გენომის ეპიგენეტიკური დონის განსაზღვრა ჰაშიმოტოს დაავადების დროს

მარტა აფხაზავა
ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თვილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი,
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი,
ბიოლოგიის დეპარტამენტი, გენეტიკის კათედრა.
ელ ფოსტა: 7msmed7@gmail.com

სამაგისტრო ნაშრომის რეზიუმე
სამეცნიერო ხელმძღვანელები:
პროფესორი თეიმურაზ ლეჟავა;
ასისტენტ-პროფესორი მაია გაიოზიშვილი

გენომის ეპიგენეტიკური გარდაქმნები მიეკუთვნება სტაბილურ, მამკვიდრეობით და ამავდროულად შექცევად მოდიფიკაციას (6). ეპიგენეტიკკური პროცესები (განსაკუთრებით დნმ-ს და ქრომოსომათა მეთილირება) გარემო და გენეტიკურ ფაქტორებთან (გენომის არასტაბილურობის და სინთეზური პროცესების ცვალებადობის ჩათვლით) ერთობლიობაში წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფაქტორს მრავალი დაავადების, მათ შორის აუტოიმუნური თირეოიდიტის (ჰაშიმოტოს დაავადება) პათოგენეზის შესწავლაში (2,3). ჰაშიმოტოს დაავადების დროს დასაშვებია დნმ-ს მეთილირების ცვალებადობა (1). დაავადებების უმეტესობის დროს ყველა ეპიგენეტიკური ცვლილება, მათ შორის დნმ-ს საერთო მეთილირების ცვლილება ქსოვილსპეციფიურია - უპირატესად აღინიშნება პათოლოგიურ პროცესში ჩართულ ქსოვილებსა და უჯრედებში. მეთილირების ცვალებადობა რიგ შემთხვევაში გამოიხატება ჰომოცისტეინის დონის ვარირებით (8). ჰომოცისტეინის შემცველობა განსხვავებულია სხვადასხვა ეთნიკურ ჯგუფებში (7).
აუტოიმუნური თირეოიდიტი (ჰაშიმოტოს დაავადება) მსოფლიოში და მათ შორის საქართველოში ფართოდ გავრცელებული დაავადებაა მზარდი სიხშირით, რომელიც უპირატესად ვითარდება ქალებში. ჰაშიმოტოს ჩიყვის დროს, ორგანიზმის იმუნური სისტემა გამოიმუშავებს ანტისხეულებს საკუთარი ორგანოს - ფარისებრი ჯირკვლის მიმართ, რის შედეგად მისი ქსოვილი გაიჟღენთება ლეიკოციტებით, რომელთა მოქმედება იწვევს ჯირკვლის ანთებას - თირეოიდიტს (4, 5).
კვლევის აქტუალობას განსაზღვრავს ის ფაქტი, რომ ჰაშიმოტოს დაავადების გენეტიკური შესწავლა საქართველოში პირველად განხორციელდა.
კვლევის მიზანს წარმოადგენდა გენომის ეპიგენეტიკური ცვლილებების შესწავლა აუტოიმუნური თირეოიდიტით დაავადებულ საშუალო ასაკის (25-45 წლის) ქართული პოპულაციის წარმომადგენელ ქალბატონებში.
კვლევის ამოცანებს წარმოადგენდა:
- საერთო მეთილირების დონისა და ჰომოცისტეინის კონცენტრაციის დადგენა;
- ქრომოსომათა მუტაციების (აბერაციები, ანეუპლოიდია, პოლიპლოიდია, ფრაგილური საიტები) დონის განსაზღვრა;
- აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციების სიხშირის დადგენა და ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნების აქტივობის შეფასება ჰაშიმოტოს დაავადების დროს, ქართულ პოპულაციაში.

საწყის ეტაპზე, დიაგნოზის დაზუსტების მიზნით ჩატარდა შემდეგი კვლევები: პაციენტებში anti-TPO, anti-TG ანტისხეულების; TSH, fT_4, fT_3 ჰორმონებისა, კოაგულოგრამისა და ლიპიდური სპექტრის პარამეტრების, ასევე სხვა მაჩვენებლები განსაზღვრა;
კვლევის მასალად გამოყენებული იყო ჰაშიმოტოს თირეოიდიტით დაავადებულთა ვენური სისხლის შრატი და ლიმფოციტურ კულტურათა უჯრედები.
კვლევებში გამოიყენებოდა შემდეგი მეთოდები:
- დნმ-ს გამოყოფის მეთოდი;
- იმუნოფერმენტული მეთოდი (ELISA);

- ლიმფოციტების კულტივირების მეთოდი;
- მუტაციების აღრიცხვის მეთოდი;
- აკროცენტრულ ქრომოსომათა ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნების Ag-ბენდირების მეთოდი.

კლინიკური მონაცემებისა და ულტრასონოგრაფიის საფუძველზე პაციენტებს დაესვათ ზუსტი დიაგნოზი - ჰაშიმოტოს თირეოიდიტი, რის შემდეგაც მოხდა მათგან საკვლევი მასალის - ვენური სისხლის აღება და შრატისა და ლიმფოციტური კულტურების მიღება შემდგომი გენეტიკური კვლევებისათვის.

შემდეგ ეტაპზე მოხდა დნმ-ს მეთილირების საერთო დონისა და ჰომოცისტეინის კონცენტრაციის განსაზღვრა იმუნოფერმენტული ანალიზის (ELISA) საშუალებით. დნმ-ს მეთილირების განსაზღვრის პირველ ეტაპზე ლიმფოციტური კულტურიდან მოხდა დნმ-ს გამოყოფა DNA-extraction kit-ის საშუალებით.

დნმ-ს საერთო მეთილირების შედეგების ანალიზის საფუძველზე აღმოჩნდა, რომ აღნიშნული მაჩვენებელი მკვეთრად იყო დაქვეითებული ჰაშიმოტოს თირეოიდიტით დაავადებულ ყველა პაციენტში და შეადგინა საშუალოდ 5,45%, მაშინ, როცა აღნიშნული მაჩვენებელი კლინიკურად ჯანმრთელ ინდივიდებში იყო 13,92%. აღნიშნული შედეგი თანხვდება ლიტერატურულ მონაცემებს, სადაც მითითებულია დნმ-ს საერთო მეთილირების დონის დაქვეითება სხვა აუტოიმუნური დაავადებების შემთხვევაში, თუმცა აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ მსგავსი კვლევა - დნმ-ს ზოგადი მეთილირების დონის განსაზღვრა ჰაშიმოტოს დაავადების დროს არ ჩატარებულა.

რაც შეეხება ჰომოცისტეინის კონცენტრაციას, ყველა პაციენტის შემთხვევაში ეს მონაცემი შეესაბამებოდა ნორმას, თუმცა, ზოგ შემთხვევაში იყო ნორმის ზედა ზღვართან (პაციენტებში - 4.8-7.8μmol/l; ნორმა - 4.5-7.9μmol/l).

შემდეგ ეტაპზე ჩატარდა ქრომოსომათა სტრუქტურული (აბერაციები, ცნდ, ფრაგილური საიტები) და რაოდენობრივი (ანეუპლოიდია, პოლიპლოიდია) დარღვევების განსაზღვრა ჰაშიმოტოს დაავადების დროს. დადგინდა, რომ აღნიშნული დაავადების შემთხვევაში სარწმუნოდ არის გაზრდილი აბერანტული უჯრედებისა (პაციენტებში-6,9±1,1; კონტროლი-1,7±0.3) და პოლიპლოიდური უჯრედების სიხშირე (პაციენტებში-1,3±0,49; კონტროლი-0,1±0,01). სარწმუო განსხვავება არ დაფიქსირდა ანეუპლოდიის შემთხვევაში, რაც აიხსნება ასევე ცნდ-ს მქონე ქრომოსომების რაოდენობის უცვლელობით.

შევისწავლეთ ასევე ფრაგილური საიტების სიხშირე და განაწილება ჰაშიმოტოს დაავადების დროს. აღნიშნული ტესტის შედეგად დადგინდა, რომ ფრაგილური საიტების შემცველი უჯრედების რაოდენობა (%) სარწმუნოდ იყო მომატებული ჰაშიმოტოს თირეოიდიტით დაავადებულ პაციენტებში (71,5±1,98) კონტროლთან შედარებით (40,24±0,32). გაზრდილი იყო ასევე ფრაგილური საიტების რაოდენობა ერთ უჯრედზე. სპეციფიკა გამოვლინდა ფრაგილური საიტების განაწილების მიხედვით ქრომოსომულ ჯგუფებზე. აღნიშნული მაჩვენებელი გაზრდილი იყო E, F და G ჯგუფის ქრომოსომებზე.

სინთეზური პროცესების ინტენსივობის განსაზღვრის მიზნით გამოვიკვლიეთ Ag-დადებითი ქრომოსომების რაოდენობა და აკროცენტრული ქრომოსომების ასოციაციური აქტივობა. დადგინდა, რომ ჰაშიმოტოს თირეოიდიტით დაავადებულ პაციენტებში სარწმუნოდ იყო გაზრდილი როგორც ასოციაციების შემცველი მეტაფაზების რაოდენობა (პაციენტებში-80,24±2,28; კონტროლში-49,2±2,2), ასევე ერთ უჯრედზე ასოციაციების რიცხვი (პაციენტებში-2,07±0.05; კონტროლში-1,39±0,03) და ასოციაციაში შემავალი ქრომატიდების რაოდენობა ერთ უჯრედზე. ეს უკანასკნელი მომატებული იყო D ჯგუფის ქრომოსომების გააქტიურების ხარჯზე. სარწმუნოდ იყო გაზრდილი აქტიური ბირთვაკის ორგანიზატორიანი ქრომოსომების (როგორც 1 ქულიანი, ისე 2 ქულიანი) რაოდენობა (ჯამური: პაციენტებში-15,3±0.22; კონტროლში-7,62±0,16).

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე შესაძლებელია დავასკვნათ:

ჰაშიმოტოს თირეოიდიტით დაავადებული ინდივიდების ლიმფოციტურ კულტურათა უჯრედებში:

- შემცირებულია მეთილირების საერთო დონე, რაც თანხვდება ლიტერატურულ მონაცემებს აუტოიმუნური დაავადებების დროს მეთილირების ცვლილებასთან დაკავშირებით.
- გაზრდილია ქრომოსომული აბერაციებისა და პოლიპლოიდიის სიხშირე.
- მომატებულია ფრაგილური საიტების სიხშირე, რაც სპეციფიკურად E, F და G ჯგუფის ქრომოსომებზე აღნიშნული საიტების რაოდენობის მატებით გამოვლინდა.
- გაზრდილია: ასოციაციების შემცველი მეტაფაზების სიხშირე, ქრომატიდული ასოციაციებისა და 1 და 2 ქულიანი Ag დადებითი ქრომოსომების რაოდენობა უჯრედზე, რაც სინთეზური პროცესების ინტენსივობის ზრდაზე მიუთითებს.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Arakawa Y., et al., (2012) Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 170: 194–201
2. Haluskova J. Epigenetic studies in human diseases. Folia Biol (Praha) 2010; 56:83–96.
3. Kurdyukov, S. & Bullock, M. (2016). DNA methylation analysis: Choosing the right method. Biology. doi:10.3390/biology5010003.
4. Lezhava T.(2006). Human Chromosomes and Aging From 80 to 114 Years. Nova Science Publishers, ISBN: 1-60021-043-0
5. Menconi F, Oppenheim Y, Tomer Y. Grave's disease. In: Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin M, eds. Diagnostic criteria in autoimmune diseases. Totowa: Humana Press, 2008:231–5.
6. Robertson, K.D. (2005) DNA methylation and human disease.Nat. Rev. Genet. 6:597-610.
7. Shuxia Guo, et al. (2015) Ethnic Differences in the Prevalence of High Homocysteine Levels Among Low-Income Rural Kazakh and Uyghur Adults in Far Western China and Its Implications for Preventive Public Health. Int J Environ Res Public Health; 12(5): 5373–5385
8. Yi P, Melnyk S, et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. J Biol Chem 2000; 275:29318–23.