

••• ГЕНЕТИКА ••• GENETICS •••

УДК: 616.72-002-053.6:576.316

**Особливості С-поліморфізму у пробандів, хворих на остеоартроз
В.Є.Нефідова***Державна установа «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків АМН України» (Харків, Україна)*

Проведено дослідження розмірів гетерохроматинових районів 1qh, 9qh, 16qh, Yqh у пробандів із остеоартрозом (ОА) та здорових однолітків. Встановлено збільшення частоти С-гетерохроматинових районів середніх ($63,5 \pm 2,1$ % при ОА та $52,1 \pm 2,2$ % у здорових підлітків, $p < 0,001$) та маленьких розмірів ($29,1 \pm 2,5$ % та $22,5 \pm 2,8$ % відповідно, $p > 0,05$), що може свідчити про С-поліморфізм гетерохроматину у пробандів із ОА. Екстремальні варіанти С-гетерохроматину реєструвалися у 1,5% хворих на остеоартроз на хромосомі 1.

Ключові слова: остеоартроз, хромосоми, кариотип, С-поліморфізм, гетерохроматин.

**Особенности С-полиморфизма у пробандов, больных остеоартрозом
В.Е.Нефидова**

Проведены исследования размеров гетерохроматиновых районов 1qh, 9qh, 16qh, Yqh у пробандов с остеоартрозом (ОА) и здоровых сверстников. Установлено увеличение частоты С-гетерохроматиновых районов средних ($63,5 \pm 2,1$ % при ОА и $52,1 \pm 2,2$ % у здоровых подростков, $p < 0,001$) и маленьких размеров ($29,1 \pm 2,5$ % и $22,5 \pm 2,8$ % соответственно, $p > 0,05$), что может свидетельствовать о С-полиморфизме гетерохроматина у пробандов с ОА. Экстремальные варианты С-гетерохроматина регистрировались у 1,5% больных остеоартрозом на хромосоме 1.

Ключевые слова: остеоартроз, хромосомы, кариотип, С-полиморфизм, гетерохроматин.

**Some features of C-polymorphism in probands with osteoarthritis
V.Ye.Nefidova**

Investigation of 1qh, 9qh, 16qh and Yqh heterochromatin area sizes was performed in probands with osteoarthritis (OA) and in age-matched healthy adolescents. There was established certain increase in frequency of C-heterochromatin regions of average sizes ($63,5 \pm 2,1$ % at OA and $52,1 \pm 2,2$ % in healthy adolescents, $p < 0,001$) and of small sizes ($29,1 \pm 2,5$ % and $22,5 \pm 2,8$ % respectively, $p > 0,05$) that testified to heterochromatin C-polymorphism in probands with OA. C-heterochromatin extreme variants were registered in 1,5% patients with OA on chromosome 1.

Key words: osteoarthritis, chromosomes, karyotype, C-polymorphism, heterochromatin.

Вступ

Серед ревматичних захворювань, загальна розповсюдженість яких в усьому світі дорівнює 15–20 %, остеоартроз (ОА) є однією з найбільш поширених хвороб суглобів. Хоча розвиток даної патології і не впливає на життєвий прогноз, захворювання є однією з основних причин передчасної втрати працездатності й інвалідності, хронічного болючого синдрому, що значно знижує якість життя пацієнтів (Данилюк, Ященко, 2005; Борткевич, 2006).

На даний момент ця патологія розглядається як мультифакторіальне захворювання, що розвивається внаслідок механічних та біологічних причин з порушенням процесів відновлення і руйнування тканини, як безпосередньо в хрящі, так і в кістці, розташованій під хрящем і в тканинах, оточуючих суглоб. Причина розвитку деформуючого остеоартрозу криється в невідповідності між механічним навантаженням на суглоб і можливостями хряща пручатися цьому навантаженню (Малолкин, Меншикова, 2005). На сьогодні існує думка, що в основі прогресування ОА лежить безліч складно взаємодіючих один з одним причин і механізмів, тільки частково пов'язаних з віковими змінами (Коваленко, Шуба, 2003). В останні роки спостерігається збільшення частоти ОА в різних вікових категоріях та «омолодження» хвороби. Встановлено, що серед підлітків, хворих на ОА, переважають варіанти, сформовані на тлі гіпермобільного синдрому (ГМС), причому останній характеризувався високим ступенем виразності. Остеоартроз, що виник на тлі ГМС, відрізнявся

швидким розвитком і прогресуванням захворювання. У таких підлітків виявляються значні порушення в обміні сполучнотканинних компонентів, системах імунітету та підвищений рівень хромосомних аберацій (Лебець та ін., 2004, 2006; Багацька, Нефідова, 2007; Кашкалда та ін., 2008).

Вивчення природи і біологічної значущості поліморфізму гетерохроматинових районів (ГР) хромосом до цього часу залишається однією з найбільш складних проблем у клінічній цитогенетиці. Функція ГР остаточно не визначена, незважаючи на те, що фактично завершена міжнародна програма «Геном людини» (Гинтер, 2003). Основна проблема полягає в питаннях про зв'язок поліморфізму ГР зі специфічними фенотипічними проявами та про складність диференціювання «нормального» гетерохроматинового варіанту від його патологічної зміни. На сьогодні ГР розглядають як специфічні ділянки хромосом, які включають послідовності ДНК, що часто повторюються, обов'язково цитологічно властивістю яких є конденсований стан протягом клітинного циклу, позитивне С-забарвлення та пізня реплікація (Прокофьева-Бельговская, 1986). Відомо, що геном людини являє собою відносно нестабільну систему, причому поліморфізм на рівні ДНК насамперед пов'язаний із прицентромерними регіонами хромосом, які складаються з послідовностей ДНК, що часто повторюються. Згідно із сучасними уявленнями, послідовності ДНК, з яких складається прицентромерний гетерохроматин хромосом людини, є хромосомоспецифічними, що обумовлено епігенетичним процесом модифікації гістонів, які можуть в значній мірі варіювати в розмірі у різних індивідів, якісно змінюватися лише в ході філогенезу, залишаючись стабільними як в ході онтогенезу, так і в популяції. Добре відома значна варіабельність прицентромерного гетерохроматину у різних індивідуумів (Акопян, 2006).

У роботах деяких вітчизняних та російських дослідників встановлені особливості поліморфізму ГР хромосом при ревматичних хворобах, порушеннях репродуктивної функції, онкопатології, затримці росту та статевому розвитку, недиференційованих формах розумової відсталості, множинних вадах розвитку й інших патологічних станах (Багацкая, 1991; Подугольникова и др., 1994; Кириллова, Цветкова, 1994). Причому відомо, що в нормальній популяції подібні зміни хромосом спостерігаються з частотою до 4–6 % (Ворсанова и др., 2008), тоді як серед дітей з недиференційованими формами розумової відсталості, множинними уродженими вадами і/або мікроаномаліями розвитку носії макроріантів С-гетерохроматину хромосом зустрічаються з частотою до 16–20 % (Демидова и др., 1999). У той же час у дітей зі спадковими синдромами нехромосомного ґенеза, що супроводжувалися затримкою росту, спостерігались відсутність макроріантів і збільшення частоти мікроріантів С-гетерохроматину. В даний час немає єдиного погляду на роль варіантів прицентромерного гетерохроматину у виникненні тієї або іншої патології, але існує припущення, що значний дисбаланс гетерохроматину може впливати на функціонування генів, активних в ембріогенезі й тим самим приводити до нестабільності генома людини.

Слід зазначити, що багато дослідників займалися вивченням хромосомних варіантів у різних популяціях людини. Проводилися роботи по вивченню розподілу С-ГР хромосом, в яких було показано, що частота змін в прицентромерних гетерохроматинових районах хромосом не залежить від належності носіїв до різних рас і етнічних груп, хоча в кожній з них є свої особливості.

В сучасних дослідженнях зроблено спроби пов'язати формування патологічного фенотипу людини з феноменом поліморфізму ГР, але існують певні труднощі щодо обліку нормальних чи патологічних розмірів гетерохроматину. Також із структурно-функціональними особливостями С-гетерохроматину пов'язують індукцію центромерної нестабільності, адже завдяки специфічній структурі С-гетерохроматину забезпечується формування центромерного білкового комплексу, який приймає участь у процесах мітозу. Отже, саме дезорганізація хроматину в центромерних та перичентромерних районах хромосом може викликати порушення функціонування комплексу центромерних білків та ризик аномального перебігу мітозу. Центромерна нестабільність хромосом 1, 9, 16 описана у пробандів з різними станами імунодефіциту (Акопян, 2006). Автором висловлювалось припущення, що ці цитогенетичні аномалії можуть слугувати маркерами подібних станів, але на сьогодні питання щодо взаємозв'язку між клінічними симптомами імунодефіциту і центромерною нестабільністю залишається ще відкритим.

Таким чином, вивчення поліморфізму С-гетерохроматину при остеоартрози у осіб молодого віку є одним із напрямків, який досліджено недостатньо. Це й обумовило мету дослідження – вивчити особливості С-поліморфізму хромосом 1, 9, 16 та Y у пробандів, хворих на ОА.

Матеріал і методика

Цитогенетичний аналіз проведено у 28 хворих на ОА обох статей у віці від 12 до 17 років (21 дівчинки і 7 хлопців), які знаходились на лікуванні в кардіоревматологічному відділенні ДУ «ІОЗДП АМН України». Групу порівняння складали 28 практично здорових однолітків.

Матеріалом для цитогенетичного аналізу слугували препарати хромосом, отримані з культури лімфоцитів периферичної крові. Методика виконувалася за стандартним мікрометодом (Moorheed et al., 1960). Постановка культури лімфоцитів периферичної крові передбачала виконання ряду етапів: культивування лімфоцитів периферичної крові, стимульованих фітогемаглютиніном ("Sigma", Німеччина) у суміші поживного середовища RPMI 1640 та ембріональної сироватки протягом 72 годин у термостаті при $t +37^{\circ}\text{C}$. За 2 години до кінця культивування проводили зупинку мітозів внесенням колхіцину у концентрації 0,1 мкг/мл. Після гіпотонічної обробки KCl (0,075 M) протягом 40 хвилин клітини фіксували сумішшю етанолу та крижаної оцтової кислоти (3:1). Клітинну суспензію капали на мокрі охолоджені предметні скельця та висушували над полум'ям.

Для вивчення поліморфізму С-гетерохроматинових районів хромосом 1, 9, 16 та Y проводили забарвлення препаратів хромосом за С-методом, основними етапами якого є обробка хромосом в 5% розчині $\text{Ba}(\text{OH})_2$ протягом 4–8 хвилин при кімнатній температурі, інкубація в стандартно-сольовому розчині при температурі $+65^{\circ}\text{C}$ протягом 1 години, проведення через етиловий спирт 70° , 80° , 100° та забарвлення фарбником Гімза на фосфатно-сольовому буфері, рН 6,8. Для кожного пробанда досліджували по 5 метафазних пластинок, обираючи для аналізу хромосоми із чіткими границями С-сегментів. Оцінку розмірів С-гетерохроматину проводили за п'ятибальною системою.

Аналіз метафазних пластинок хромосом та оцінку розмірів С-сегментів проводили за допомогою біокулярного мікроскопа «Leica Galen III».

Статистична обробка результатів дослідження виконувалася на PC IBM з використанням табличних процесорів «SPSS Statistics 17,0». Для визначення значущості розбіжностей між ознаками, що порівнювались, використовували критерій Стьюдента (Гланц, 1999).

Результати та обговорення

При проведенні цитогенетичного аналізу хворих на ОА та здорових однолітків було встановлено, що каріотип обстежених пробандів відповідав нормальному чоловічому (46, XY) та нормальному жіночому (46, XX). У підлітків з ОА було визначено підвищений рівень хромосомних аберацій (XA), який дорівнював 5,27%, що вірогідно перевищувало рівень XA у дітей контрольної групи (1,15%, $p < 0,001$). Частота аберацій на одну клітину становила 0,053, що майже у 4 рази перевищувало частоту XA у здорових дітей (0,012, $p < 0,001$).

Дослідження розмірів гетерохроматинових районів 1qh, 9qh, 16qh, Yqh у всіх обстежених свідчило про відсутність статистично значущих розбіжностей у їх розмірах у осіб обох статей, що дало змогу об'єднати дівчат і хлопців в одну групу. Дотепер не доведено, чи пов'язана варіабельність ГР із генетичною нейтральністю і відсутністю у гетерохроматина спеціальних функцій або сама варіабельність складає особливість тих функцій, що властиві гетерохроматину. С-сегменти вторинних перетяжок хромосом 1, 9, 16 і дистального району Y-хромосоми є найбільшими і варіабельними за своїми розмірами. Результати, отримані при вивченні поліморфізму С-гетерохроматинових районів (ГР) аутосом 1, 9, 16 та статевої Y-хромосоми, свідчать про те, що найбільша варіабельність притаманна хромосомі 1. Як у пробандів з ОА, так і у здорових підлітків на хромосомі 1 спостерігалися С-сегменти розміром від 1 до 5 балів, причому в контрольній групі вірогідно частіше виявлялися ГР, які оцінювалися 4 та 5 балами, тоді як в групі хворих на ОА реєструвалися ГР розміром 3 бали (табл. 1). В популяціях людини поліморфізм С-гетерохроматину коливається у визначених межах, але найбільше часто зустрічаються С-сегменти середнього розміру (2–3 бали). Носії макро- (4–5 балів) і мікроріантів (1 бал) С-ГР фенотипово не відрізнялися. Частота носіїв таких екстремальних варіантів невелика. Згідно з дослідженнями ряду авторів (Подугольникова и др., 1990; Демидова и др., 1999; Багацкая, 2001; Ворсанова и др., 2008) у пацієнтів з різною патологією найчастіше реєструвалися С-сегменти середнього розміру, які оцінювалися балом 3, що співпадає і з нашими даними.

Таблиця 1.

Бальна оцінка С-гетерохроматинових сегментів хромосоми 1 у пробандів, хворих на ОА, і здорових підлітків

Групи спостереження	Розмір сегментів С-гетерохроматину, бали				
	1	2	3	4	5
Хворі на ОА	1,1±0,6	31,5±2,8	64,8±2,9	2,2±0,9	0,4±0,4
Здорові однолітки	3,6±1,1	24,6±2,6	47,8±3,0	20,4±2,4	3,6±1,1
P	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,01

Щодо аутосом 9 та 16, то у хворих на ОА С-гетерохроматиніві блоки розміром 1 та 5 балів в цих хромосомах не реєструвалися. Кількість хромосом з ГР розміром 3 бали була майже однаковою в обох групах. Вірогідно частіше зустрічалися хромосоми 9 та 16 з ГР, що відповідали 2 балам, у хворих на ОА та достовірно частіше реєструвалися хромосоми з розміром С-ГР 4 бали в групі здорових однолітків. Отже, аналіз розмірів ГР хромосом 9 та 16 свідчив про збільшення числа метафазних пластинок зі зменшеними варіантами С-гетерохроматину. У здорових підлітків розміри С-гетерохроматинових блоків мали більш виражений поліморфізм, ніж у пробандів із ОА.

Результати бальної оцінки С-гетерохроматинових сегментів хромосом 9 та 16 у пробандів, хворих на ОА, і здорових підлітків надані в табл. 2.

Таблиця 2.

Бальна оцінка С-гетерохроматинових сегментів аутосом 9 та 16 у пробандів, хворих на ОА, і здорових підлітків

Групи спостереження	Розмір сегментів С-гетерохроматину, бали									
	1		2		3		4		5	
	9	16	9	16	9	16	9	16	9	16
Хворі на ОА	-	-	42,7±3,0	42,0±3,0	56,9±3,0	58,0±3,0	0,4±0,4	-	-	-
Здорові однолітки	3,6±1,1	2,9±1,0	23,9±2,5	26,1±2,6	55,7±3,0	57,1±3,0	16,8±2,2	13,9±2,1	-	-
P	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001		

Екстремальні варіанти С-ГР Y-хромосоми (1 та 5 балів) в групі хворих на ОА були відсутні. Статистично значущі відмінності виявлено у кількості хромосом із прицентроммерним гетерохроматином, який оцінювався балами 3 та 4. В групі пробандів переважала кількість Y-хромосом із С-сегментами розміром 3 бали (табл. 3), причому виражених фенотипових відхилень у хворих не спостерігалось. У здорових однолітків переважно зустрічалися розміри ГР Y-хромосоми, які оцінювались у 3 та 4 бали. Слід відзначити, що екстремальний варіант (5 балів) реєструвався тільки в групі здорових підлітків та його частота не перевищувала декількох відсотків.

Таблиця 3

Бальна оцінка С-гетерохроматинових сегментів Y-хромосоми у пробандів, хворих на ОА, і здорових підлітків

Групи спостереження	Розмір сегментів С-гетерохроматину, бали				
	1	2	3	4	5
Хворі на ОА	-	22,8±7,1	74,3±7,4	2,9±2,8	-
Здорові однолітки	-	15,4±3,2	47,7±4,4	30,8±4,1	6,1±1,4
P		>0,05	<0,01	<0,001	<0,001

Отже, для хромосом 1, 9, 16 у хворих на ОА найбільш частими варіантами були С-сегменти розміром 2 та 3 бали, а для Y-хромосоми – 3 бали. У здорових однолітків розміри ГР мали більш виражений поліморфізм у порівнянні із хворими на ОА.

Таким чином, характер розподілу розмірів С-сегментів хромосом 1, 9, 16, Y як у хворих на ОА, так і у здорових однолітків відповідав нормальному. У хворих на ОА визначалось превалювання маленьких та середніх розмірів С-гетерохроматинових сегментів хромосом 1, 9, 16 та Y, що може свідчити про менш виражену варіабельність С-гетерохроматину у пробандів із ОА порівняно зі здоровими підлітками.

Висновки

1. Дослідження розмірів С-гетерохроматинових блоків хромосом 1, 9, 16, Y у хворих на ОА встановило збільшення частоти С-ГР середніх (63,5±2,1 % при ОА та 52,1±2,2 % у здорових підлітків, $p < 0,001$) та маленьких розмірів (29,1±2,5 % та 22,5±2,8 % відповідно, $p > 0,05$).

2. Аналіз екстремальних варіантів С-гетерохроматину показав, що гетерохроматиніві блоки розміром 1 та 5 балів реєструвалися у хворих на ОА, у 1,5%, тільки на хромосомі 1, тоді як у здорових

однолітків екстремальні варіанти були присутні як на хромосомі 1 ($p < 0,01$), так і на хромосомах 9 ($p < 0,01$), 16 ($p < 0,01$) та Y ($p < 0,001$).

Список літератури

- Акопян Г.Р. Центромерна нестабільність та поліморфізм хромосом в нормі і при патології людини. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.15 «Генетика» / Інститут гігієни та медичної екології імені О.М.Марзеева АМНУ. – К., 2006. – 40с.
- Багацкая Н.В. Характеристика цитогенетических и дерматоглифических показателей при ювенильном ревматоидном артрите. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 «Генетика» / ИОЗДП АМНУ. – Х., 1991. – 17с.
- Багацкая Н.В. Полиморфизм С-гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16, Y у мальчиков-подростков с задержкой полового развития // Вісник проблем біології і медицини. – 2001. – Вип.2. – С. 54–58.
- Багацька Н.В., Нефідова Н.В. Цитогенетичні особливості у дітей та підлітків, хворих на остеоартроз // Вісн. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. – 2007. – №768. – С. 40–45.
- Борткевич О.П. Ранний остеоартроз: анализ вариантов формирования, подходы к лечению // Мат. наукового симпозиуму «Дегенеративні ураження опорно-рухового апарату у дітей та підлітків». – Х., 2006. – С. 34–51.
- Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинико-биологические аспекты. – М.: ИД «Медпрактика-М», 2008. – 300с.
- Гинтер Е.К. Медицинская генетика. – М.: Медицина, 2003. – 448с.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459с.
- Данилюк С., Ященко О. Ревматичні хвороби в практиці сімейного лікаря // Ліки України. – 2005. – №5 (94). – С. 22–23.
- Демидова И.А., Ворсанова С.Г., Колотий А.Д. и др. Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое обследование детей с синдромом Картагенера // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1999. – №4. – С. 35–39.
- Кашкалда Д.А., Лебець І.С., Матвієнко О.В. Сезонна динаміка активності ферментів протеолізу білків сполучної тканини у підлітків із остеоартрозом // Медицина сьогодні і завтра. – 2008. – №1. – С. 79–81.
- Кириллова Е.А., Цветкова Т.Г. С-поліморфізм хромосом при порушеннях репродуктивної системи жінчин // Генетика. – 1994. – Т.30, №4. – С. 546–548.
- Коваленко В.М., Шуба Н.М. Ревматичні хвороби суглобів: медико-соціальні проблеми в Україні та шляхи їх вирішення // Укр. ревматол. журн. – 2003. – №3 (13). – С. 3–6.
- Лебець І.С., Костюріна Н.А., Матвієнко О.В. та ін. Клініко-біохімічна характеристика остеоартрозу у підлітків // Вісн. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. – 2004. – №639. – С. 60–63.
- Лебець І.С., Матвієнко О.В., Шевченко Н.С. Особливості суглобового синдрому у підлітків із початковими проявами остеоартрозу // Укр. ревматол. журн. – 2006. – Т.23, №1. – С. 69–72.
- Малолкин В.И., Меншикова И.В. Остеоартроз коленного сустава: современный подход к проблеме лечения // Тер. Архив. – 2005. – Т.77, №3. – С. 83–86.
- Подугольникова О.А., Буряя Т.И., Солонищенко В.Г. С-гетерохроматин в семьях с наследственной низкорослостью // Цитология. – 1994. – Т.36, № 11. – С. 1041–1047.
- Подугольникова О.А., Солонищенко В.Г., Неудахин Е.В., Ежикова Е.В. Уменьшенные гетерохроматические районы хромосом 1, 9, 16 у детей с задержкой физического развития // Мат. Второго Всес. съезда мед. генетиков. – М., 1990. – С. 354–355.
- Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. – Москва: Наука, 1986. – 430с.
- Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // Exper. Cell. Res. – 1960. – Vol.20. – P. 613–616.

Представлено: Л.К.Пархоменко / Presented by: L.K.Parkhomenko

Рекомендовано до друку: Н.В.Багацькою / Recommended for publishing by: N.V.Bagatskaya

Подано до редакції / Received: 28.12.2009.

© В.Є.Нефідова, 2009

© V.Ye.Nefidova, 2009