

© ^{1,2}Багацкая Н. В., ¹Проскурина Т. Ю., ¹Михайлова Э. А., ¹Рябокоть Н. А., ¹Волосова В. И.

УДК: 575.116.4:616.89-008.44-053.2/.5

^{1,2}Багацкая Н. В., ¹Проскурина Т. Ю., ¹Михайлова Э. А.,

¹Рябокоть Н. А., ¹Волосова В. И.

ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ТРЕВОЖНО-ФОБИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ

¹ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины» (г. Харьков)

²Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина (г. Харьков)

nv_bagatska@ukr.net

Представленная работа является фрагментом НИР «Изучить возрастные особенности механизмов формирования тревожно-фобических расстройств у детей» (2016-2018 гг.), № государственной регистрации 01164003036, шифр НАМН 89/16.

Вступление. Тревожные расстройства представляют собой обширную и гетерогенную группу психопатологических состояний [5]. В эту группу обычно включают паническое расстройство, агорафию, социальную фобию, специфическую фобию, генерализованное тревожное расстройство, а также тревожно-депрессивное расстройство [16,18]. Тревожные расстройства широко распространены среди населения развитых стран и наносят значительный экономический ущерб обществу. В настоящее время эти состояния являются наиболее частой категорией психических расстройств, встречаясь в 3,7-5,1% случаев; они отличаются значительным полиморфизмом клинических проявлений, динамичностью и нередко вызывают серьезные затруднения при терапии [15,17]. Полифакторность этиологии и патогенеза тревожно-фобических расстройств (ТФР), характеризующаяся многоуровневостью вовлечения психической сферы в патологический процесс, объясняет необходимость мультидисциплинарного диагностического подхода. Дифференцированная оценка указанной группы расстройств имеет немаловажное значение для психиатров, поскольку в контексте традиционных для клинической практики диагностических детерминант различия между отдельными вариантами тревожных расстройств до последнего времени не представлялись существенными [7]. Вместе с тем, клинический и социальный прогноз, выбор методов терапии и социальной реабилитации больных с ТФР зависят от интегративной оценки целого ряда факторов, включающих наследственные и средовые [12]. В частности, нуждаются в углубленных исследованиях психопатологические особенности

невротической тревоги, ее клиническая типология, взаимосвязь со стрессом и депрессией, клиническая динамика на разных стадиях невротического процесса, аффинитет к другим невротическим симптомам [8,10,11]. В контексте психопрофилактики особенно важным является выявление семейной концентрации психопатологических симптомов тревоги и определения роли генетических и средовых факторов в формировании ТФР в детском и подростковом возрасте. Исследования, посвященные изучению генетических особенностей ТФР, практически отсутствуют, есть немногочисленные работы, посвященные генетическим особенностям депрессивных расстройств у детей и подростков [2]. Вышеизложенное и подтверждает актуальность исследований, посвященных проблеме тревожно-фобических расстройств в детском и подростковом возрасте, ее высокую практическую и теоретическую значимость.

Цель работы – определение уровня хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) детей и подростков обоего пола с ТФР.

Объект и методы исследования. Цитогенетический анализ проведен у 27 детей с ТФР и 50 здоровых детей и подростков обоего пола 9-15 лет. Диагноз установлен в отделении психиатрии института на основании комплексного клинко-психопатологического обследования пациентов. Все пробанды были осмотрены специалистами института: невропатологом, психологом, педиатром, генетиком, отоларингологом, окулистом и др. У родителей обследованных пробандов, а также у детей, достигших 14-летнего возраста, были получены информированные согласия на проведение исследований в соответствии с принципами Хельсинкской декларации прав человека, Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицины и соответствующими Законами Украины.

Сравнение частоты ХА в лимфоцитах крови у больных с ТФР (n=27) и здоровых сверстников (n=50), $\bar{X} \pm s_x$

| Хромосомные aberrации | Частота хромосомных aberrаций на 100 клеток | | Достоверность различий, р |
|-----------------------------------|---|------------------------------------|---------------------------|
| | больные с ТФР | здоровые дети | |
| | число метафазных пластинок, N=2723 | число метафазных пластинок, N=5176 | |
| Aberrации хроматидного типа: | 5,52 ± 0,35 | 0,69 ± 0,12 | < 0,001 |
| одиночные ацентрические фрагменты | 5,38 ± 0,35 | 0,69 ± 0,12 | < 0,001 |
| обмены | 0,09 ± 0,06 | 0,0 | < 0,05 |
| Aberrации хромосомного типа: | 1,54 ± 0,19 | 0,81 ± 0,12 | < 0,01 |
| парные ацентрические фрагменты | 1,47 ± 0,19 | 0,81 ± 0,12 | < 0,01 |
| дицентрики | 0,07 ± 0,04 | 0,0 | > 0,05 |
| Общая частота ХА | 7,00 ± 0,39 | 1,51 ± 0,17 | < 0,001 |

Материалом для выявления спонтанного уровня хромосомных aberrаций служили препараты хромосом, полученные из культуры ЛПК in vitro. Культивирование ЛПК выполнялось по стандартному методу [3,13]. Использовали венозную кровь пробандов в количестве 0,5 мл, которую добавляли в 5 мл питательной среды RPMI 1640 фирмы «Sigma, USA», 0,5 мл эмбриональной сыворотки, 0,1 мл фитогемагглютинаина (ФГА) фирмы «Sigma, USA». 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). Фиксацию клеток проводили смесью этанола и ледяной уксусной кислоты (соотношение 3:1) в течение 40 минут; затем – трехкратную отмывку препаратов в фиксирующей смеси с параллельным центрифугированием по 10 минут. Смесь наносили на обезжиренные, мокрые, охлажденные стекла и высушивали. От каждого обследованного пробанда из лимфоцитарных осадков готовили препараты, которые окрашивали красителем Гимза в течение 10-12 минут для проведения классического цитогенетического анализа на равномерно окрашенных хромосомах. Препараты метафазных хромосом шифровали и анализировали «слепым методом» на бинокулярном микроскопе Leica CME (Австрия), окуляр 10x18, объектив 100x, бинокулярная насадка 1,25x. У больных детей анализировали от 100 до 250 метафазных пластинок, всего 4223 метафазных пластинок; у здоровых сверстников – 5179 метафазных пластинок, которые содержали 46 ± 2 хромосомы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием табличных процессоров Excel и SPSS Statistics 17,0 по методу Стьюдента и χ^2 [6]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение.

Цитогенетический анализ, проведенный в группах больных с ТФР и здоровых сверстников, установил нормальный женский (46,XX) и мужской (46,XY)

кариотипы. Частота спонтанного уровня ХА в ЛПК больных в 4,6 раз превышала частоту ХА у здоровых сверстников (табл.). Следует отметить, что у больных детей и подростков спонтанная частота aberrаций хроматидного и хромосомного типа также достоверно превышала спонтанную частоту этих нарушений у здоровых детей и подростков. Среди aberrаций хроматидного типа преобладали одиночные ацентрические фрагменты и обмены; среди aberrаций хромосомного типа – парные ацентрические фрагменты. У трех больных регистрировались дицентрические хромосомы, у четырех – обмены при полном отсутствии данных структурных нарушений хромосом у здоровых сверстников.

Причины образования парных фрагментов, ацентрических и центрических колец, асимметричных и симметричных межхромосомных обменов могут возникать в том случае, когда повреждения хромосомы регистрируются в пресинтетической стадии (G_1 – фазе) и хромосома реагирует как единичная структура. Формирование же хроматидных разрывов и обменов происходит при повреждении хромосомы на стадии двух ниток (фаза S и G_2) [9]. Кроме того, разрывы отличаются от обменных конфигураций по их физическому виду в метафазе и являются настоящими повреждениями непрерывности хромосомы с четким сдвигом фрагментов, включая также фрагменты, хромосомное происхождение которых иногда невозможно установить [4,12,14].

Исследование гендерных различий в частоте ХА в ЛПК установило отсутствие достоверных различий у лиц мужского и женского пола как с ТФР, так и у здоровых сверстников. Вместе с тем, сравнение частоты ХА в ЛПК больных мальчиков и девочек со здоровыми сверстниками свидетельствовало о достоверном повышении общего уровня ХА (рис.).

Так, у мальчиков с ТФР выявлено увеличение частоты aberrаций хромосомного типа (1,72 против 0,55 на 100 клеток у здоровых мальчиков, $p < 0,001$ за счет парных ацентрических фрагментов) в сравнении со здоровыми мальчиками; а у девочек с ТФР – хроматидного типа (3,22 против 0,94

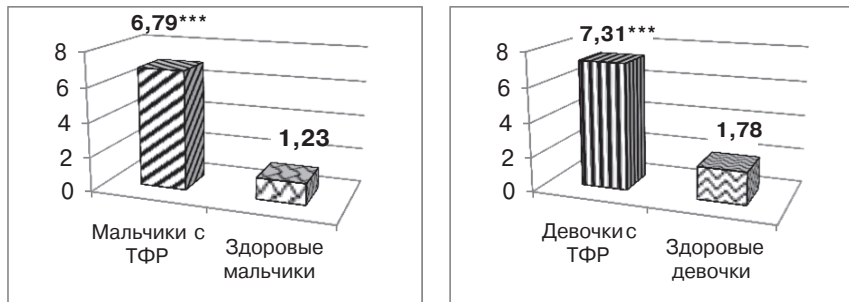


Рис. Сравнение общей частоты ХА у больных и здоровых пробандов обоего пола (на 100 клеток).

Примечание. Достоверность различий: *** – $p < 0,001$.

на 100 клеток у здоровых девочек, $p < 0,001$ за счет одиночных ацентрических фрагментов) в сравнении со здоровыми девочками. Наряду с повышением спонтанного уровня ХА у больных обоего пола с ТФР установлена выраженная индивидуальная вариативность частоты и типов ХА, которая колебалась у больных с 2,0 до 18,0 на 100 метафазных пластинок. Согласно мнению С. В. Тощакова с соавторами [1], поиск отдельных генов предрасположенности не привел к формированию обоснованной гипотезы наследования психических заболеваний, что позволило предположить, что в патогенезе эндогенных психических заболеваний играют роль не столько точечные мутации, сколько нарушения функционирования всего генома, приводящие к глобальной

дестабилизации генома являются изменения в работе системы поддержания стабильности генома – группы РНК-редактирующих белков AID/APOBEC.

Выводы

На основании проведенного цитогенетического анализа установлен спонтанный уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови больных обоего пола с ТФР, который достоверно превышал частоту ХА в ЛПК здоровых детей. Определены гендерные различия в частоте ХА у больных с ТФР в сравнении со здоровыми мальчиками и девочками.

Перспективы дальнейших исследований

Планируется изучить цитогенетические эффекты мутагенеза в ЛПК больных, что расширит представления о роли генетических факторов при ТФР.

Литература

1. Генетика психических заболеваний: роль ретротранспозиции и РНК-редактирующих белков AID/APOBEC (обзор литературы) / С.В. Тощаков, И.Н. Доминова, Е.А. Бражкина [и др.] // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2013. – № 5 (80). – С. 13-17.
2. Депрессия у подростков (клинико-возрастной, нейрокогнитивный, генетический аспекты) / Э.А. Михайлова [и др.] // Український вісник психоневрології. – 2015. – Т. 23, Вип. 2 (83). – С. 75-78.
3. Зерова-Любимова Т.Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації / Т.Е. Зерова-Любимова, Н.Г. Горovenko. – К., 2003. – 25 с.
4. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О.А. Ковалева // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 58-72.
5. Краснов В.Н. Тревожные расстройства: их место в современной систематике и подходы к терапии / В.Н. Краснов // Социальная и клиническая психиатрия. – 2008. – Т. 18, № 3. – С. 33-39.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Попов Ю.В. Ранняя диагностика тревожно-фобических расстройств у подростков в общей медицинской практике: метод. рекомендации / Ю.В. Попов, А.А. Пичиков. – СПб НИПНИ им. В.М. Бехтерева, 2012. – 23 с.
8. Тревога и страхи у детей и подростков / Л.С. Чутко, С.Ю. Сурушкина, Т.И. Анисимова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2016. – № 1. – С. 99-104.
9. Радиационная цитогенетика. Русско-английский словарь-справочник / Э.А. Демина, М.А. Пилинская, Ю.И. Петунин, Д.А. Ключин; под ред. Н.А. Дружины. – К.: Здоров'я, 2009. – 368 с.
10. Glas G. Philosophical aspects of neurobiological research on anxiety and anxiety disorders / G. Glas // Curr. Opin. Psychiatr. – 2004. – Vol. 17. – P. 457-464.
11. Implications of hostile environment and social instability in adolescent mice / A.G. Galyamina, D.A. Smagin, T.V. Michurina [et al.] // The 9th International conference on bioinformatics and genome regulation and structure / System biology. – Novosibirsk, 2014. – P. 20.
12. Interrelationships between depression, anxiety and cognitive deficit in primary care patients / A.E. Bobrov, V.N. Krasnov, T.V. Dovzhenko, D.M. Tsarenko // Nordic Congress of Psychiatry Abstract Book, 2012. – P. 23.
13. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. – 2013. – 140 p.
14. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility / T.C. Hsu, M.K. Spitz, S.P. Schantz // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention. – 2002. – Vol. 1. – P. 83-89.
15. Prevalence, correlates, comorbidity, and comparative disability of DSM-IV generalized anxiety disorder in the USA: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions / B.F. Grant, D.S. Hasin, A. Stinson [et al.] // Psychol. Med. – 2005. – Vol. 35. – P. 1747-1759.
16. The epidemiology of panic attacks, panic disorders, and agoraphobia in the National Comorbidity Survey Replication / R.C. Kessler, W.T. Chiu, R. Jin [et al.] // Arch. Gen. Psychiatry. – 2006. – Vol. 63. – P. 415-424.

17. The epidemiology of DSM-IV Panic disorder and agoraphobia in the United States: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions / B.F. Grant, D.S. Hasin, F.S. Stinson [et al.] // J. Clin. Psychiatry. – 2006. – Vol. 67, № 3. – P. 363-364.
18. Watson D. Rethinking the mood and anxiety disorders: a quantitative hierarchical model for DSM-V / D. Watson // J. Abnorm. Psychol. – 2005. – Vol. 114. – P. 522-536.

УДК 575.116.4:616.89-008.44-053.2/.5

ХРОМОСОМНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ У ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ТРИВОЖНО-ФОБІЧНИМИ РОЗЛАДАМИ

Багацька Н. В., Проскуріна Т. Ю., Михайлова Е. А., Рябоконе Н. О., Волосова В. І.

Резюме. У роботі надано результати цитогенетичного обстеження дітей та підлітків обох статей із тривожно-фобічними розладами. Встановлено вірогідне збільшення спонтанного рівня хромосомних аберацій (7,0 на 100 клітин) у лімфоцитах крові хворих у 4,6 рази порівняно з частотою цих порушень у здорових однолітків. Визначено збільшення частоти аберацій хромосомного типу у хворих хлопців, порівняно з частотою цих аберацій у здорових хлопців, та хроматидного типу у хворих дівчат порівняно зі здоровими дівчатами.

Ключові слова: хлопці, дівчата, тривожно-фобічний розлад, хромосоми, аберації.

УДК 575.116.4:616.89-008.44-053.2/.5

ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ТРЕВОЖНО-ФОБИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Багацкая Н. В., Проскурина Т. Ю., Михайлова Э. А., Рябоконе Н. А., Волосова В. И.

Резюме. В работе представлены результаты цитогенетического обследования детей и подростков обо-его пола с тревожно-фобическим расстройством. Установлено достоверное увеличение спонтанного уровня хромосомных aberrаций (7,0 на 100 клеток) в лимфоцитах крови больных в 4,6 раз в сравнении с частотой этих нарушений у здоровых сверстников. Выявлено увеличение частоты aberrаций хромосомного типа у больных мальчиков в сравнении с частотой этих aberrаций у здоровых мальчиков и хроматидного типа у больных девочек в сравнении со здоровыми девочками.

Ключевые слова: мальчики, девочки, тревожно-фобическое расстройство, хромосомы, aberrации.

UDC: 575.116.4:616.89-008.44-053.2/.5

CHROMOSOMAL INSTABILITY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ANXIETY-PHOBIC DISORDERS

Bagatska N. V., Proskurina T. Yu., Mykhailova E. A., Ryabokon N. A., Volosova V. I.

Abstract. The study was designed to determine the level of chromosomal aberrations in the peripheral blood lymphocytes (PBL) of children and adolescents of both sexes with phobic anxiety disorders (PAD). Cytogenetic analysis was performed in 27 children with PAD and 50 healthy children and adolescents of both sexes, aged 9-15 years. The diagnosis was made in the psychiatric department of the Institute on the basis of the complete clinical and laboratory examination of patients. Chromosome preparations, obtained from the PBL cultures *in vitro*, served genetic material for determining the spontaneous level of chromosomal aberrations. PBL cultivation was carried out according to the standard method. Statistical analysis of the research results was performed using Excel and SPSS Statistics 17.0 application programs.

Cytogenetic analysis in the groups of patients with PAD and in healthy age-matched individuals has established normal female (46, XX) and male (46, XY) karyotypes. The frequency of the chromosomal aberrations (CA) spontaneous level in the PBL of patients is 4.6 times higher than the CA frequency in healthy persons. In children and adolescents with the disease the spontaneous frequency of aberrations of chromatid and chromosome types is also significantly higher than the same in healthy children and adolescents. Single acentric fragments and exchanges prevail among the chromatid-type aberrations; pair acentric fragments prevail among the chromosome-type aberrations. Dicentric chromosomes have been registered in three of our patients, and exchanges have been observed in 4 individuals in the full absence of such chromosomal aberrations in healthy persons. The study of gender differences in the frequency of CA in the PBL has established the lack of reliable differences in males and females with PAD and in healthy persons of the same age. However, a comparison of the CA frequency in the PBL of our patients with the frequency in healthy age-mates testifies to a significant increase in the CA total level. An increase in the frequency of the chromosome-type aberrations has been revealed in boys with PAD (1.72 vs. 0.55 per 100 cells in healthy boys, $p < 0.001$ by pair acentric fragments), in comparison with healthy boys; and the chromatid-type aberrations have been observed in girls with PAD (3.22 vs. 0.94 per 100 cells in healthy girls, $p < 0.001$ by single acentric fragments), in comparison with healthy girls. A pronounced individual variability of CA frequency, which range in our patients from 2.0 to 18.0 per 100 meta-phase plates, has been found along with an increase in the CA spontaneous level in patients with PAD.

Spontaneous level of chromosomal aberrations, which exceed the CA frequency in the PBL of healthy children, has been established on the basis of the cytogenetic analysis in blood lymphocytes of patients with PAD of both sexes. Gender differences in the CA frequency have been found in patients with PAD as compared to healthy boys and girls.

Keywords: boys, girls, phobic anxiety disorders, chromosomes, aberrations.

*Рецензент – проф. Дубінін С. І.
Стаття надійшла 18.03.2016 року*