

DOI: 10.21802/gmj.2017.1.11

УДК 576.316+612.68+574.2

Козовий Р.В.

Частота та спектр хромосомних аберацій, асоціацій акроцентричних хромосом у довгожителів Прикарпаття хворих на артеріальну гіпертензію та остеоартроз

Кафедра медичної біології та медичної генетики (зав. кафедри – проф. Ковальчук Л. С.)

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Івано-Франківськ

Email: ruslan_kozoviy@ukr.net

Резюме. Проведений аналіз частоти та спектра хромосомних аберацій, асоціацій акроцентричних хромосом у 264 довгожителів Прикарпаття. Отримані результати порівнювали між особами хворими на артеріальну гіпертензію (АГ) і остеоартроз (ОА), хворими тільки на АГ, хворими тільки на ОА і здоровими. Встановлено, що середні показники частоти ХА у всіх обстежених були наступними: $(2,82 \pm 0,27)$ у довгожителів із АГ та ОА, а в здорових осіб – $(2,17 \pm 0,47)$. У довгожителів, хворих на АГ або на ОА, частота ХА були більшими в 1,38 порівняно із такими у осіб контрольної групи (здорових довгожителів). Частота хромосомних аномалій в групах довгожителів хворих на АГ і довгожителів хворих на ОА була відповідно $(2,93 \pm 0,09)$ та $(2,64 \pm 0,37)$.

Водночас виявлено індивідуальну мінливість частоти хромосомних аберацій серед обстежених довгожителів від 0,2 до 5 %. У спектрі ХА всіх обстежених переважали нестабільні хромосомні аберації (дицентрики, кільця, фрагменти). При вивченні показника асоціацій акроцентричних хромосом встановлено тенденцію різниці показників у досліджуваних групах така ж, як і при вивченні частоти ХА. Показник середньої кількості ААХ в одній клітині у довгожителів першої групи (довгожителів хворих на АГ і ОА) був більшим в 1,07 порівняно із таким в осіб із другої групи (довгожителів хворих на АГ), в 1,32 порівняно із такою в осіб із третьої групи (довгожителів хворих на ОА) та в 1,75 раза ($p < 0,05$) із четвертою групою (здорові довгожителі).

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, остеоартроз, довгожителі, каріотип, хромосомні аберації, асоціації акроцентричних хромосом.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Старіння властиве майже усім живим організмам і протікає на всіх рівнях організації живого: від молекулярно-генетичного до організмового [1]. Згідно з сучасними уявленнями клітинної теорії старіння вагомими факторами є накопичення клітинних порушень, послаблення механізмів виживання і відновлення клітин і тканин. Найбільш частими серед них є спонтанні мутації в соматичних клітинах, зокрема структурні аберації хромосом. У багатфакторному процесі старіння останнім належить суттєва роль [2]. При дослідженні різних цитогенетичних і молекулярно-генетичних порушень у більшості випадків було встановлено, що частота їх виникнення збільшується із віком. Це стосувалося хромосомних аберацій (ХА) [3], мікроядер [4], втрати теломерних повторів [5], мутацій в глікофоринному локусі [6], розривів ДНК [7] тощо. Хромосомні аберації (ХА) – одна з ознак дестабілізації каріотипу, активізації соматичного мутагенезу. Традиційно цей показник використовувався для тестування генотоксичних ефектів, який об'єднує групу феноменів, що відрізняються за механізмами виникнення. Ряд вчених вивчали стан хромосомного апарату в осіб, хворих на артеріальну гіпертензію (АГ) та при поєднаній патології [8], однак робити із вивчення особливостей стану хромосомного апарату довгожителів Прикарпаття: хворих на АГ і остеоартроз (ОА), здорових не проводилось.

Зміни каріотипу можуть вказувати на структурні порушення хроматиду, зумовлені екзо- та ендogenous чинниками, стан адаптивних можливостей організму тощо. Саме з таких позицій ми підходили до оцінювання частоти та спектра ХА, асоціацій акроцентричних хромосом (ААХ) у лімфоцитах периферійної крові довгожителів Прикарпаття.

Мета дослідження. Вивчення частоти та спектра хромосомних аберацій, асоціацій акроцентричних хромосом та порівняння отриманих результатів у довгожителів Прикарпаття хворих на АГ і ОА, хворих тільки на АГ, хворих тільки

на ОА і здорових.

Матеріал і методи дослідження

Для дослідження особливостей каріотипу створено вибірки з урахуванням стану здоров'я довгожителів: хворі на АГ другого ступеня та другої стадії та ОА другого ступеня ($n=83$), довгожителі хворі на АГ ($n=76$), довгожителі, хворі на ОА ($n=49$) та відносно здорові ($n=56$). Проведення цитогенетичного аналізу довгожителів базувалося на дослідженні каріотипу лімфоцитів периферійної крові. Забір матеріалу проводився стерильними шприцами з додаванням 0,01 мл розчину гепарину, поміщали в сумку-термос ($t=5-7^{\circ}\text{C}$) та протягом 1-2 год. доставляли до акредитованої генетичної лабораторії ДВНЗ «Івано-Франківської національний медичний університет». Культивування лімфоцитів та приготування препаратів хромосом проводилося за методичними рекомендаціями, затвердженими МОЗ України [9]. Дослідження виготовлених препаратів проводили на оптико-електронному комплексі «Метаскан – 2».

Аналізували метафазні пластинки з добрим розкидом хромосом. Від кожної людини проаналізовано не менше 30 метафазних пластинок. Окрім ідентифікації хромосомних аберацій, вивчали кількість асоціацій акроцентричних хромосом (ААХ). Наявність ААХ оцінювали за критеріями, розробленими О.К. Фроловим і співавт. (1993) [10]. Враховувалася специфічність розміщення акроцентричних хромосом у метафазі: відсутність накладання хромосом, короткі плечі акроцентриків орієнтовані одне до одного і відстань між ними без урахування супутників (сателітів) не перевищує розміру довгого плеча хромосоми з групи G, більша відстань приймалася за асоціацію, якщо акроцентрики були зв'язані видимими нитками або лежали на одній хромосомній осі. Враховували асоціативний індекс як співвідношення кількості клітин з асоціаціями до загальної кількості проаналізованих клітин, у перерахунку на 100 %. Також визначали середнє число ААХ в одній клітині та є середнє число хромосом в одній асоціації.

Результати дослідження та їх обговорення

Цитогенетичний аналіз першочергово був проведений у довгожителів хворих на артеріальну гіпертензію, поєднану з остеоартрозом. Отримані результати порівнювали з такими у довгожителів без вищезгаданої патології. Середні показники частоти ХА були наступними: $(3,01 \pm 0,27)$ у довгожителів із АГ та ОА, а в здорових осіб – $(2,17 \pm 0,53)$. У довгожителів, хворих на АГ або на ОА, відмінності від частоти ХА в осіб контрольної групи (здорових довгожителів) були ще менш значущими, відповідно, $(2,56 \pm 0,33)$ і $(2,45 \pm 0,27)$, відповідно. При порівнянні отриманих показників, виявлено тенденцію до збільшення частоти ХА залежно від стану здоров'я довгожителів. Так, в осіб із поєднаною патологією, а саме АГ і ОА частота ХА була більшою в 1,17 раза порівняно із такою у довгожителів, хворих тільки на АГ, і в 1,22 раза порівняно із такою у довгожителів, хворих тільки на ОА, відповідно.

Нами реєструвалася індивідуальна мінливість частоти ХА серед обстежених довгожителів від 0,22 до 5,01 %.

Аналіз частоти ХА в осіб різної статі чотирьох груп достовірного статевого диморфізму не виявив (табл. 1). Однак було діагностовано тенденцію до більшої частоти порушень хромосомного апарату в чоловіків-довгожителів.

При дослідженні ХА нами враховувалися всі аберації хромосомного і хроматидного типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом (табл. 2).

Нестабільні хромосомні аберації (дицентрики, кільця, фрагменти) призводять до загибелі клітин, стабільні (транс-

Таблиця 1. Частота хромосомних аберацій у довгожителів Івано-Франківської області залежно від статі, M±m

Досліджувані групи	Чоловіки n=113	Жінки n=151
Перша група (довгожителі хворі на АГ і ОА) n=83	3,12±0,26	2,91±0,37
Друга група (довгожителі хворі на АГ) n=76	3,04±0,12	2,82±0,06
Третя група (довгожителі хворі на ОА) n=49	2,81±0,22	2,47±0,52
Четверта група (здорові довгожителі) n=56	2,31±0,31	2,03±0,62

Примітка. * – вірогідність відмінностей з показниками групи здорових довгожителів ($p<0,05$)

локації, інсерції), як відомо, супроводжують онтогенез, а також можуть впливати на життєво важливі функції клітин. Подібна генетична нестабільність соматичних клітин зумовлює глибокий вплив на генну експресію, що призводить до генетичних та епігенетичних змін та в подальшому до дегенерації і атрофії клітин, тканин. Останнє є причиною старіння організму в цілому [11].

Отримані результати не суперечать багаточисленним цитогенетичним дослідженням, які були проведені Н.П.Бочковим та співавторами [12, 13]. Ними встановлено відсутність змін загальної кількості абераційних метафаз залежно від статі та віку людини. Проте, після 80 років кількість фрагментів зростає, а кількість хроматидних обмінів зменшується. Це підтверджено науковими працями А.М.Чеботарьова [14], які пов'язують це з більш ефективним перебігом репараційних процесів у молодому віці.

При вивченні показника адаптивних можливостей та імуногенетичного статусу організму – асоціацій акроцентричних хромосом, достовірних статевих змін у всіх обстежених довгожителів не виявлено [15]. Відзначалися коливання кількості ААХ залежно від стану здоров'я. Встановлено, що середня частота клітин з ААХ у довгожителів, хворих на АГ та ОА, переважала таку в осіб без вищезгаданої патології (табл. 3).

При аналізі враховували всі можливі варіанти асоціацій між парами хромосом. Показник середньої кількості ААХ в одній клітині в довгожителів першої групи був більшим в 1,07 порівняно із таким в осіб із другої групи, в 1,32 порівняно із такою у осіб із третьої групи та в 1,75 раза ($p<0,05$) із такою у осіб із четвертої групи (здорові довгожителі). Подібна тенденція збереглась при аналізі показника числа асоційованих хромосом в одній клітині.

Кількість асоційованих хромосом в одній клітині була мінливою і становила в здорових довгожителів (1,80±0,31)

Таблиця 3. Частота асоціацій акроцентричних хромосом у лімфоцитах периферійної крові різних досліджуваних груп довгожителів Івано-Франківської області, M±m

Група дослідження	Частота клітин з ААХ, %	Середня кількість ААХ в одній клітині, %	Число асоційованих хромосом в одній клітині, %
Перша група (довгожителі хворі на АГ і ОА) n=83	93,68±0,27	3,24±0,41*	4,1±0,22*
Друга група (довгожителі хворі на АГ) n=76	90,21±0,63	3,01±0,22*	3,72±0,11*
Третя група (довгожителі хворі на ОА) n=49	88,73±0,31	2,45±0,33	3,21±0,42
Четверта група (здорові довгожителі) n=56	82,83±0,61	1,85±0,54	2,5±0,14

Примітка. * – вірогідність відмінностей з показниками групи порівняння (довгожителі без захворювань) ($p<0,05$)

Таблиця 2. Структура хромосомних аберацій у довгожителів Івано-Франківської області

Показники	Частота аберацій на 100 клітин			
	Перша група (довгожителі хворі на АГ і ОА), n=83	Друга група (довгожителі хворі на АГ), n=76	Третя група (довгожителі хворі на ОА), n=49	Четверта група (здорові довгожителі), n=56
Хромосомні аберації	3,01±0,27	2,56±0,33	2,45±0,27	2,17±0,53
Аберації хромосомного типу	1,87±0,12	1,53±0,22	1,43±0,31	1,12±0,13
Парні фрагменти	1,17±0,04	1,14±0,08	1,04±0,05	1,06±0,13
Розриви	0,13±0,05	0,12±0,07	0,12±0,03	0,11±0,02
Пробіли	0,19±0,06	0,18±0,03	0,17±0,02	0,15±0,07
Дисцентрики	0,06±0,02	0,05±0,04	0,05±0,03	0,04±0,02
Аберації хроматидного типу	0,96±0,32	0,84±0,21	0,74±0,14	0,68±0,12

Примітка. * – вірогідність відмінностей з показниками групи здорових довгожителів ($p<0,05$)

(рис. 1, а) та (3,2±0,15) і (3,8±0,18 %) в осіб із АГ і ОА, відповідно. При порівнянні цього показника в довгожителів з коморбідною патологією виявлено його перевагу над таким у здорових довгожителів у 1,18 раза, що свідчить про знижений імуногенетичний статус організму. Найчастіше зустрічалися ААХ з двома та трьома асоційованими хромосомами, рідше з трьома, чотирма та п'ятьма (рис. 1, б).

Так, частота асоціацій, які включали дві та три акроцентричні хромосоми у довгожителів хворих на АГ і ОА складала (80,93±1,01) і (19,67±0,31) %. Асоціації, до яких входили чотири і п'ять акроцентричних хромосом, виявлялись у цій досліджуваній групі рідше, відповідно (3,68±0,21) і (1,02±0,09) %. У двох довгожителів хворих на АГ і ОА виявлено ААХ з шести хромосом (0,03±0,01) %. У довгожителів із другої, третьої та четвертої досліджуваних груп достовірних відмінностей цих показників не виявлено. Таким чином встановлено більшу кількість цитогенетичних порушень (ХА, ААХ) у лімфоцитах периферійної крові довгожителів із захворюваннями на АГ та ОА порівняно із здоровими.

Висновки

Нами встановлена наступна особливість збільшення частоти ХА у довгожителів Прикарпаття: здорових < хворих на ОА < хворих на АГ < хворих на АГ і ОА. У спектрі ХА всіх обстежених переважали нестабільні хромосомні аберації. Виявлено тенденцію різниці показників ААХ у досліджуваних групах таку ж, як і при вивченні частоти ХА. Показник середньої кількості ААХ в одній клітині в довгожителів першої групи (довгожителів, хворих на АГ і ОА) був більшим в 1,07 порівняно із таким в осіб із другої групи (довгожителів хворих на АГ), в 1,32 порівняно із такою в осіб із третьої групи (довгожителів хворих на ОА) та в 1,75 раза ($p<0,05$) із четвертою групою (здорові довгожителі).

Перспективи подальших досліджень у цьому напрямку полягають у визначенні частоти поліморфних варіантів делецій генів системи детоксикації ксенобіотиків GSTT1 і GSTM1 у довгожителів, які сприяють адаптації організму до впливу різноманітних екзогенних.

Література

- Берестяна А.М. Роль мутагенних факторів в процесі старіння живих організмів / А.М. Берестяна, Д.М. Гродзинський // Науковий вісник Ужгородського університету (сер. Біолог.). – 2011. – Вип. 20. – С. 118 – 127.
- Болтіна І.В. Вплив шкідливих чинників та хронічної патології на цитогенетичні показники лімфоцитів периферійної

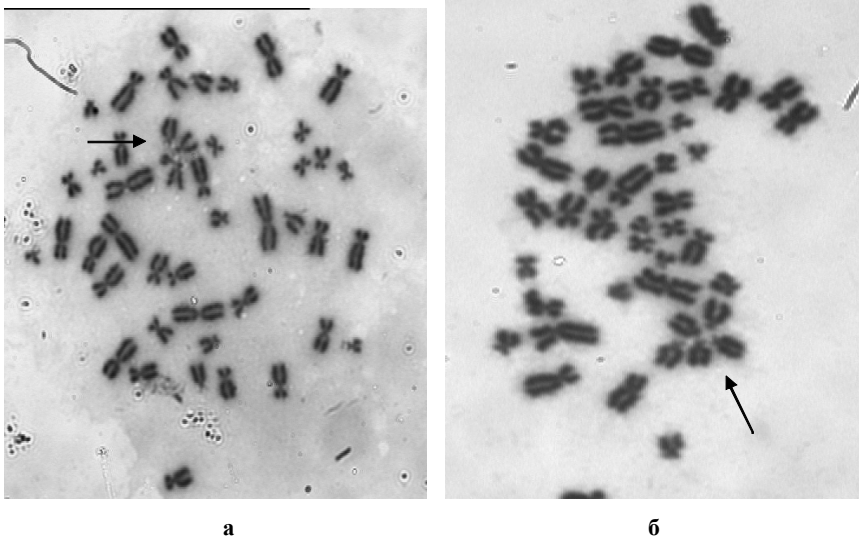


Рис. 1. Асоціації акроцентричних хромосом (↑) в метафазній пластинці периферійної крові здорового довгожителя К. (а) та хворого на АГ і ОА (б).
Забарвлено за Гімза. Зб.: ок. 15, об. 100.

крові у людей різного віку / І.В. Болтіна // Пробл. Старения и долголетия. – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 433-441.

3. Harman D. Free radical theory of aging / D. Harman // Mutation Research. – 1992. – 275. – Р. 257-266.

4. Чеботарев А.Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // Вестник РАМИ. – 2001. – № 10. – С. 64-69.

5. Lindsey J. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans / J. Lindsey, N.I. McGill, D.K. Green, H.I. Cooke // Mutation Research. – 1991. – 1991. – Р. 45-48.

6. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.

7. Чернюк Н. В. Значення генотипічних і фенотипічних маркерів для визначення спадкової схильності до розвитку хронічного обструктивного захворювання легень / Н. В. Чернюк / Буковинський медичний вісник. – 2008. – № 3. – С. 52-55.

8. Ковальчук Л.С. Роль спадкових, екологічних, соціальних факторів у формуванні тривалості життя і довголіття / Л.С. Ковальчук, Р.В. Козовий, Л.С. Малофій // Буковинський медичний вісник. – 2009. – Т.13, №4. – С.137-140.

9. Зерова-Любимова Т.Е., Горovenko Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Методичні рекомендації. – Київ, 2003. – 24 с.

10. Фролов А.К., Арцимович Н.Г. Сохин А.А. Имуноцитогенетика. – М.: Медицина, 1993. – 239 с.

11. Martin C.L. Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence / C.L. Martin, D. Warburton // Annual Review of Genomics and Human Genetics. -2015. –Vol.16. –P.309-326.

12. Бочков Н.П. Наследственные болезни: национальное руководство / Под. ред. Бочкова, Е.К. Гинтера, В.П. Пузырева. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2012. – 936 с.

13. Бочков Н.П. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека / Н.П. Бочков, А.Н. Че-

ботарев, Л.Д. Кагосова // Генетика. – 2001. – Т. 37, №4. – С. 549 - 557.

14. Чеботарев А.Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // Вестник РАМИ. – 2001. – № 10. – С. 64-69.

15. Багацкая Н.В. Особенности ассоциирования акроцентрических хромосом у больных ревматоидным артритом / Н.В. Багацкая, Е.В. Медзяновская // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. -2011. – Вип. 11. – С.71-76.

R.V. Kozoviy

Frequency and Spectrum of Chromosomal Aberrations, Acrocentric Chromosome Associations Among Long Livers with Arterial Hypertension and Osteoarthritis Residing in the Carpathian Region

Department of Medical Biology and Medical Genetics

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

E-mail: ruslan_kozoviy@ukr.net

Abstract. The frequency and spectrum of chromosomal aberrations, acrocentric chromosome associations among 264 long livers with arterial hypertension and osteoarthritis residing in the Carpathian region were analyzed. The obtained results were compared between patients with arterial hypertension and osteoarthritis, patients with arterial hypertension only, patients with osteoarthritis only and healthy individuals. The indices of the average frequency of chromosomal aberrations in all long livers was as follows: (2.82±0.27) in long livers with arterial hypertension and osteoarthritis and (2.17±0.47) in healthy individuals. In long livers with arterial hypertension and those with osteoarthritis, the frequency of chromosomal aberrations was 1.38 times higher compared to the control group (healthy long livers). The frequency of chromosomal abnormalities in long livers with arterial hypertension and those with osteoarthritis was (2.93±0.09) and (2.64±0.37), respectively.

At the same time, there was observed the individual variability in chromosomal aberration frequency from 0.2 to 5%. In the spectrum of chromosomal aberrations, unstable chromosomal aberrations (dicentrics, rings, fragments) predominated in all long livers. When studying the index of acrocentric chromosome associations there was revealed that the difference in the indices between studied groups was identical to that when studying the frequency of chromosomal aberrations. In long livers with arterial hypertension and osteoarthritis, the index of the average number of acrocentric chromosome associations per cell was 1.07 times higher than that in long livers with arterial hypertension only, 1.32 times higher compared to that in long livers with osteoarthritis only and 1.75 times higher compared to healthy individuals (p<0.05).

Keywords: arterial hypertension; osteoarthritis; long livers; karyotype; chromosomal aberrations; acrocentric chromosome associations.

Прийнято: 28.02.2017

Завершено рецензування: 15.03.2017

Прийнято: 19.03.2017