

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЧЕСТОТА НА СЕСТРИНСКИТЕ ХРОМАТИДНИ ОБМЕНИ В
ЛИМФОЦИТНИ КУЛТУРИ НА БОЛНИ ОТ МИОТОНИЧНА ДИСТРОФИЯ
(БОЛЕСТ НА STEINERT).**

Б. Попов¹, Св. Георгиева², С. Лалчев³ А. Григорова¹, Н. Димитрова¹

¹*Катедра «Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика», Медицински факултет, ²Катедра «Генетика, развъждане и репродукция», Аграрен факултет*

Тракийски университет, Стара Загора, България

³*Медицински университет-София*

**FREQUENCY OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN LYMPHOCYTE CULTURES
FROM PATIENTS WITH DYSTROPHIA MYOTONICA.
(A DISEASE OF STEINERT).**

B. Popov¹, Sv. Georgieva², S. Lalchev³

¹*Department of Molecular Biology, Immunology & Genetics, Faculty of Medicine, ²Department of Genetics, Breeding and Reproduction, Faculty of Agriculture, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria*

³*Department of Medical Genetics, Medical University, Sofia, Bulgaria*

e-mail: sgeorg@uni-sz.bg

ABSTRACT

Dystrophia myotonica (MD) is a multisystem hereditary disease occurring in dystrophic-degenerative changes in muscle tissue. In patients with similar degenerative changes increased frequency of sister chromatid exchanges (SHO) in somatic and blood cells are frequently observed. Based on this formulation frequencies of SHO were analyzed in 11 patients suffering from MD and 10 healthy volunteers taken as control group. Cytogenetic results showed statistically significantly greater incidence of SHO of a cell in patients with MD compared with the control group. Results from these studies allow us to discuss the possibility of the SHO level in peripheral blood lymphocytes can be used as an additional cytogenetic test, along with myotonic and dystrophic disorders in muscle tissue of patients with MD, and used direct DNA analysis (proof of expansion of CTG repeat in the DNA of lymphocytes from venous blood, from muscle biopsy and other sources of nuclear cells).

Key words: *dystrophia myotonica, DMPK, myotonic dystrophy protein kinase gene, sister chromatid exchange*

УВОД

Наследствените невро-мускулни заболявания (НМЗ) са сравнително честа патология, засягаща около 1 на 3 000 индивида и водят до значителна хронична неврологична инвалидизация. MD е генетично мултисистемно заболяване протичащо с дистрофично-дегенеративни изменения в мускулната тъкан. Унаследява се автосомно-доминантно с непълна пенетратност. Честотата на миотоничната дистрофия е 2.5 на 100 000 население. Най-често заболяването се развива между 10-20 годишна възраст. Клинично се характеризира с миотонични феномени (затруднена релаксация след силно мускулно съкращение), прогресираща мускулна слабост и атрофия, катаракта, кардиомиопатия, гонадна атрофия и когнитивни нарушения, фронтално оплешивяване, ЕМГ доловими миотонични промени и ЕКГ промени от проводен тип. При патоморфологични изследвания се откриват участъци на хипертрофия, както и такива на атрофия на мускулните влакна и заместване на миофибрилите с със съединителна и мастна тъкан. На електронна микроскопия се виждат патологични промени в митохондриите и деструкция на миофибриларния апарат и саркоплазматичния ретикулум (1).

Описани са четири клинични форми в зависимост от възрастта на поява на първите симптоми – конгенитална MD, MD в ранна детска възраст, адултна MD, минимална MD. При заболявания с подобни дегеративни промени често се установява повишена честота на сестринските хроматидни обмени (СХО) в соматичните и кръвни клетки на болните пациенти (2). Изхождайки от тази презумция ние анализирахме честотата на СХО в метафазни пластинки от периферна венозна кръв на болни от MD.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

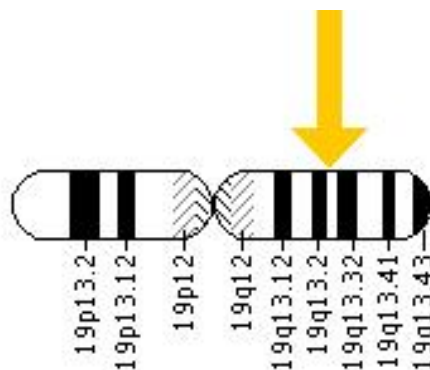
Цитогенетично бяха изследвани 21 човека, разпределени в две групи:

- 11 болни от MD (6 мъже и 5 жени на възраст от 25 до 40 години, непушачи), чиято диагноза беше поставена на базата на необходимите клинични и параклинични изследвания съгласно критериите на националния консенсус за диагностика, лечение и профилактика на невро-мускулните заболявания в Р. България;
- Контролна група от 10 души непушачи, чиито работни места са без наличието на химични, физични и други вредности, които биха завишили нивото на СХО.

Хромозомните препарати за получаване на метафазни пластинки за отчитане на СХО бяха изготвени чрез краткосрочно култивиране на лимфоцити от периферна венозна кръв по метода на Evans H.J. (3). Култивирането беше извършено в стерилни флакони от 20 ml, съдържащи следните съставки: 7 ml хранителна среда за клетъчно култивиране RPMI-1640 с L-глутамин и HEPES буфер; 3 ml топлинно инактивиран нормален телешки серум; 0.2 ml ресубституиран 2% фитохемаглутинин; 100 E/ml Penicillin и 50 mg/ml Gentamycin; 0.5 ml хепаринизирана венозна кръв. Флаконите бяха затваряни в стерилен бокс и поставяни в термостат при 37⁰C за 72 часа. Клетъчното култивиране и обработка следваше стандартния протокол, възприет в Institute of Human Genetics, University of Copenhagen – Denmark. Диференциалното оцветяване на сестринските хроматиди извършихме по метода на Perry и Wolf (4) като на 24-я час от култивирането поставяхме във всеки флакон 5-бромдезоксиуридин в крайна концентрация 10 mg/ml. На 72 час препаратите бяха оцветявани чрез комбинирана Hoechst-Gimsa техника. Отчитането на СХО, за всеки от изследваните, беше извършено върху 30 клетки от втора митоза с диференциално оцветени хроматиди. При отчитането на броя на СХО стриктно се спазваше правилото, че всеки терминален обмен е равен на един, а интерстициалните обмени са резултат от два обмена. Резултатите от цитогенетичните изследвания бяха обработени статистически с използването на t – критерий.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

MD се обуславя от динамични мутации, засягащи DMPK-гена (myotonic dystrophy proteinkinase gene), локализиран върху дългото рамо на 19 хромозома (19q13.3) и схематично е представен на фиг. 1 (13).



Фиг.1 Схематично представяне на локализацията на DMPK-гена върху 19 хромозома.

Нарушава се обмяната на ензима миотонин-протеинкиназа. Установява се амплификация на тринуклеотидни CTG-повторения в 3' нетранслируем регион на DMPK-гена (5). Нормалният брой на тези повтори варира между 5 и 37. Клинична изява на заболяването се установява, когато броят на повторите надхвърли 50. При индивиди с CTG-повторения между 35 и 49 няма клинична симптоматика, но техните деца са с повишен риск от унаследяване на по-голям брой повтори и съответно изявяване на болестта. Началото и тежестта на заболяването корелират с броя на амплифицираните повтори и произхода на мутантния ген - майчин или бащин (6) Установено е, че колкото е по-голям е този брой, толкова по-рано започва и по-тежко протича заболяването. Тъй като тринуклеотидните CTG повтори в DMPK гена са нестабилни по време на митозата, често се установява соматичен мозаицизъм по отношение на размера на CTG експанзията (7, 8). Затова не винаги е възможна корелация между размера на повторите, наблюдавани в една тъкан, и тежестта на заболяването. Много типично явление е антиципацията - по-ранно начало и по-тежка клинична изява на заболяването във всяко следващо поколение. Тя се дължи на увеличаването на CTG-повторите в поколенията. Когато заболяването е унаследявано в няколко поколения в дадена фамилия, има риск то да дебютира в ранното детство, а в случаите, при които CTG- повторите надхвърлят 1500, възниква конгениталната форма на заболяването (9). Пренатално тази форма се проявява с хидрамнион, с отслабени движения на плода, риск от артрогрипоза. При раждането основните симптоми са лицева диплегия, генерализирана слабост, хипотония и респираторен дистрес. Моторното развитие на тези деца е забавено, но те се научават да ходят. Мускулната хипотония и двигателната слабост могат да се подобрят с годините, но по-късно се развиват симптомите на класическата форма. До 11-годишна възраст се появяват клинически и миотоничните феномени. 50-60% от децата са с умствено изоставане (10).

Наблюдава се добре изразена връзка и корелация между генотипа и фенотипа на болните индивиди. Тежестта на клиничната картина и времето на появата на заболяването са свързани с по-големия брой и експанзия на CTG- тринуклеотидните повтори в ДНК на клетките. Поради нарастващата експанзия във всяко следващо поколение се наблюдават по ранно начало и по-тежка клиника на болестта - антиципация. При унаследяване на патологичния ген от майката антиципацията е по-силно изразена.

Тези изследвания на водещи автори при проучването на етиологията, патогенезата и клиниката на MD ни дават основание на твърдим, че съществува ясно изявен клиничко-генетичен полиморфизъм при това заболяване, който затруднява поставянето на точна диагноза. Търсенето и въвеждането на всеки нов допълнителен параклиничен критерий би улеснил лекарите в диференциално-диагностичен план. Затова ние се насочихме към изследване честота на СХО при болни с MD.

На табл. 1 са представени резултатите от честота на СХО/клетка на изследваните донори по групи.

Таблица 1. Резултати от отчитането на СХО при контролна група и болни с миотонична дистрофия.

Донори	Брой на анализ. метаф.	СХО общо	СХО на клетка	Донори	Брой на анализ. метаф.	СХО общо	СХО на клетка
Контроли				Болни от MD			
1	30	235	7.83	1	30	384	11.6
2	30	237	7.9	2	30	355	11.8
3	30	237	7.9	3	30	371	12.37
4	30	235	7.8	4	30	363	12.1
5	30	252	8.4	5	30	362	12.06
6	30	244	8.13	6	30	368	12.26
7	30	247	8.23	7	30	378	12.6
8	30	249	8.3	8	30	381	12.7
9	30	232	7.73	9	30	382	12.73
10	30	254	8.47	10	30	371	12.37
				11	30	386	12.87
Mean ±SD		242.2±7.95	8.06±0.27	Mean ±SD		372.8±10.18*	12.31±0.24*

*p<0.001 vs контролната група

Анализът на резултатите от нашето проучване показват статистически достоверно завишаване на честотата на СХО **12.31±0.24** при болните от MD (fig.1) в сравнение с контролната група **8.06±0.27** (fig.2).



Фиг. 1. Метафазна пластинка от митоза със СХО от донор с MD.



Фиг. 2. Метафазна пластинка от втора митоза със СХО от контролната група.

Механизмите за възникване на СХО са пряко свързани с репаративните процеси и техните нарушения при увреждането на ДНК (11). Трябва да се отбележи, че СХО се наблюдава и при нормални условия, като честотата е видово специфична. Честотата на СХО обаче нараства при мутагенно въздействие предизвикано от ендогенни или екзогенни фактори което показва, че обмяната на хомоложни хроматидни участъци вероятно представлява механизъм за възстановяване на повредената ДНК. Допускаме, че по-големия

брой и експанзия на CTG-тринуклеотидните повтори в ДНК на клетките на болните от MD, уврежда репарацията на ДНК и е вероятна причина за повишаване честота на СХО. Нарушава се и локалната нуклеозомна структура на хроматина както и РНК метаболизмът на клетката (12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диференцирането на различните видове НМЗ понякога е трудна задача, за решаването на която се изисква задълбочено клинично изследване, подкрепено от набор специализирани изследвания, приложени в строго последователен ред. Само по този начин може бързо и максимално щадящо за пациента по отношение на инвазивни диагностични тестове да се постави навременната точна диагноза, правилно да се ориентира терапията и да се осигури по възможност пренатална диагноза в семейството при евентуална следваща бременност.

В заключение ние предлагаме честота на СХО в лимфоцити от периферна кръв да се прилага при болните от MD, като допълнителен диагностичен критерий в алгоритъма за решаване на диференциално-диагностични задачи в областта на нервно-мускулните заболявания, който включва: пълно клинично изследване; изследване на мускулни ензими; електрофизиологично изследване; биопсия от мускул или нерв; ДНК анализ, който освен почти стопроцентовото потвърждаване на диагнозата по отношение на пробанда, дава основание и за евентуална пренатална диагноза при следваща бременност в семейството (13).

ЛИТЕРАТУРА

1. Манчев, И. Х., И. К. Георгиев. Наследственодегенеративни заболявания в неврологията. Полиграфия, ЕАД – Пловдив, 215 стр., 1997
2. Попов, Б.Н., И.М.Лефтеров, В.Вълчева, В.Иванчев. "Честота на сестринските хроматидни обмени в лимфоцитни култури на болни от латерална амиотрофична склероза". Годишник на ВМИ, Ст.Загора, Том 4, 15 – 16, 1996.
3. Evans, H.J., M.L O`Riordan. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test, - Mutation Research, 31, 135-148. 1975.
4. Perry P & Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251:156-8. 1974.
5. Caskey CT, Swanson MS, Timchenko LT. Myotonic dystrophy: Discussion of molecular mechanism. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.;61:607–614. 1996.: 9246487
6. Kaytor MD, Burreight EN, Duvick LA. et al. Increased trinucleotide instability with advanced maternal age. Hum Mol Genet.;6:2135–2139. 1997.
7. Lavedan C, Hofmann-Radvanyi H, Shelbourne P. et al. Myotonic dystrophy: Size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. Am J Hum Genet.;52:875–883. 1993.: 8098180
8. Monckton DG, Wong L -J C, Ashizawa T. et al. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: Small pool PCR analyses. Hum Mol Genet.;4:1–8. 1995.
9. Tsilfidis C, MacKenzie AE, Mettler G. et al. Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. Nat Genet.;1:192–195. 1992.: 1303233
10. : 932 Monckton DG, Ashizawa T, Siciliano MJ. Murine models for myotonic dystrophy In: Wells RD and Warren ST, eds. Genetics Instabilities and Hereditary Neurological Diseases San Diego: Academic Press, 181–193.1993. 1998.
11. Wilcosky, T. C., S. M. Rynard. Sister chromatid exchanges. In: Hulka BS, Wilcosky, TC. Griffith JD, eds. Biological Markers in Epidemiology 1: 103-122. 1990.
12. Медицинска генетика в клиничната практика. Под редакцията на проф. Д.Тончева. Издателска къща Сиела, София, 1999.

13. Шопова А., А. Тодорова, Т. Тодоров, В. Гергелчева, И. Търнев. Пренатална диагностика на миотонична дистрофия тип 1. Националната конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието с международно участие. Резюмета, София, 2010