

УДК: 575.224.4:616.72-002-053.2/5

## Визначення рівня спонтанних хромосомних порушень у дітей, хворих на ювенільний ревматоїдний артрит О.В.Медзяновська

Державна установа «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН» (Харків, Україна)  
iozdp@iozdp.org.ua

Проведено обстеження дітей, хворих на ювенільний ревматоїдний артрит, з визначенням рівня спонтанних хромосомних аберацій. Результати досліджень показали, що аберації були присутні як в клітинах хворих (основна група) так і у здорових (контрольна група) дітей. Але у хворих на ревматоїдний артрит їх частота була вищою в 1,8 рази порівняно зі здоровими однолітками (4,66 %, і 2,55% відповідно  $p < 0,001$ ). Спектр хромосомних порушень був також ширшим у дітей основної групи. У нашому дослідженні не отримано відмінностей за частотою хромосомних порушень залежно від статі та форми захворювання. Розподіл на підгрупи залежно від тривалості ревматоїдного артриту показав підвищення рівня хромосомної нестабільності у пробандів з тривалістю захворювання менше 3-х років (5,04%), порівняно з тривалістю більше 3-х років (3,2%;  $p < 0,01$ ).

**Ключові слова:** ювенільний ревматоїдний артрит, діти, нестабільність геному, хромосомні аберації.

## Определение уровня спонтанных хромосомных нарушений у детей, больных ювенильным ревматоидным артритом Е.В.Медзяновская

Проведено обследование детей, больных ювенильным ревматоидным артритом, с определением уровня спонтанных хромосомных абераций. Результаты исследований показали, что аберации присутствовали как в клетках больных (основная группа), так и здоровых (контрольная группа) детей. Но у больных ревматоидным артритом их частота была выше в 1,8 раза по сравнению со здоровыми сверстниками (4,66% и 2,55% соответственно,  $p < 0,001$ ). Спектр хромосомных нарушений был также шире у детей основной группы. В нашем исследовании не получено отличий по частоте хромосомных нарушений в зависимости от пола и формы заболевания. Разделение на подгруппы в зависимости от длительности ревматоидного артрита показало увеличение уровня хромосомной нестабильности у пробандов с длительностью заболевания меньше 3-х лет (5,04%), по сравнению с длительностью больше 3-х лет (3,2%;  $p < 0,01$ ).

**Ключевые слова:** ювенильный ревматоидный артрит, дети, нестабильность генома, хромосомные аберации.

## Determination of the level of spontaneous chromosome abnormalities of the children with juvenile rheumatoid arthritis O.V.Medzianovska

The examination of the children with juvenile rheumatoid arthritis has been carried out and the level of spontaneous chromosome abnormalities has been defined. It has been shown that abnormalities are present in the cells of children with juvenile rheumatoid arthritis (the study group) and in the cells of healthy children (the control group). But the children with rheumatoid arthritis have the higher level (up to 1.8 times) comparing with the healthy peers (4.66% and 2.55% respectively,  $p < 0.001$ ). The range of chromosome abnormalities was wider among the children of the study group. In our investigation there were no differences in chromosome abnormalities depending on a sex and a form of the disease. Division into subgroups (depending on the rheumatoid arthritis continuance) showed the growth of the level of chromosome instability of the probands with continuation of the disease less than 3 years (5.04%) comparing with continuation more than 3 years (3.2%,  $p < 0.01$ ).

**Key words:** juvenile rheumatoid arthritis, children, genomic instability, chromosome abnormalities.

### Вступ

Відомо, що ювенільний ревматоїдний артрит (ЮРА) – хронічне прогресуюче системне захворювання мультифакторіального генезу, клінічними проявами якого є, головним чином, ерозивний артрит. Поширення патологічного процесу при ЮРА на інші органи та системи зумовлює сприйняття

його як хронічного системного захворювання сполучної тканини з автоімунною природою (Клубова, 2002; Коваленко, Каминский, 2000). До теперішнього часу достеменно не встановлена причина виникнення ЮРА, тому вважають, що це гетерогенна за своїм ґенезом патологія. Існують фактори, які викликають схильність до розвитку захворювання і які сприяють його реалізації. Генетичні фактори викликають підвищену схильність і впливають на патогенез ЮРА, детермінацію його клінічного розмаїття. Існують гіпотези відносно ролі вірусів і бактерій в його виникненні. Ініціаторами дії цих факторів можуть бути часті захворювання, які ослаблюють імунні механізми, переохолодження, інсоляції, щеплення, травми, несприятливі екологічні фактори (радіація, накопичення важких металів), хронічні психоемоційні стреси (Беяева, 2006; Костюрина и др., 2002).

Захворювання починається до 16-річного віку і продовжується у дорослих, впливаючи на життя пацієнта, стан його здоров'я, адаптацію в сім'ї та соціумі. Головними завданнями лікарів є контроль над виникненням і розвитком захворювання, досягнення ремісії, профілактика ускладнень, забезпечення найкращого перебігу хвороби зі сприятливим прогнозом (Макарова и др., 2013).

Але для успішного лікування потрібно визначити механізми розвитку патологічного процесу, особливості біохімічних процесів, генетичні основи ЮРА, імуногенетичний статус.

Крім цього, важливою ланкою у вивченні всіх особливостей перебігу патології є визначення стабільності геному. Ця необхідність викликана тим, що ЮРА – це складне автоімунне захворювання, яке протікає під впливом багатьох потенційно мутагенних факторів: порушення імунітету, складного лікування з використанням цитостатиків, протизапальних і гормональних препаратів, підвищення рівня ендомутагенів. Підвищення рівня ХА у хворих з порушеннями імунітету різної природи, в тому числі при автоімунних захворюваннях, відмічено в дослідженнях багатьох авторів (Ильинских и др., 2004; Фролов и др., 1993). У роботі (Дворник та ін., 2004) це явище пояснюється зниженням імунореактивності, і в першу чергу, Т-клітинної системи. Крім того, при порушенні роботи імунної системи інтерферон виробляється в недостатній кількості, а він виступає активатором процесів репарації ДНК.

Серед медикаментозних препаратів, згідно з літературними даними, найбільш виражену мутагенну дію мають цитостатики і антиметаболіти. Зазвичай вони безпосередньо пошкоджують молекулу ДНК в процесі реплікації і, діючи як інгібітори веретена поділу, здатні викликати анеуплоїдію і поліплоїдію. Існує декілька антиметаболітів, які мають виражену мутагенну дію, в тому числі антагоніст фолієвої кислоти – метотрексат (Фролов и др., 1993). Що стосується ендомутагенезу, то його інтенсивність пов'язана з суттєвим підвищенням рівня ендомутагенів, як за рахунок підвищення рівня екзомутагенів, так і за рахунок власних ендомутагенів (активних форм кисню, серотоніну, глутаміну, таурину, деяких цитокінів, та інших, мутагенні властивості яких доведені в багатьох експериментах). Ці ендомутагени приймають участь в різних метаболічних циклах, які в фізіологічних умовах не несуть особливої загрози для геному клітини. Така безпека гарантується, перш за все, системою антимутагенезу. Але в умовах розвитку патологічного процесу відбувається порушення нормального перебігу реакцій в метаболічних циклах, і вони перетворюються в генератори ендомутагенів. Водночас порушується вироблення метаболітів-протекторів всіх ешелонів захисту геному. Через це підвищується загальний пул ендомутагенів в організмі на фоні послаблення активності геномпротекторних систем (Семенов и др., 2007). Все це в умовах порушеного метаболізму може призвести до формування випадкових, неспрямованих мутацій в різних клітинах і локусах молекули ДНК, і спровокувати появу феномену нестабільності генома (Макарова и др., 2013).

Зрозуміло, що клітини, в яких з'являються хромосомні аберації (ХА), не можуть правильно функціонувати, порушується експресія генів, з'являються аномальні метаболіти, які мають мутагенну активність. Таким чином, коло замикається, аномальні метаболіти викликають появу хромосомних аберацій, а хромосомні аберації – появу аномальних метаболітів. Це, в свою чергу, негативно впливає на перебіг захворювання, його прогноз і лікування. Для цього необхідно вчасно виявляти хворих із підвищеним рівнем хромосомних аберацій і призначати фармакологічні препарати для захисту геному (Семенов и др., 2007).

Метою роботи є визначення рівня спонтанних хромосомних аберацій у дітей та підлітків, хворих на ЮРА, залежно від статі, клінічної форми та тривалості захворювання.

#### **Матеріали і методи досліджень**

Цитогенетичний аналіз був проведений у 59 дітей, хворих на ЮРА (20 хлопчиків і 39 дівчаток), – основна група, і 36 здорових однолітків (14 хлопчиків і 22 дівчинки) – контроль, у віці від 5 до 17 років.

Основна група була додатково розділена на підгрупи залежно від форми ЮРА (суглобова і суглобово-вісцеральна) і тривалості захворювання (до 3-х років і більше 3-х років). Діагноз ЮРА встановлювався лікарями ДУ «ІОЗДП АМН України» на підставі комплексного клініко-лабораторного обстеження. Лікувальна терапія зазвичай включала один препарат з групи нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) (диклофенак, ібупрофен, напроксен, моваліс) та цитостатики (метотрексат, циклоспорин А, інфліксимаб, сульфасалазин, 6 меркаптопурин), які призначалися по індивідуальній схемі: цитостатики – 7,5 мг/м<sup>2</sup> 1 раз на тиждень в 2 прийоми з 12-годинним інтервалом (не менше 3-х місяців і до кількох років), НПЗЗ – 1–3 мг/кг на добу (не більше 6–12 тижнів). Також майже всі хворі на ЮРА приймали фолієву кислоту – 1 мг 3 р/д (в дні без прийому цитостатиків, тривало). Глюкокортикоїди (преднізолон, метипред) призначались в окремих випадках (у 6 дітей) – 1–1,5 мг/кг на добу з урахуванням добових ритмів (тривалість курсу – за показаннями).

Культивування лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) проводилось за загальноприйнятою методикою (Зерова-Любимова, Горовенко, 2003). Постановка культури включала культивування ЛПК, стимульованих фітогемаглютиніном в суміші поживного середовища RPMI 1640 і ембріональної телячої сироватки на протязі 72 годин в термостаті при +37°C. За 2 години до закінчення культивування проводили зупинку мітозів на стадії метафази, додаванням колхіцину. Наступним етапом була обробка культуральної суміші гіпотонічним розчином КСІ. Фіксували препарати сумішшю етанолу і крижаної оцтової кислоти. Клітинну суспензію наносили на мокре охолоджене скло і висушували над полум'ям. Препарати фарбувались рутинним і GTG-методами. Аналізували від 50 до 100 метафазних пластинок з визначенням всіх типів ХА (хромосомних, хроматидних, геномних). Було проаналізовано 5577 метафаз у дітей основної групи і 3295 – контрольної. Метафазні пластинки вивчалися за допомогою біокулярного мікроскопа Ergaval (Німеччина).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили на РС з використанням програми Excel. Для визначення вірогідності відмінностей використовували критерій Стьюдента (Атраментова, Утевская, 2008).

### Результати та обговорення

Цитогенетичний аналіз показав, що каріотип всіх дітей відповідав нормальному жіночому – 46,XX або нормальному чоловічому – 46,XY. Розподіл хворих на ЮРА за статевою ознакою не показав вірогідних відмінностей у частоті хромосомних порушень: у дівчаток рівень ХА склав 4,76%, а у хлопців 4,48% ( $p > 0,05$ ). В контрольній групі також загальний рівень хромосомних порушень суттєво не відрізнявся: у хлопців (3,13%) і у дівчат (2,17%,  $p > 0,05$ ). У зв'язку з тим, що відмінності між групами не є вірогідними, підгрупи були об'єднані в дві групи: основна (пробанди, хворі на ЮРА) та контрольна (здорові однолітки).

Спонтанний рівень хромосомних аберацій в основній групі склав 4,66%, що перевищувало у 1,8 разів частоту цих порушень в контрольній групі (2,55%,  $p < 0,001$ ). При цьому в основній групі лише у однієї дитини (1,6%) не реєструвались взагалі ХА, а в контрольній групі – у 5 дітей (13,8%). Досліджуючи індивідуальну частоту хромосомних порушень, ми встановили, що максимальний рівень аберацій серед здорових дітей досягав 7%, а серед хворих на ЮРА коливався від 7 до 14%. Аналіз спектру ХА показав, що у хворих на ЮРА реєструвались одиночні фрагменти і термінальні делеції (хроматидний тип); парні фрагменти, подовження центромер, розриви по центромері, дуплікації (хромосомний тип); передчасне розходження центромер, поліплоїдні клітини, нерозходження хромосом (порушення геномного типу).

В контрольній групі спектр порушень був значно меншим; так, серед аберацій хроматидного типу виявлялися одиночні фрагменти; хромосомного – парні фрагменти і розрив по центромері; геномного – поліплоїдні клітини і передчасне розходження хромосом. Порівняння частоти різних видів порушень між основною і контрольною групами показало суттєве підвищення рівня хроматидних аберацій, а саме одиночних фрагментів у хворих на ЮРА ( $p < 0,001$ ). Тобто у дітей основної групи загальний та індивідуальний рівень ХА і спектр порушень був вищим, ніж у дітей контрольної групи. Слід відмітити, що у дослідженнях, які проводилися в ДУ «ІОЗДП НАМН» у 90-і роки минулого сторіччя, також було вивчено спонтанний рівень хромосомних порушень у хворих на ЮРА, який дорівнював 1,96%, що майже у 2,5 рази перевищувало частоту ХА у здорових однолітків (0,8%,  $p < 0,05$ ) (Багацкая, 1992). Але враховуючи вплив багаточисельних негативних чинників середовища на стан здоров'я населення в останні роки, цілком зрозумілим стає підвищення рівня спонтанного мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові як у хворих на ЮРА, так і здорових дітей. Суттєве збільшення рівня бінклеарних лімфоцитів крові у дітей,

хворих на ЮРА, в 1,4 рази порівняно зі здоровими однолітками встановлено в роботі (Макарова и др., 2013): 15,3% у хворих проти 9,0% у здорових дітей (за допомогою мікроядерного тесту).

Досліджуючи частоту ХА у хворих на ЮРА в залежності від форми (суглобової та суглобово-вісцеральної) захворювання, ми не встановили вірогідних відмінностей ( $p > 0,05$ ); але у пробандів з тривалістю захворювання до 3-х років рівень ХА збільшився порівняно з тривалістю хвороби більше 3-х років (5,04% проти 3,2%;  $p < 0,01$ ). Отримані дані можна пояснити більшою активністю запального процесу у хворих з тривалістю хвороби до 3-х років, який супроводжується активацією імунopatологічних реакцій і призводить до порушень сполучної тканини, а також своєчасним застосуванням цитостатичної та протизапальної терапії на тлі фолієвої кислоти до настання ремісії.

Таблиця 1.

**Частота хромосомних аберацій у хворих на ювенільний ревматоїдний артрит та здорових однолітків, %±m**

Типи аберацій	Основна група, n=59	Контрольна група, n=36	Вірогідність, P
Хроматидний тип:	2,44 ± 0,23	1,00 ± 0,17	<0,001
- одиночні фрагменти	2,40 ± 0,21	1,00 ± 0,17	<0,001
- термінальні делеції	0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,00	>0,05
Хромосомний тип:	1,57 ± 0,17	1,00 ± 0,17	>0,05
- парні фрагменти	1,34 ± 0,15	0,91 ± 0,17	>0,05
- подовження центромер	0,03 ± 0,05	0,00 ± 0,00	>0,05
- розрив по центромері	0,18 ± 0,06	0,09 ± 0,05	>0,05
- дуплікації	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	>0,05
Геномний тип:	0,62 ± 0,09	0,54 ± 0,12	>0,05
- передчасне розходження центромер	0,30 ± 0,07	0,12 ± 0,06	>0,05
- поліплоїдна клітина	0,30 ± 0,07	0,42 ± 0,11	>0,05
- нерозходження хромосом	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	>0,05

Обговорюючи питання про причини виникнення нестабільності геному у хворих на ювенільний ревматоїдний артрит після застосування терапії, можна припустити негативний вплив фармакологічних препаратів на стан хромосомного апарату. Так, у роботі (Jarmalaite et al., 2008) показано підвищення рівня хромосомних порушень, яке пов'язано зі збільшенням загальної дози метотрексату. Незначне збільшення рівня хромосомних аберацій у хворих на ревматоїдний артрит показано також в роботі (Jасох, 1982) при лікуванні аспірином або солями золота. Можна припустити, що мутагенна дія фармацевтичних препаратів не є настільки суттєвою, щоб викликати надмірно високий рівень хромосомних порушень; крім того, хворі приймають фолієву кислоту, яка приймає участь у процесі реплікації ДНК і є необхідною для створення і підтримки в здоровому стані нових клітин, її прийом може зменшувати генотоксичний і цитотоксичний ефект цитостатиків та інших медичних препаратів та елімінувати хромосомні порушення (Jarmalaite et al., 2008). Можливо на початкових етапах захворювання ініціаторами виникнення хромосомних порушень є імунopatологічні реакції, які в подальшому перетворюються в замкнуті патологічні цикли, що самопідтримуються завдяки процесам ендомутагенезу. У будь-якому випадку завданням лікарів і цитогенетиків є контроль за станом хромосомного апарату дітей та підлітків, хворих на ЮРА, адже клітини, що містять хромосомні порушення, мають високі шанси стати на шлях онкогенної трансформації. Отже, на сьогодні ця проблема залишається не до кінця розкритою і потребує подальшого вивчення.

#### Висновки

Таким чином, цитогенетичний аналіз показав, що каріотип у обстежених хворих на ЮРА і у здорових дітей відповідав нормальному жіночому 46,XX, і чоловічому — 46,XY. Хромосомні порушення зустрічались як в клітинах хворих, так і здорових дітей. В основній групі рівень хромосомних порушень



склав 4,66%, що вірогідно перевищувало частоту ХА у дітей контрольної групи – 2,55% в 1,8 рази ( $p < 0,001$ ). Спектр хромосомних порушень в групі хворих на ЮРА був більш вираженим. У хворих з тривалістю захворювання до 3-х років рівень ХА був вірогідно вищим, ніж у групі з тривалістю більше 3-х років (5,04% проти 3,2% відповідно,  $p < 0,01$ ).

#### Подяка

Автор висловлює щире подяку своєму науковому керівнику д.б.н. Н.В.Багацькій за допомогу в написанні статті та цінні рекомендації.

#### Список літератури

- Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. уч. зав. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248с. /Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statisticheskiye metody v biologii: uchebnik dlya stud. vyssh. uch. zav. – Gorlovka: Likhtar, 2008. – 248s./
- Багацька Н.В. Характеристика цитогенетических и дерматоглифических показателей при ювенильном ревматоидном артрите // Охрана здоровья детей и подростков. – К.: «Здоров'я», 1992. – Вып.23. – С. 102–106. /Bagatskaya N.V. Kharakteristika tsitogeneticheskikh i dermatoglificheskikh pokazateley pri yuvenil'nom revmatoidnom artrite // Ohhrana zdorov'ya detey i podrostkov. – K.: «Zdorov'ya», 1992. – Vyp. 23. – S. 102–106./
- Беляева Л.М. Болезни суставов у детей и подростков: учебно-методическое пособие. – Мн.: БелМАПО, 2006. – 70с. /Belyayeva L.M. Bolezni sustavov u detey i podrostkov: uchebno-metodicheskoye posobiye. – Mn.: BelMAPO, 2006. – 70s./
- Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А. Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження // Цитология и генетика. – 2004. – Т.38, №5. – С. 62–71. /Dvornik A.S., Pererva T.P., Kunakh V.A. Antimutagenез yak systema zakhystu organizmu vid ushkodzhuyuchykh faktoriv endogennoho ta ekzogennoho pokhodzhennya // Tsitologiya i genetika. – 2004. – T.38, № 5. – S. 62–71./
- Зерова-Любимова Т.Е., Горovenko Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації. – К., 2003. – 25с. /Zerova-Lyubimova T.Ye., Gorovenko N.G. Tsytogetnychni metody doslidzhennya khromosom lyudyny: metodychni rekomendatsii. – K., 2003. – 25s./
- Ильинских И.Н., Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н. Аутоиммунные состояния и проблема цитогенетической нестабильности организма. // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: сборник научных трудов. – Вып.1. – 2004. – С. 28–33. //I'nskikh I.N., I'nskikh Ye.N., I'nskikh N.N. Autoimmunnyye sostoyaniya i problema tsitogeneticheskoy nestabil'nosti organizma // Aktual'nyye problemy biologii, meditsyny i ekologii: sbornik nauchnykh trudov. – Vyp.1. – 2004. – S. 28–33./
- Клубова Г.Ф. Структура хворих на ревматоїдний артрит // Український ревматологічний журнал. – 2002 – Т.8, №2. – С. 57–58. /Klubova G.F. Struktura khvorykh na revmatoidnyy artryt // Ukrains'kyi revmatologichnyy zhurnal. – 2002 – T.8, №2. – S. 57–58./
- Коваленко В.Н., Каминский А.Г. Ревматология как одна из важнейших проблем медицины // Український ревматологічний журнал. – 2000. – №1. – С. 3–8. /Kovalenko V.N., Kaminskiy A.G. Revmatologiya kak odna iz vazhneyshikh problem meditsyny // Ukrains'kyi revmatologichnyy zhurnal. – 2000. – №.1 – S. 3–8./
- Костюрина Г.Н., Лебев И.С., Коломиец А.М. и др. Хронические артриты у детей и подростков. – Х.: Основа, 2002. – 172с. /Kostyurina G.N., Lebets I.S., Kolomiets A.M. i dr. Khronicheskiye artrity u detey i podrostkov. – Kh.: Osnova, 2002. – 172s./
- Макарова Т.П., Ильина М.С., Семенов В.В., Сенек С.А. Оценка нестабильности генома у больных ювенильным ревматоидным артритом // Практическая медицина. – 2013. – №1 (66). – С.132–135. /Makarova T.P., I'lina M.S., Semenov V.V., Senek S.A. Otsenka nestabil'nosti genoma u bol'nykh yuvenil'nykh revmatoidnym artritom // Prakticheskaya meditsina. – 2013. – №1 (66). – S. 132–135./
- Семенов В.В., Кошпаева Е.С., Погорельцев В.И. Нестабильность генома у человека при патологических состояниях не наследственного генеза // Естествознание и гуманизм. – 2007. – Т.4, №2. – С. 27–32. /Semenov V.V., Koshpayeva E.S., Pogorel'tsev V.I. Nestabil'nost' genoma u cheloveka pri patologicheskikh sostoyaniyakh ne nasledstvennogo geneza // Yestestvoznaniye i gumanizm. – 2007. – T.4, №2. – S. 27–32./
- Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Сохин А.А. Иммуноцитогенетика. – М.: Медицина, 1993. – 240с. /Frolov A.K., Artsimovich N.G., Sokhin A.A. Immunotsitogenetika. – M.: Meditsina, 1993. – 240s./
- Jarmalaite S., Dedonyte V., Mierauskiene J. et al. Cytogenetic effects of treatment with methotrexate and infliximab in rheumatoid arthritis patients // BIOLOGIJA. – 2008. – Vol.54. – P. 7–11.
- Jacox R.F. Chromosomes in rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 1982. – Vol.41 (6). – P. 644.

Представлено: Л.А.Страшок / Presented by: L.A.Strashok

Рецензент: А.В.Некрасова / Reviewer: A.V.Nekrasova

Подано до редакції / Received: 01.11.2013