

УДК: 575.224.4:616.72-002-053.2/5
DOI: 10.15587/2313-8416.2016.60318

ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ СПОНТАННИХ ТА ІНДУКОВАНИХ ХРОМОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА ЮВЕНІЛЬНИЙ РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

© О. В. Медзяновська

Встановлено збільшення спонтанного рівня хромосомних порушень в лімфоцитах крові хворих на ювенільний ревматоїдний артрит у 2,6 разів порівняно зі здоровими дітьми. Виявлено збільшення рівня хромосомних порушень в лімфоцитах крові в залежності від клінічного варіанту, активності патологічного процесу, застосованої терапії та віку пацієнтів. Модельний мутаген викликав збільшення загального рівня хромосомних аберацій

Ключові слова: хромосомні аберації, ювенільний ревматоїдний артрит, лімфоцити периферичної крові, модельний мутаген

It has been found increase the spontaneous level of chromosomal disorders (by 2.6 times) in the blood lymphocytes of patients with juvenile rheumatoid arthritis, as compared with healthy. Our study has established the increase level of chromosomal abnormalities in the blood lymphocytes in vitro depending on the clinical course options, the activity of the pathological process, applied therapy and patient's age. Model mutagen caused an increase in the general level of chromosomal aberrations

Keywords: chromosomal aberrations, juvenile rheumatoid arthritis, peripheral blood lymphocytes, model mutagen

1. Вступ

Ювенільний ревматоїдний артрит (ЮРА) посідає особливе місце в структурі РЗ суглобів у дітей і підлітків через несприятливий характер перебігу патологічного процесу із збереженням активності у дорослому віці, високий ризик інвалідизації, необхідність протезування у частини хворих і в цілому незадовільну якість життя пацієнтів [1–3].

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

У зв'язку з цим, сучасні дослідження особливостей ЮРА спрямовані на дослідження чинників, які впливають на перебіг і прогноз захворювання, поліпшення його наслідків [4, 5]. Одним із методів оцінки впливу ендогенних і екзогенних факторів на організм є визначення стабільності генома, що має важливе значення для формування фенотипічно нормального організму в процесі індивідуального розвитку [6]. Це обумовлено тим, що підвищення рівня хромосомних порушень у хворих може супроводжуватися надзвичайно негативними побічними ефектами, серед яких є ушкодження багаточисельних локусів ДНК й таких, в яких розташовані структурні та регуляторні гени. Наслідком цього буде порушення експресії генів і стійка дезінтеграція біохімічного складу клітини, що може проявитися в більш тяжким перебігом і тривалістю захворювання, зниженні ефективності терапевтичних впливів і погіршенні прогнозу [7, 8]. Крім того, хромосомні мутації можуть бути джерелом виникнення злоякісних новоутворень і причиною репродуктивних втрат у майбутньому у цих осіб [9].

Проведені раніше цитогенетичні дослідження у хворих на РА переважно стосувалися визначення структурних порушень хромосом, а нестабільність геному визначалась за допомогою мікроядерного тесту [8].

Таким чином, необхідність визначення стабільності хромосомного апарату хворих на ЮРА є очевидною, однак досліджень, присвячених аналізу спонтанного і індукованого рівня хромосомних порушень, із урахуванням віку та статі хворих, особливостей перебігу ЮРА та застосованої терапії не проводилось, що й стало метою даної роботи.

3. Ціль та задачі дослідження

Метою дослідження стало визначення частоти хромосомних порушень у хворих на ювенільний ревматоїдний артрит, до та після впливу модельним мутагеном на лімфоцити периферичної крові *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні задачі:

- вивчити спонтанний рівень хромосомних порушень в лімфоцитах периферичної крові *in vitro* у хворих на ювенільний ревматоїдний артрит;

- оцінити частоту спонтанних хромосомних порушень в лімфоцитах периферичної крові *in vitro* хворих на ювенільний ревматоїдний артрит з урахуванням форми, активності патологічного процесу і тривалості захворювання, застосованої терапії, спадкової обтяженості щодо ревматичних захворювань;

- дослідити частоту хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові хворих на ювенільний ревматоїдний артрит після впливу модельним мутагеном (мітоміцином С) *in vitro*.

4. Матеріали та методи дослідження

4.1. Групи спостереження

Цитогенетичний аналіз було проведено у 80 дітей та підлітків, хворих на ЮРА (основна група), з яких 25 хлопчиків і 55 дівчаток віком від 3 до 17 років, середній вік становив $10,9 \pm 3,4$ років. Усі хворі проходили обстеження і лікування у відділенні кардіоревматології ДУ «ІОЗДП НАМН». Групу порів-

няння склали 59 дітей та підлітків (22 хлопчика і 37 дівчаток) віком від 3 до 17 років, які відбиралися спеціалістами інституту при проведенні профілактичних оглядів шкіл, гімназій, ліцеїв, усі діти обстежувалися в клініці інституту.

Цитогенетичні показники у хворих на ЮРА аналізувались в залежності від статі, віку, варіанту, активності і тривалості патологічного процесу, застосованої терапії, спадкової обтяженості щодо ревматичних захворювань (P3). Всіх обстежених хворих на ЮРА було поділено на три групи в залежності від віку: 3–10 років – 37 дітей, 11–14 років – 25 пацієнтів, 15–17 років – 18 підлітків; варіанту хвороби: у 10 пацієнтів діагностовано системний ЮРА, у 44 – олігоартрикулярний варіант, у 26 – поліартрикулярний варіант; ступеня активності ЮРА: перший ступінь активності – у 31, другий – у 23, третій – у 26 хворих дітей; тривалості патологічного процесу: від 3 місяців до 13 років, в середньому – $4,3 \pm 2,2$ років: до 1 року – 21 пацієнт; від 1 до 3 років – 18 пацієнтів; від 3 до 5 років – 19 пацієнтів; більше 5 років – 22 пацієнти.

Серед обстежених хворих на ЮРА визначали 4 групи, яким призначалася різна терапія. При розділенні на групи в залежності від отриманої терапії враховувалася наявність метотрексату та глюкокортикоїдів в комплексі базисної терапії: 1 група – 11 пацієнтів, які приймали метотрексат та глюкокортикоїди (ГК); 2 група – 50 хворих, яким призначався метотрексат; 3 група – 13 хворих, які отримували ГК; 4 група – 6 пацієнтів, яким діагноз ЮРА було встановлено вперше і вони ще не отримували лікування.

4. 2. Методика культивування лімфоцитів периферичної крові.

Культивування лімфоцитів периферичної крові здійснювали за загальноприйнятою методикою [10]. Встановлення чутливості хромосом до генотоксичної дії мітоміцину С в ЛПК *in vitro* проводили у 47 хворих на ЮРА і у 32 здорових однолітків.

У кожного пацієнта аналізували від 100 до 400 метафазних пластинок, в середньому по 200 метафаз, які включали 46 ± 2 . Враховували всі аберації хроматидного та хромосомного типів, які можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно забарвлених препаратах метафазних хромосом, в окрему групу виділяли геномні порушення.

4. 3. Методи статистичного аналізу

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням табличних процесорів *Excel*, *SPSS Statistics 17,0*. Оцінку статистичних відмінностей здійснювали за методами Стьюдента та χ^2 [11].

5. Результати досліджень

Цитогенетичний аналіз, проведений у хворих на ЮРА та здорових однолітків свідчив, що всі обстежені мали нормальний каріотип – 46,XX (жіночий) або 46,XY (чоловічий). Хромосомні порушення реєструвались у 100 % дітей основної групи і у 68,8 % дітей контрольної групи.

Середнє число аберантних метафаз у дітей та підлітків, що страждають на ЮРА, склало 4,36 %, що

вірогідно перевищувало число аберантних метафаз у групі порівняння (1,56 %; $p < 0,001$). Спонтанний рівень хромосомних аберацій (ХА) у хворих на ЮРА вірогідно перевищував (4,51 на 100 клітин) такий у здорових однолітків (1,60 на 100 клітин; $p < 0,001$). В обох групах ХА були надані абераціями хромосомного і хроматидного типів.

Індивідуальні значення спонтанних хромосомних аберацій коливались від 1,0 до 13,0 на 100 метафаз. У 25 % хворих рівень ХА знаходився в межах популяційної норми – від 0,0 до 3,0 на 100 клітин. У 55 % дітей індивідуальні значення спонтанних хромосомних порушень варіювали від 4,0 до 6,0 на 100 клітин, що відповідає середньому значенню для групи. У 20 % визначалися високі рівні хромосомних порушень, варіюючи від 7,0 до 13,0 на 100 клітин.

В основній групі співвідношення між абераціями хроматидного (2,91 на 100 клітин) і хромосомного (1,60 на 100 клітин) типів склало 1,8:1,0, тобто домінували аберації хроматидного типу, а саме одиночні ацентричні фрагменти, що співвідносяться з результатами інших дослідників [12]. Аберації хромосомного типу були представлені парними ацентричними фрагментами, дицентричними хромосомами, центричними кільцями, аномальними моноцентриками, передчасним розходженням центромер. Нестабільні аберації хромосомного типу (дицентричні та кільцеві хромосоми) визначались у трьох дітей, у однієї дитини – аномальний моноцентрик.

У групі здорових дітей індивідуальні значення хромосомних порушень – коливались в межах від 0,0 до 7,0 на 100 клітин. У 83 % здорових осіб рівень хромосомних порушень знаходився в межах популяційної норми: від 0,0 до 3,0 на 100 клітин. Середній рівень хромосомних порушень склав 1,84 на 100 клітин, що відповідає популяційній частоті, яка в середньому складає 1,83 % [13]. Також у дітей контрольної групи спектр порушень в ЛПК був значно вужчим: аберації хроматидного типу представлені лише одиночними ацентричними фрагментами; аберації хромосомного типу – парними ацентричними фрагментами і передчасним розходженням центромер. Співвідношення між абераціями хроматидного (0,76 на 100 клітин) і хромосомного (0,84 на 100 клітин) типів склало 1,0:1,12.

При порівнянні частоти різних видів ХА в ЛПК пробандів основної і контрольної груп, виявлено вірогідне збільшення частоти одиночних (2,91 проти 0,76 на 100 клітин, відповідно; $p < 0,001$) і парних ацентричних фрагментів (1,09 проти 0,77 на 100 клітин, $p < 0,01$), а також передчасного розходження центромер (0,48 проти 0,07 на 100 клітин, $p < 0,001$) у хворих.

Визначено підвищення частоти хромосомних порушень у хворих старшої вікової підгрупи в порівнянні з дітьми молодшого і середнього віку, а також із системним ЮРА порівняно з оліго- і поліартрикулярними варіантами захворювання. У хворих із третім ступенем активності захворювання реєструвалося підвищення загального рівня хромосомних порушень і частоти аберантних метафаз у порівнянні з першим і другим. Визначено підвищення рівня ХА та пору-

шень геномного типу у дітей із обтяженим сімейним анамнезом по материнській лінії. Тривалість перебігу захворювання і статева належність не спричиняли значного впливу на рівень хромосомної нестабільності. В той час як різні комплекси терапії приводили до підвищення рівня ХА.

Дослідження рівня ХА в залежності від застосованої терапії свідчило про те, що у хворих із 1-ої групи порівняння, які отримували метотрексат і ГК, встановлено найнижчий рівень спонтанних хромосомних порушень, який склав 3,89 на 100 клітин, хромосомні порушення були представлені ХА і порушеннями геномного типу. Хромосомні аберації зустрічалися з частотою 3,63 на 100 клітин, співвідношення між абераціями хромосомного і хроматидного типів складало 1:1,39. Частота порушень геномного типу складала 0,26 на 100 метафазних пластинок.

У хворих 2-ої групи, яким призначався метотрексат, загальний рівень спонтанних хромосомних порушень був вірогідно вище, ніж у хворих 1-ої групи (5,27 проти 3,89 на 100 клітин, відповідно, $p < 0,01$) за рахунок підвищення частоти одиночних ацентричних фрагментів, $p < 0,01$. Слід відзначити, що серед пацієнтів 2-ої групи, шість осіб окрім метотрексата, приймали сульфасалазин – базисний протизапальний і антибактеріальний препарат. Спонтанний рівень хромосомних порушень у цих хворих складав 7,00 на 100 клітин і був вірогідно вище, ніж у інших пацієнтів цієї підгрупи – 5,03 порушень на 100 клітин, $p < 0,01$. Переважали аберації хроматидного типу – одиночні ацентричні фрагменти, а також порушення геномного типу. Рівень спонтанних хромосомних порушень у цих хворих був вище, ніж у пацієнтів 3-ої (7,00 проти 4,16 порушень на 100 клітин, відповідно; $p < 0,001$) і 1-ої груп порівняння (7,00 проти 3,89 порушень на 100 клітин, відповідно; $p < 0,001$). В обох групах вірогідні відмінності визначено у частоті одиночних ацентричних фрагментів і поліплоїдних клітин. Отримано зниження частоти хромосомних порушень у хворих 3-ої групи, які не отримували метотрексат, у порівнянні з хворими 2-ої (4,16 проти 5,27 на 100 клітин, відповідно, $p < 0,01$) завдяки зниженню частоти передчасного розходження центромер. Статистично значущі відмінності встановлено при порівнянні рівня спонтанних хромосомних порушень між хворими 1-ої та 4-ої груп. У хворих із вперше встановленим діагнозом хромосомні порушення реєструвалися частіше (5,63 на 100 клітин), ніж у хворих, які приймали метотрексат разом із ГК (3,89 на 100 клітин; $p < 0,05$) за рахунок аберацій хроматидного типу та геномних порушень.

Вивчення можливої модифікації цитогенетичного ефекту в ЛПК дітей і підлітків, хворих на ЮРА, і здорових однолітків, проводилось з використанням модельного мутагену мітоміцину С *in vitro*. Для цього довільно була відібрана група з 47 хворих на ЮРА і 32 здорових однолітків. Після внесення мутагену в культуру ЛПК частота абераційних метафаз значно збільшилася в обох досліджуваних групах: в основній групі в 3,3 рази і складала 13,88 на 100 клітин, $p < 0,001$, у контрольній більш ніж в 11 разів (14,00 на 100 клітин; $p < 0,001$), що може бути проявом адаптив-

ного відгуку у здорових дітей, адже раніше вони не підпадали під постійний вплив мутагенних факторів. Тобто, у хворих на ЮРА отримано знижений адаптивний відгук.

Середній рівень хромосомних порушень у хворих на ЮРА підвищився в 3,8 рази порівняно зі спонтанним рівнем мутагенезу (4,49 на 100 клітин) і склав 17,18 на 100 клітин, $p < 0,001$, у дітей контрольної групи – в 6,7 рази (2,26 порушень на 100 клітин до та 15,25 порушень на 100 клітин після мутагенного навантаження; $p < 0,001$). Багаторазове підвищення рівня хромосомних порушень в ЛПК обох досліджуваних груп хворих відбувалось за рахунок підвищення частоти ХА. В основній групі рівень аберацій хроматидного типу збільшився в 5,3 рази, рівень аберацій хромосомного типу – в 1,7 рази за рахунок підвищення частоти парних ацентричних фрагментів.

У дітей і підлітків контрольної групи частота аберацій хроматидного типу збільшилась в 10 разів, частота аберацій хромосомного типу – в 6 разів за рахунок підвищення рівня парних ацентричних фрагментів. Крім того, в однієї дитини з контрольної групи після додавання мітоміцину С в культуру ЛПК виявлялося центричне кільце. В обох групах переважали аберації хроматидного типу, зокрема одиночні ацентричні фрагменти, у співвідношенні 4,8:1,0 – у хворих на ЮРА та 1,5:1,0 – у здорових дітей. Підвищення частоти аберацій хроматидного типу характерно для мутагену хімічної природи, зокрема мітоміцину С, у той час як індикаторами радіаційного впливу є аберації хромосомного типу [14]. Внесення в культуру ЛПК модельного мутагену мітоміцину С *in vitro* привело до статистично значущого підвищення рівня мультиабераційних клітин з 0,006 до 0,36 на 100 клітин у хворих на ЮРА ($p < 0,001$) і з 0,0 до 0,87 на 100 клітин у здорових однолітків ($p < 0,001$).

Отже, додавання мітоміцину С *in vitro* призвело до багаторазового підвищення рівня хромосомних порушень в ЛПК обох досліджуваних груп, при цьому середній рівень індукованих хромосомних порушень був вище в основній групі порівняно з контрольною (17,18 і 15,25 на 100 клітин, відповідно; $p < 0,05$).

7. Висновки

Проведений цитогенетичний аналіз ЛПК хворих на ЮРА та здорових однолітків дозволив встановити підвищений рівень спонтанних хромосомних порушень в 2,6 рази у хворих дітей порівняно зі здоровими, що може свідчити про існування в них хромосомної нестабільності. Крім того визначено особливості хромосомної нестабільності у хворих на ЮРА з урахуванням віку та статі дітей, клінічних особливостей захворювання та лікувальної терапії. Додаткове мутагенне навантаження ЛПК дозволило встановити зниження адаптивного відгуку в групі дітей хворих на ЮРА.

Література

1. Бойко, Я. Е. HLA B27 у дітей з ювенільним ідіопатичним артритом: клінічна оцінка 72 хворих [Текст] / Я. Е. Бойко // Український ревматологічний журнал. – 2007. – Т. 28, Вип. 2. – С. 61–65.

2. Никишина, И. П. Современная фармакотерапия системного ювенильного артрита [Текст] / И. П. Никишина, М. И. Каледа // Научно-практическая ревматология. – 2015. – Т. 53, № 1. – С. 84–93.
3. Ребров, Б. О. Нові можливості в діагностиці та лікуванні раннього ревматоїдного артриту [Текст] / Б. О. Ребров, С. С. Касинець, О. Б. Комарова // Український ревматологічний журнал. – 2013. – Т. 53, № 3. – С. 35–39.
4. Лебеть, І. С. Характеристика проявів суглобової форми ювенильного ревматоїдного артриту на ранніх етапах розвитку захворювання [Текст] / І. С. Лебеть, Н. О. Панько // Сучасна педіатрія. – 2012. – № 7. – С. 146–149.
5. Панько, Н. О. Прогнозування еволюції ранніх ювенильних артритів на першому році розвитку процесу [Текст] / Н. О. Панько // Современная педиатрия. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 134–137.
6. Ильинских, Е. Н. Цитогенетические нарушения в мононуклеарных клетках периферической крови больных острым иксодовым клещевым боррелиозом [Текст] / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. Г. Семенов // Цитология и генетика. – 2013. – № 1. – С. 56–67.
7. Пахалина, И. А. Некоторые биохимические аспекты формирования нестабильности геному у больных детским церебральным параличом [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.04 / И. А. Пахалина. – Казань, 2009. – 28 с.
8. Макарова, Т. П. Оценка нестабильности геному у больных ювенильным ревматоидным артритом [Текст] / Т. П. Макарова, М. С. Ильина, В. В. Семенов, С. А. Сенек // Практическая медицина. – 2013. – № 1. – С. 132–135.
9. Болтина, И. В. Цитогенетические показатели у больных с опухолями головного мозга при действии *in vitro* некоторых фармакологических препаратов [Текст] / И. В. Болтина, Н. Я. Гридина, Е. Н. Струменская // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 1. – С. 51–55.
10. Зерова-Любимова, Т. Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини [Текст]: метод. рек. / Т. Е. Зерова-Любимова, Н. Г. Горовенко; КМАПО ім.П. Л. Шупика. – К., 2003. – 25 с.
11. Атраментова, Л. А. Статистические методы в биологии [Текст]: учебник / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
12. Дибський, С. С. «Мішеневі» та «немішеневі» цитогенетичні ефекти в соматичних клітинах осіб, які зазнали впливу іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС [Текст]: автореф. дис. ... док. біол. наук: спец. 03.00.15 / С. С. Дибський. – К., 2010. – 40 с.
13. Болтина, И. В. Использование показателя «частота aberrаций хромосом» при формировании групп риска относительно онкологических заболеваний [Текст] / И. В. Болтина // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 1. – С. 66–74.

14. Педан, Л. Р. Радіоіндукований цитогенетичний ефект і його модифікація *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові осіб, які постраждали від дії факторів Чорнобильської аварії [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 03.00.15 / Л. Р. Педан. – К., 2005. – 20 с.

Reference

1. Boyko, Ya. E. (2007). HLA B27 associations in children with juvenile idiopathic arthritis: a clinical evaluation of 72 patients. *Ukrainian journal of rheumatology*, 28 (2), 61–65.
2. Nikishia, I. P., Khaleda, M. I. (2015). Modern pharmacotherapy of systemic juvenile arthritis. *Scientific and practical rheumatology*, 53 (1), 84–93.
3. Rebrov, B. O., Kasynets, S. S., Komarova, O. B. (2013). New opportunities in diagnosis and treatment of early rheumatoid arthritis. *Ukrainian journal of rheumatology*, 53 (3), 35–39.
4. Lebet, I. S., Panko, O. N. (2012). Description of articular manifestations form of juvenile rheumatoid arthritis in the early stages of the disease. *Modern Pediatrics*, 7, 146–149.
5. Panko, N. O. (2013). Predicting the evolution of early juvenile arthritis in the first year of the process. *Modern Pediatrics*, 53 (5), 134–137.
6. Ilyinskikh, E. N., Ilyinskikh, I. N., Semenov, A. G. (2013). Cytogenetic aberrations in peripheral blood mononuclear cells in acute Lyme borreliosis patients. *Cytology and Genetics*, 1, 56–67.
7. Pahalina, I. A. (2009). Some biochemical aspects of the formation of genome instability in patients with cerebral palsy. *Kazan*, 28.
8. Makarova, T. P., Ilyina, M. S., Semenov, V. V., Senec, S. A. (2013). Evaluation of genomic instability in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Practical medicine*, 1, 132–135.
9. Boltina, I. V., Hrydyna, N. Y., Strumenskaya, E. N. (2011). Cytogenetic indicators in patients with tumors brain during pharmacological action *in vitro* by some drugs. *Bulletin problems of biology and medicine*, 1, 51–55.
10. Zerova-Lubimova, T. E., Gorovenko, N. G. (2003). Cytogenetic methodological investigation of human chromosomes: method. instruction. P. Shupyk KMAPE. Kyiv, 23.
11. Atramentova, L. A., Utevskaia, O. M. (2008). *Statistical Methods in Biology*. Gorlovka: Vidavnistvo Lihtar, 248.
12. Dybsky, S. S. (2010). "Target" and "no target" cytogenetic effects in somatic cells of persons exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl accident. *Kyiv*, 40.
13. Boltina, I. V. (2007). The use of the parameter «frequency of chromosome aberrations» in formation of risk groups regarding oncological diseases. *Cytology and Genetics*, 41 (1), 66–74.
14. Pedan, L. R. (2005). Radiation induced cytogenetic effect *in vitro* and its modification in peripheral blood lymphocytes of people affected by the factors of the Chernobyl accident. *Kyiv*, 20.

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук, професор Багацкая Н. В.
Дата надходження рукопису 12.01.2016*

Медзяновська Олена Вікторівна, аспірант, лабораторія медичної генетики, Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків Національної академії медичних наук України, пр. Ювілейний (пр. 50 років ВЛКСМ), 52-а, м. Харків, Україна, 61153
E-mail: elena240487@yandex.ru