

© Багацкая Н. В., Медзяновская Е. В.

УДК: 575.116.4:616.72-002-053.2/.5

Багацкая Н. В., Медзяновская Е. В.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ IN VITRO БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ТЕЧЕНИЯ ЮВЕНИЛЬНОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Государственное учреждение «Институт охраны здоровья детей
и подростков НАМН» (г. Харьков)

n_bagatskaya@mail.ru

Данная работа является фрагментом НИР ГУ «ИОЗДП НАМН» «Вивчити клінічний поліморфізм ювенільного ревматоїдного артриту та розробити критерії ранньої діагностики і прогноз перебігу захворювання», № державної реєстрації 0114U001020, шифр НАМН 77/14, 2014-2016 рр.

Вступление. Известно, что одним из основных условий нормального функционирования любого живого организма является поддержание стабильности генетического материала. На уровень хромосомных aberrаций (ХА) могут оказывать влияние различные экзогенные и эндогенные факторы, в том числе и обусловленные нарушениями со стороны иммунной системы [6,9,11,14]. Общей чертой этих заболеваний является нарушение клеточных систем, репарирующих повреждения в ДНК вследствие различной степени иммунологических дефектов [7].

Одним из методов, позволяющих оценить функциональное состояние организма, является цитогенетический, использование которого позволяет определить ассоциативную способность акроцентрических хромосом (АХ) в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) и выделить лимфоциты без ассоциаций акроцентрических хромосом (ААХ) и с двумя ААХ. Это обусловлено тем, что лимфоциты человека – иммунные клетки, которые специфически реагируют на любые антигены, а по частоте возникновения ААХ можно судить о пролиферативной активности и миграции ЛПК в ответ на антигенный стимул [12]. Согласно проведенным исследованиям, было установлено, что делящиеся лимфоциты составляют активный пул клеток организма, в котором преобладают клетки без ассоциаций АХ и с двумя ассоциирующими АХ, причем ассоциации в таких клетках разрушаются в процессе движения хромосом при митозе. Лимфоциты с большим количеством хромосом, вступающих в ассоциацию

(КЛ+10), в норме встречаются крайне редко, они являются интактными и длительно рециркулирующими. По соотношению активно делящихся и интактных лимфоцитов можно судить о пролиферативной активности и миграции лимфоцитов в ответ на антигенный стимул, а значит и о функциональном состоянии иммунной системы человека [10,14].

Таким образом, определение иммунореактивности организма на основании способности акроцентрических хромосом вступать в ассоциации имеет большое значение для лечения больных с различными аутоиммунными заболеваниями. Особого внимания заслуживает также исследование цитогенетических особенностей (определение уровня ХА) при многих заболеваниях суставов [2,13,15], в том числе и при ювенильном ревматоидном артрите (ЮРА), который является аутоиммунным заболеванием; возникает до 16 лет и протекает с вовлечением в процесс всех систем организма. Наиболее значимое воздействие на тяжесть течения заболевания оказывает количество и степень поражения суставов, а также внутренних органов [5,16].

В связи с тем, что в наших предыдущих работах было получено повышение ассоциативной способности АХ в общей группе больных ЮРА и, соответственно, снижение уровня КЛ0+2 [3], а также повышение частоты хромосомных нарушений в сравнении со здоровыми сверстниками [2,4], это явилось основанием для изучения ассоциативной способности АХ и уровня хромосомных aberrаций в ЛПК больных ЮРА с учетом варианта течения заболевания.

Цель исследования – изучить ассоциативную способность АХ для определения иммунологической реактивности организма и оценить уровень хромосомных aberrаций в ЛПК in vitro у больных с различными вариантами течения ЮРА.

Объект и методы исследования. Цитогенетический анализ проведен у 80 детей и подростков,

больных ЮРА (25 мальчиков и 55 девочек). Возраст пациентов колебался от 3 до 17 лет, средний возраст – $10,9 \pm 3,4$ лет. Все больные проходили обследование и лечение в клинике ГУ «ИОЗДПНАМН». Диагноз ЮРА был установлен сотрудниками института на основании клинико-лабораторных и рентгенологических обследований согласно критериям Международной классификации болезней X Пересмотра [17]. Среди обследованных больных у 10 (12,5%) пациентов был диагностирован системный ЮРА, у 44 (55,0%) – олигоарткулярный вариант, у 26 (32,5%) – полиарткулярный вариант ЮРА.

Материалом для определения спонтанного уровня ХА и ассоциативной способности АХ служили препараты, полученные из культуры ЛПК *in vitro*. Культивирование ЛПК выполнялось по стандартному методу [8]. Для исследования использовалась венозная кровь пробандов в количестве 1,0 мл. Постановка культуры ЛПК проводилась параллельно в двух пробах. Цельную кровь (0,5 мл) культивировали в 5 мл питательной среды RPMI 1649 фирмы «Sigma», добавляли 0,5 мл эмбриональной сыворотки, 0,1 мл фитогемагглютинаина фирмы «Sigma». Лимфоциты культивировали в термостате при 37°C в течение 72 часов. За 2 часа до окончания культивирования проводили остановку митозов внесением колхицина (в конечной концентрации 0,1 мкг/мл), затем в культуральную смесь добавляли гипотонический раствор хлорида калия (0,075 М) до 10 мл, центрифугировали в течение 10 минут. Фиксировали клетки смесью этанола и ледяной уксусной кислоты (соотношение 3:1) в течение 40 минут, центрифугировали, затем проводили смену фиксирующей смеси и двукратное центрифугирование. Готовые препараты наносили на мокрые охлажденные стекла, высушивали и окрашивали красителем Гимза.

Полученные препараты метафазных хромосом шифровали и анализировали «слепым методом» на бинокулярном микроскопе LeicaCME (Австрия), окуляр 10x18, объектив 100x, бинокулярная насадка 1,25x. Учитывали все структурные aberrации хроматидного и хромосомного типов. Для оценки ассоциативной способности АХ определяли их количество и групповую принадлежность.

Статистические расчеты выполнены на РС с использованием прикладного пакета программ Excel. Для выявления значимости различий между выборками использовали критерий Стьюдента, для определения связи между признаками рассчитали коэффициент корреляции r по Спирмену [1].

Результаты исследований и их обсуждение.

Согласно данным цитогенетического анализа, установлено статистически значимое снижение частоты клеток без ассоциаций АХ у больных с системным ЮРА (30,94 на 100 клеток) в сравнении с олигоарткулярным (40,00 на 100 клеток; $p < 0,001$) и полиарткулярным вариантами заболевания (39,59 на 100 клеток; $p < 0,001$). У больных с олигоарту-

лярным вариантом ЮРА значимо реже встречались клетки с четырьмя ассоциирующими АХ (12,54 на 100 клеток), чем при полиарткулярном (14,42 на 100 клеток; $p < 0,01$) и при системном ЮРА (18,28 на 100 клеток; $p < 0,001$).

В метафазных пластинках из всех ассоциирующих АХ нами отбирались только с двумя ассоциирующими АХ и определялся уровень КЛ0+2. Следует отметить, что уровень КЛ0+2 у больных с системным ЮРА был достоверно ниже (31,20 на 100 клеток), чем при олигоарткулярном (35,59 на 100 клеток; $p < 0,05$) и полиарткулярном вариантах заболевания (34,90 на 100 клеток; $p < 0,05$) (рис. 1).

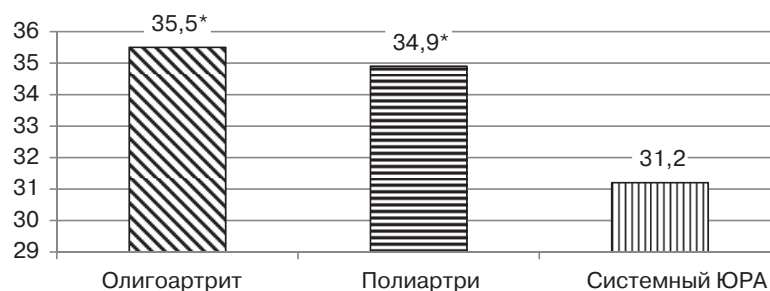


Рис. 1. Уровень КЛ0+2 при различных вариантах течения ЮРА

Примечание: достоверность различий: * – $p < 0,05$

Таким образом, у больных с тяжелым течением ЮРА (системным) выявлено снижение уровня КЛ0+2, что указывает на снижение пролиферативной активности лимфоцитов, а, следовательно, и снижение их иммунологической активности. То есть, на основании оценки ассоциативной способности АХ, установлено снижение пролиферативной активности ЛПК у больных с системным ЮРА в сравнении с олиго- и полиарткулярными вариантами заболевания, что свидетельствует о снижении иммунореактивности их организма.

При определении уровня и типов хромосомных aberrаций с учетом варианта течения ЮРА установлено, что у больных с олигоартритом частота ХА колебалась от 0,5 до 8,0 на 100 метафазных пластинок и в среднем по группе составляла $4,34 \pm 0,21$ на 100 клеток, частота aberrантных клеток составила $4,27 \pm 0,21$ на 100 клеток. У детей с полиарткулярным вариантом ЮРА индивидуальный уровень ХА колебался от 1,0 до 12,0 на 100 проанализированных клеток, общий уровень ХА ($4,50 \pm 0,28$ на 100 клеток) и частота aberrантных метафаз ($4,32 \pm 0,27$ на 100 клеток) значимо не отличались у больных с олигоартритом ($p > 0,05$). У больных с системным ЮРА частота ХА колебалась в пределах от 1,0 до 12,0 на 100 метафаз. Средний уровень ХА в ЛПК был значимо выше ($5,46 \pm 0,41$ на 100 клеток), чем у больных с олигоарткулярным вариантом ЮРА ($p < 0,05$) и не отличался от уровня у больных с полиартритом ($p > 0,05$). Aberrантные клетки встречались с частотой $5,37 \pm 0,41$ на 100 клеток, достоверно превышая частоту aberrантных клеток у больных с олигоартулярным вариантом ЮРА ($p < 0,05$) (табл.).

Частота хромосомных aberrаций при различных вариантах течения ЮРА, $\bar{x} \pm s$

Типы aberrаций	Частота хромосомных aberrаций на 100 клеток		
	больные с олигоартритом	больные с полиартритом	больные с системным ЮРА
	n = 44	n = 26	n = 10
Хроматидный тип:	3,08 ± 0,18*	2,43 ± 0,21	3,40 ± 0,46*
одиночные ацентрические фрагменты	3,08 ± 0,18*	2,43 ± 0,21	3,40 ± 0,46*
Хромосомный тип:	1,26 ± 0,11	2,07 ± 0,19**	2,06 ± 0,36*
парные ацентрические фрагменты	0,89 ± 0,09	1,33 ± 0,15*	1,73 ± 0,33*
преждевременное расхождение центромер	0,34 ± 0,06	0,71 ± 0,11*	0,26 ± 0,13
дицентрические хромосомы	0,01 ± 0,01	0,0	0,0
центрические кольца	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,0
аномальные моноцентрики	0,0	0,0	0,06 ± 0,06
Всего	4,34 ± 0,21	4,50 ± 0,28	5,46 ± 0,41*

Примечания: n – число пробандов; достоверность различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

Во всех подгруппах регистрировались aberrации хромосомного и хроматидного типа. Среди aberrаций хроматидного типа встречались одиночные ацентрические фрагменты, которые достоверно чаще определялись у детей с системным (p < 0,05) и олигоарткулярным вариантами заболевания (p < 0,05). Aberrации хромосомного типа были представлены парными ацентрическими фрагментами и преждевременным расхождением центромер, центрическими кольцами, дицентрическими хромосомами, аномальным моноцентриком.

Aberrации хромосомного типа встречались достоверно чаще у больных с полиарткулярным (p > 0,001) и системным (p > 0,05) вариантами ЮРА в сравнении с частотой данных нарушений у больных с олигоартритом.

Исходя из полученных данных, можно высказать предположение, что при наиболее тяжелом варианте течения ЮРА (системном) увеличивается спонтанный уровень ХА. Общий уровень ХА у больных с олиго- и полиарткулярным вариантами течения ЮРА не различался, однако при полиарткулярном варианте заболевания у больных в ЛПК преобладали aberrации хромосомного типа, а при олигоарткулярном – хроматидного.

В результате проведенного цитогенетического анализа получено снижение уровня КЛ0+2 и повышение частоты ХА при различных вариантах течения ЮРА. Это явилось основанием для проведения корреляционного анализа с целью выяснения связи между

исследуемыми признаками. Коэффициент корреляции составил r = -0,99, что свидетельствует о существовании обратной корреляционной связи между признаками, теснота связи функциональная, то есть повышенный уровень ХА тесно коррелирует со сниженным уровнем КЛ0+2. у больных с различными вариантами течения ЮРА (рис. 2).

Выводы

Проведение цитогенетического исследования позволило установить повышение частоты ХА и снижение уровня КЛ0+2 у больных с системным вариантом течения ЮРА в сравнении с частотой данных показателей у больных с олигоартритом. На основании корреляционного анализа установлено существование тесной обратной связи между исследуемыми признаками.

Перспективы дальнейших исследований заключаются в определении цитогенетических особенностей у больных с другими ревматическими заболеваниями.

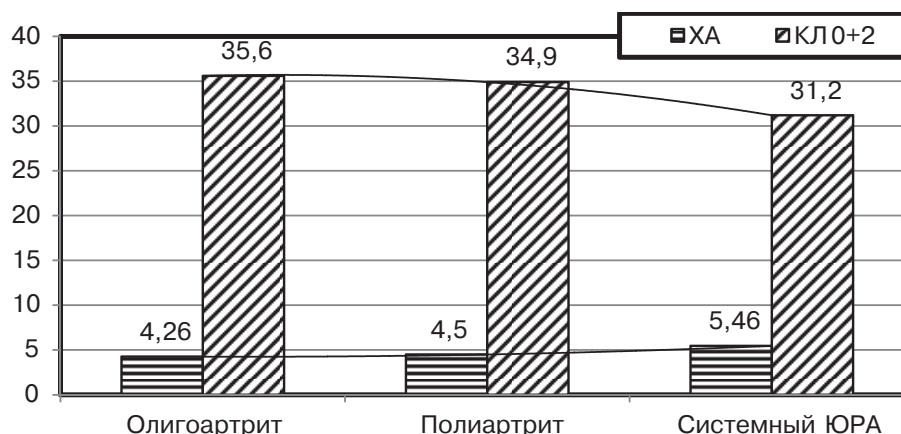


Рис. 2. Сравнение уровня КЛ0+2 и частоты ХА при различных вариантах течения ЮРА

Литература

1. Атраментова Л. А. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. уч. зав / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
2. Багацька Н. В. Цитогенетична характеристика пробандів із захворюваннями суглобів / Н. В. Багацька, В. Є. Нефідова // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики: зб. наук. пр. – 2009. – Вип. 16. – Київ-Луганськ. – С. 275-280.
3. Багацкая Н. В. Определение иммунореактивности организма детей и подростков, больных ювенильным ревматоидным артритом / Н. В. Багацкая, Е. В. Медзяновская // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.5 – № 4(116). – С. 88-91.
4. Багацкая Н. В. Индивидуальная гиперчувствительность лимфоцитов периферической крови детей и подростков, больных ювенильным ревматоидным артритом, к тестирующему действию митомицина С in vitro / Н. В. Багацкая, Е. В. Медзяновская, В. Е. Нефидова // Massachusetts Review of Science and Technologies. – 2015. – № 2 (16). – P. 592-598.
5. Беляева Л. М. Болезни суставов у детей и подростков: учебно-методическое пособие / Л. М. Беляева. – Мн.: БелМАПО, 2006. – 70 с.
6. Гайнетдинова Д. Д. Феномен нестабильности клеточного генома в патогенезе детского церебрального паралича / Д. Д. Гайнетдинова, Л. З. Гайсина // Журнал неврологии и психиатрии. – 2012. № 10. – С. 49-51.
7. Дворник А. С. Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження / А. С. Дворник, Т. П. Перерва, В. А. Кунах // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 5. – С. 62-71.
8. Зерова-Любимова Т. Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: метод. рек. / КМАПО ім. П. Л. Шупика; уклад.: Т. Е. Зерова-Любимова, Н. Г. Горovenko. – К., 2003. – 25 с.
9. Ильинских Н. Н. Мутагенез при различных функциональных состояниях организма / Н. Н. Ильинских [и др.]: Томск: Изд-во Сиб. гос. мед. ун-та, 1990. – 228 с.
10. Копійка В. В. Характеристика активованих лімфоцитів у експерименті та клініці: автореф. дисс. ...канд. біол. наук: спец. 03.00.09 «Імунологія» / В. В. Копійка. – К., 2004. – 20 с.
11. Латипова Н. С. Хромосомные aberrации в лимфоцитах больных системной красной волчанкой в динамике цитостатической терапии / Н. С. Латипова, А. Л. Аляви // Терапевтический архив. – 2002. – № 5. – С. 35-38.
12. Попов М. М. Характеристика активованих лімфоцитів у експерименті та клініці: автореф. дис... канд. біол. наук: спец. 03.00.09 «Імунологія» / М. М. Попов Х., 2005. 20 с.
13. Семенов В. В. Нестабильность генома у человека при патологических состояниях не наследственного генеза / В. В. Семенов, Е. С. Кошпаева, В. И. Погорельцев // Естествознание и гуманизм. – 2007. – Т. 4, № 2. – С. 27-32.
14. Фролов А. К. Иммуноцитогенетика / А. К. Фролов, Н. Г. Арцимович, А. А. Сохин. – М.: Медицина, 1993. – 240 с.
15. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes in patients with newly diagnosed celiac and Crohn's disease / I. Hojsak [et al.] // European Journal of Gastroenterology & Hepatology. – 2013. Vol. 25 (1). – P. 22-27.
16. Hahn Y. -S. Pathogenesis and clinical manifestations of juvenile rheumatoid arthritis / Y. -S. Hahn, J. -G. Kim // Korean J. Pediatr. – 2010. Vol. 53 (11) – P. 921-930.
17. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology European League Against Rheumatism Collaborative initiative / D. Aletaha [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2010. – Vol. 69, № 4. – P. 1580-1588.

УДК:575.116.4:616.72-002-053.2/.5

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ IN VITRO У ХВОРИХ ІЗ РІЗНИМ ПЕРЕБІГОМ ЮВЕНІЛЬНОГО РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ

Багацька Н. В., Медзяновська О. В.

Резюме. Проведено цитогенетичне обстеження хворих із різними варіантами ювенільного ревматоїдного артрити (ЮРА). На підставі визначення асоціативної здатності акроцентричних хромосом виявлено зниження рівня КЛ0+2 у хворих із системним ЮРА порівняно з частотою цієї ознаки у хворих із оліго- і поліартикулярним варіантами хвороби. Виявлено вірогідне підвищення рівня хромосомних аберацій (ХА) у хворих із системним ЮРА порівняно з частотою ХА у хворих з олігоартритами.

Ключові слова: ювенільний ревматоїдний артрит, асоціації, акроцентричні хромосоми, аберації.

УДК: 575.116.4:616.72-002-053.2/.5

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ IN VITRO БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ТЕЧЕНИЯ ЮВЕНИЛЬНОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Багацкая Н. В., Медзяновская Е. В.

Резюме. Проведено цитогенетическое обследование больных с разными вариантами ювенильного ревматоидного артрита (ЮРА). На основании определения ассоциативной способности акроцентрических хромосом выявлено снижение уровня КЛ0+2 у больных с системным ЮРА в сравнении с частотой этого показателя у больных с олиго- и полиартикулярными вариантами болезни. Выявлено достоверное повышение уровня хромосомных aberrаций (ХА) у больных с системным ЮРА в сравнении с частотой ХА у больных с олигоартритами.

Ключевые слова: ювенильный ревматоидный артрит, ассоциации, акроцентрические хромосомы, aberrации.

UDC:575.116.4:616.72-002-053.2/.5

CYTOGENETIC FEATURES IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN VITRO OF PATIENTS WITH DIFFERENT COURSE OF JUVENILE RHEUMATOID ARTHRITIS

Bagatska N. V., Medzianovska E. V.

Abstract. One of the basic conditions for the normal functioning of any of the living beings is to maintain the stability of the genetic material. A variety of exogenous and endogenous factors, including the immune system disorders, can have an effect on the level of chromosomal aberrations (CA). Common features of autoimmune diseases

are disorders in cellular systems, which repair the DNA damages, caused by immunological defects of different degrees. The phenomenon is brought about by the fact that human lymphocytes are immune cells, which react specifically to any antigens, and by the frequency of occurrence of acrocentric chromosomes associations (ACA) we can judge about the proliferative activity and migration of peripheral blood lymphocytes (PBL) in response to an antigenic stimulus. It has been found that dividing lymphocytes comprise an actual pool of cells in the organism, where prevail both the cells without AC associations and with two associating AC. Lymphocytes with a lot of chromosomes, joining into an association (LN + 10), occur normal extremely rarely, they are intact and long – recirculating. On the proliferative activity and migration of lymphocytes in response to an antigenic stimulus one can judge by the ratio of actively dividing and intact lymphocytes that is about the functional state of the human immune system. Therefore, the determination of the organism immunoreactivity on the basis of the ability of acrocentric chromosomes join associations is of great importance for the treatment of patients with various autoimmune diseases. Special attention deserves also determination of the level of chromosomal aberrations (CA) in juvenile rheumatoid arthritis (JRA), which is an autoimmune disease. It occurs before the age of 16, and proceeds with the involvement in the process of all systems in human organism.

Aim of the study: to study the acrocentric chromosomes associative ability (ACAA) for determination of the organism immunological reactivity and to assess the level of chromosomal aberrations in PBL in vitro in patients with different variants of JRA course.

Materials and methods. Cytogenetic analysis was performed in 80 children and adolescents with JRA aged 3 to 17 years. All patients were examined in the in-patient clinic of the State Institution "IOZDP NAMS". JRA has been diagnosed on the basis of clinical, laboratory and radiological examinations according to the ICD, Tenth Revision. Systemic JRA has been found in 12.5% of the examined patients, oligoarticular variant has been registered in 55%, and polyarticular – in 32.5% of our patients. To determine the spontaneous level of CA and the ACAA, we used preparations, derived from PBL culture in vitro. Cultivation of PBL was performed by the standard method.

Statistical calculations were carried out on a PC using the Excel application software package. Student's t – test and r correlation coefficient were used to identify the significance of differences between samples.

Results. A statistically significant decrease in the frequency of cells without ACA has been established in patients with systemic JRA (30.94 per 100 cells), as compared with oligoarticular (40.00 per 100 cells, $p < 0.001$) and polyarticular (39.59 per 100 cells, $p < 0.001$) variants of the disease. Cells with four ACA (12.54 per 100 cells) occurred significantly less frequent in patients with an oligoarticular JRA than in polyarticular (14.42 per 100 cells, $p < 0.01$) and in systemic (18.28 per 100 cells; $p < 0.001$) JRA variants. Among metaphase plates from all associating acrocentric chromosomes (AAC) only the plates with two AAC have been selected from all associating acrocentric chromosomes, and the level of LN0 +2 has also been determined. It has been found that the LN0 +2 level in patients with systemic JRA is significantly lower (31.20 per 100 cells) than in oligoarticular (35.59 per 100 cells, $p < 0.05$) and polyarticular (34.90 per 100 cells, $p < 0.05$) variants of the disease. Therefore, a reduced LN0 + 2 level has been revealed in patients with systemic JRA, indicating a decrease in the proliferative activity of lymphocytes, and correspondingly, in their immunological activity.

When determining the level and type of chromosome aberrations, considering the variant of JRA course, the authors have established that in children with a polyarticular JRA variant the total level of chromosomal aberrations (4.50 per 100 cells) does not differ significantly from its frequency in patients with oligoarthritis (4.34 per 100 cells, $p > 0,05$). In patients with systemic JRA the chromosomal aberrations average level in PBL is significantly higher (5.46 per 100 cells) than in patients with an oligoarticular variant (4.34 per 100 cells, $p < 0.05$) and does not differ from its level in patients with polyarthritis ($p > 0.05$). Single acentric fragments occur among the chromatid type of aberrations, they are significantly more frequent in children with systemic ($p < 0.05$) and oligoarticular variants of the disease ($p < 0.05$). Aberrations of the chromosome type are represented by pair acentric fragments and premature centromere divergence, centric rings, dicentric chromosomes, and abnormal monocentric. Aberrations of the chromosome type occur significantly more frequent in patients with polyarticular ($p > 0.001$) and systemic ($p > 0.05$) variants of JRA, in comparison with the frequency of these disorders in patients with oligoarthritis.

Conclusion. A decrease in the LN0+2 level and an increase in chromosomal aberrations level depend on the variant of JRA course. The correlation coefficient ($r = -0.99$) has been calculated on the basis of the results obtained.

Keywords: juvenile rheumatoid arthritis, association, acrocentric chromosomes, aberrations.

*Рецензент – проф. Похилько В. І.
Стаття надійшла 05.11.2015 року*