидемиология и инфекционные болезни 2010; 4: 47–50. [Kravchenko I.E., Fazylov V.Kh., Semenov V.V. Cellular genome instability in pathological states of infectious genesis. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni 2010; 4: 47–50 (in Russ.)]
9. Fenech M., Bonassi S., Turner J. 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. Mutat Res 2006; 534(1–2): 45–64.

Поступила: 24.07.19

Received on: 2019.07.24

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.