© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.248–053.2–056.7

А.В.Семенов, А.П.Пигалов, В.В.Семенов, Е.С.Кошпаева

НАРУШЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА У ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Казанский государственный медицинский университет

GENETIC HOMEOSTASIS DISORDERS IN BRONCHIAL ASTHMA CHILDREN

A.V.Semenov, A.P.Pigalov, V.V.Semenov, E.S.Koshpaeva

Summary

Genetic lesions of somatic cells (lymphocytes, erythrocytes, leukocytes, cheek epithelium cells) and bioliquids (blood plasma) in patients with various severity of atopic bronchial asthma and healthy children were studied using methods of chromosome aberration account in blood lymphocytes, analysis of micronuclei in blood erythrocytes and epithelial cells of the cheek internal surface, sedimentation velocity analysis of the leukocyte DNA integrity, chromosome aberration account in seeds of *Crepis capillaris.* Levels of lymphocyte chromosome aberrations and micronuclei in the erythrocytes and the cheek epithelium cells were higher in the asthmatic children than in healthy ones. Amount of the leukocyte DNA breaks in bronchial asthma children was also more than in healthy.

Experiments with the blood plasma of the asthmatic and non-asthmatic children revealed a tendency to increase a clastogenic activity as the plasma concentrations grew (50 and 100%). The plasma clastogenic activity in 25% of both the groups was not found. So, the metabolic disorders in asthmatic children were accompanied by occurrence of clastogenic factors in the cells and intercellular environment, decreasing in influence of antimutagenic systems and in elimination of aberrant cells.

Резюме

Генетические повреждения в соматических клетках (лимфоциты, эритроциты, буккальный эпителий, лейкоциты) и биожидкостях (плазма крови) у больных атопической бронхиальной астмой различной степени тяжести и здоровых детей изучали с использованием методов учета хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови, анализа уровня микроядер в эритроцитах периферической крови и клетках эпителия внутренней поверхности щек, седиментационного анализа целостности ДНК лейкоцитов, учета хромосомных аберраций на семенах *Crepis capillaris.* Уровень хромосомных аберраций в лимфоцитах, микроядер в эритроцитах и буккальных клетках у больных детей был значительно выше, чем у здоровых. Седиментационный анализ лейкоцитов показал наличие в молекуле ДНК больных большего числа разрывов, чем в молекулах ДНК здоровых детей.

Общей тенденцией в экспериментах с плазмой крови больных астмой и здоровых детей было увеличение кластогенного эффекта по мере возрастания концентрации плазмы (50 и 100%). У 25% детей обеих групп кластогенная активность плазмы крови не выявлена. Метаболические нарушения при атопической бронхиальной астме у детей сопровождаются формированием в клетках и межклеточной среде кластогенных факторов, снижением эффективности антимутагенных систем и нарушением элиминации аберрантных клеток.

Повреждения генетического аппарата при различных заболеваниях как наследственной, так и не наследственной этиологии можно подразделить на специфические, затрагивающие такие участки генома, которые определяют начало заболевания и формируют основные звенья его патогенеза, и неспецифические (вторичные) повреждения, появление которых связано с действием эндомутагенов — производных измененного метаболизма, сложившегося у больного в условиях патологии [1]. Увеличивающийся поток сообщений о неспецифических хромосомных повреждениях, обнаруженных при ряде хронических воспалительных заболеваний и инфекций [2–5], позволяет сделать предположение об универсальности этого явления [4]. В этом плане состояние генома у больных бронхиальной астмой (БА) не является исключением: у взрослых больных с высокой степенью достоверности выявлены повреждения хромосом в лимфоцитах периферической крови [6,7]. В то же время в доступной литературе мы не нашли публикаций, касающихся анализа генетического гомеостаза у больных детей. Однако физиологические особенности детского

организма (низкая фильтрационная способность клубочков почек, повышенная проницаемость слизистых оболочек, частые гиповитаминозы и т.д.), затрудняющие нейтрализацию и элиминацию из организма кластогенных факторов (КФ), позволяют уже *a priori* предполагать наличие неспецифических повреждений в генетическом аппарате. В этом случае ферментативные нарушения могут наблюдаться в самых неожиданных биохимических звеньях метаболизма больного, в том числе и таких, которые определяют резистентность организма к заболеванию или являются мишенью специфической лекарственной терапии. С этих позиций восстановление нормального генетического статуса у больных БА становится одной из важных задача в разработке тактики комплексного лечения заболевания.

Целью нашего исследования было определить вероятность повреждения генома у детей больных БА, теоретически обосновать пусковые механизмы таких нарушений, поставить вопрос о необходимости включения в комплексное лечение фармакологических средств, защищающих генетические структуры больных детей от повреждений.

Материалы и методы

Обследовано 168 детей в возрасте 7–14 лет (табл.1), из них 115 детей находились на лечении в стационаре с диагнозом атопической форма бронхиальной астмы различной степени тяжести. Группа сравнения состояла из 53 здоровых детей без аллергических заболеваний и семейной отягощенности в анамнезе, проходившие диспансерный осмотр в соответствие с приказом Минздрава РФ № 151 от 07.05.98 "О временных отраслевых стандартах и объемах медицинской помощи". Сравниваемые группы детей проживали на одной территории, с одинаковыми экологическими условиями. Клинико-лабораторная диагностика и лечение БА основывались на рекомендательном документе — Национальной программы "Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика" (1997 г.).

Учет хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови осуществляли по протоколу [8].

Анализ уровня микроядер в эритроцитах периферической крови больных проводили согласно [9] с учетом рекомендаций [3].

Микроядра в слущенных клетках эпителия внутренней поверхности щек регистрировали в соответствии с рекомендациями [10].

Целостность ДНК определяли методом седиментационного анализа в лейкоцитах крови здоровых и больных детей. Суспензию лейкоцитов (50 мкл, 2–5 $\cdot 10^5$ клеток) наслаивали на поверхность лизирующего раствора (1,95 М NaCl; 0,01 М ЭДТА; 2,0 мМ трис HCl; 0,05% тритон X-100 pH 7,8), флотирующих поверх градиента сахарозы 5–20%, содержащей 1,95 М NaCl; 0,001 М ЭДТА; 0,01 М трис HCl; pH 8,0. Через 25 мин после наслоения материала на лизирующий раствор производили ультрацентрифугирование — 30 мин, 90 000 *g*. Положение ДНК в градиенте концентрации сахарозы оценивали по оптическому поглощению при 250 нм в ячейке оптической системы с самописцем фирмы "*Farmacia*". О седиментационной подвижности ДНК судили по расстоянию, пройденному в градиенте плотности сахарозы. Расстояние измеряли в сантиметрах на диаграммной ленте от мениска до середины пика и выражали в процентах. Расстояние мениск–пик здоровых детей брали за 100%.

Кластогенный эффект различных разведений плазмы крови детей оценивали по индукции хромосомных аберраций в клетках меристемы проростков семян *Crepis capillaris,* согласно методическим указаниям [11]. Фактор связывания кластогена с компонентами плазмы рассчитывали по коэффициенту соотношения кластогенной активности (K_0) различных разведений опытных и контрольных образцов биожидкостей в абсолютных цифрах. Величина $K_0>1$ свидетельствовала о наличии в плазме крови связанного кластогена.

Во всех случаях пробы отбирались в первые дни поступления больных в клинику, до назначения лекарственных препаратов.

Статистическую обработку данных проводили с применением программы *Microsoft Excel 7.0* при сравнении данных опытных и контрольных серий использовали *t*-критерий Стьюдента.

Таблица 1

Обследуемые дети

Группа детей	Объект исследования					Итого
	хромосомные аберрации лимфоцитов	микроядра эритроцитов	микроядра буккального эпителия	разрывы нитей ДНК	хромосомные аберрации в клетках *Crepis capillaris*	
Контрольная группа	17	11	12	4	9	53
Группа больных БА	58	24	16	4	13	115
Всего...	75	35	28	8	22	168

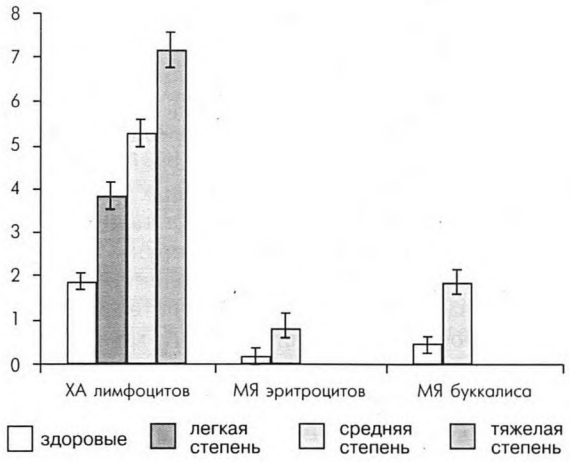

Рис. Уровень хромосомных аберраций (ХА) в лимфоцитах и уровень микроядер (МЯ) в эритроцитах и буккальных клетках здоровых и больных детей БА.

Результаты

Уровень хромосомных аберраций в лимфоцитах, количество микроядер в эритроцитах и клетках буккального эпителия при разной степени заболеваниях у детей достоверно превышали контрольные значения и зависел от степени тяжести болезни (см.рисунок). В группе больных легкой степени тяжести уровень хромосомных аберраций в лимфоцитах был выше в 2 раза, у детей со средней тяжестью — в 2,8 раза и при тяжелой форме — в 3,8 раза.

Скорость седиментации молекул ДНК из лейкоцитов у детей больных БА средней степени тяжести достоверно меньше, чем у здоровых. Последнее позволяет сделать заключение о наличие в молекуле ДНК больных БА большего числа разрывов.

Определение кластогенной активности различных разведений плазмы крови здоровых и больных детей показало, что в концентрациях 100 и 50% сохраняется кластогенная активность биожидкостей, но при 25% разведении кластогенная активность плазмы крови биожидкостью больных БА и здоровых детей, не различался (табл.2). Расчет коэффициента K_0 у детей с астмой показал, что в опытах с цельной плазмой он равен 1,07, при 50% разведении — 1,26, а при разведении до 25% — 1,38. Такая тенденция коэффициента к увеличению по мере разведения биосубстратов косвенно свидетельствует, что в плазме крови больных детей кластогенные факторы в значительной степени находятся в связанном состоянии.

Обсуждение результатов

Установлено, что у детей, больных атопической формой БА увеличено число хромосомных аберраций, микроядер и разрывов ДНК в самых различных клетках организма, повышена кластогенная активность плазмы крови. Это свидетельствует не только о существенном повреждении генетического аппарата больных, но и о его генерализованном характере. Высокий уровень хромосомных аберраций при астме может зависеть от множества факторов, однако наиболее существенными среди них, на наш взгляд, являются повышенная генерация эндогенных кластогенов; ослабление антимутагенных систем защиты генома, нарушения в системе элиминации аберрантных клеток. Для обсуждения первой группы факто-

Таблица 2

Кластогенная активность плазмы крови здоровых детей и больных бронхиальной астмой средней степени тяжести в клетках *Crepis capillaris*

Концентрация плазмы, (%)	Число просмотренных метафаз в группе	Число аберрации хромосом в группе	Частота аберраций *M±m*, %	*p*
Контроль (вода)	518	5	0,97±0,43	
		Здоровые		
100	9 252	369	3,99±0,2	<0,001*
50	5 319	135	2,54±0,22	<0,001*
25	4 554	54	1,19±0,16	>0,05*
		Больные		
100	14 261	572	4,01±0,16 >0,05**	<0,001*
50	8 099	208	2,57±0,18 >0,05**	<0,001*
25	12 844	156	1,21±0,1 >0,05**	>0,05*

Примечание. * — по отношению к воде, ** — по отношению к аналогичному разведению плазмы здоровых детей.

ров предлагаются данные табл.3, в которой на основании собственных данных и данных литературы представлены возможные метаболические цепочки, способные генерировать эндомутагены. Цепочка представлена в основном тремя элементами: эндомутаген — генерирующая эндомутаген клетка (тучная клетка, эозинофил и т.д.) — цитокин, модулирующий активность клетки-генератора. В условиях нормального метаболизма эти цепочки выполняют жизненно важные функции, уровень формируемых в них эндомутагенов незначителен и находится под контролем антимутагенных систем, благодаря чему они не представляют существенной угрозы для генома. При заболевании БА работа этих звеньев нарушается, увеличивается образование эндомутагенов и как следствие формируются первичные повреждения ДНК.

Приведем пример. Ключевой структурой развития аллергии и воспаления при БА являются Th2-лимфоциты [12,13]. Повышенная экспрессия в них генов, контролирующих синтез IL-4 и IL-5 [14], приводит к аутокринной активации Th2 (IL-4) и активации эозинофилов (IL-5). В последних повышается активность липооксигеназ и циклооксигеназ — ферментов, при работе которых образуются сильные мутагены: АФК и их производные. Одновременно IL-4 переключает В-клетки на синтез IgE, который способствует высвобождению из тучных клеток другого опасного мутагена — гистамина, а также не лимфоцитарного IL-4. Последний, активируя Th2, замыкает патогенетическую цепочку. Это элементарная самоподдерживающая кластогенная система. Основываясь на особенностях патогенеза БА, можно привести еще целый ряд более сложных систем, активно функционирующих при этом заболевании и являющихся источником эндомутагенов в самых различных органах и тканях больного. Что касается второй группы факторов, то немало сведений о том, что у больных БА существенно ослаблена антимутагенная система защиты генома. Это прежде всего связано с изменением интенсивности внепланового синтеза ДНК, нарушением в первичном звене антиоксидант-

Таблица 3

Кластогенные факторы при аллергическом воспалении: место образования, активаторы и генерирующие системы

Место генерации КФ	Кластогенные факторы	Ферментативные системы, обеспечивающие образование КФ	Факторы клеточной активации
		Клетки-мишени первого порядка	
Тучные клетки	Гистамин, супероксиданион-радикал	Декарбоксилирование гистидина Окислительные реакции с участием циклооксигеназ и липооксигеназ	IgE, HRF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-15
Базофилы крови	Гистамин, супероксиданион-радикал	Декарбоксилирование гистидина Окислительные реакции с участием липооксигеназ	IgE, GM-CSF, ЛТD4, IL-1, IL-3, IL-5, IL-8
		Клетки-мишени второго порядка	
Нейтрофилы	Супероксиданион-радикал, гипохлорит	Окислительные реакции с участием липооксигеназ, миелопероксидаз	PAF, TNF-α, ТВ4, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15
Эозинофилы	Супероксид, гидроксильный радикал, гидропероксид водорода, гидроперекиси, малоновый диальдегид и др.	Окислительные реакции с участием циклооксигеназ и липооксигеназ, перекисное окисление липидов	IgE, PAF, ЛТВ4, GM-CSF EAF, субстанция Р, ЭХФ-А-пептид, IFN-γ, β, IL-2, IL-3, IL-5
Тромбоциты	То же	Окислительные реакции с участием циклооксигеназ и липооксигеназ (метаболизм липидных медиаторов), перекисное окисление липидов	IgE, PAF, ЛТВ4, GM-CSF, IFN-β, субстанция Р, ЭХФ-А-пептид, IL-3, IL-5
Моноциты/ макрофаги	Супероксиданион-радикал, гидроксильный радикал, гидропероксид водорода, гипохлорит, оксид азота	"Дыхательный взрыв" с участием NADH-оксидаз, миелопероксидаз, NO-синтаз. Окислительные реакции с участием циклооксигеназ и липооксигеназ	IgE, PAF, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, β, ЛТD4, IL-3, IL-1, IL-7
Th1	Оксид азота	Окислительные процессы с участием NO-синтаз	IgE, TNF-α, IFN-γ, β, IL-1, IL-4, IL-12, IL-13
Межклеточная среда	АФК	Автоокисление адреналина	Факторы, разрушающие тромбоциты

ной защиты, снижением (вплоть до полного исчезновения) уровня метаболитов-антимутагенов, уменьшением числа адренорецепторов, снижением уровня цАМФ в тучных клетках, эозинофилах, нейтрофилах и эпителиальных клетках дыхательных путей [12, 13,15]. И наконец, третья группа факторов, провоцирующая высокий уровень кластогенеза, связана с нарушениями в системе элиминации аберрантных клеток: в клетках существенно подавлен апоптоз, снижена эффективность иммунного надзора, изменен объем экстравазации и т.д. [3,12,13].

В заключение необходимо отметить, что зарегистрированные в наших исследования генетические нарушения в клетках и тканях больных БА являются серьезным основанием для введения в комплексное лечение больных БА фармакологических средств защиты генома. Имеющиеся в этом направлении разработки подтверждают целесообразность применения у больных БА такой тактики лечения [2,5].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека. М: Мир; 1990; т.1.
2. *Дурнев А.Д., Середенин С.Б.* Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. М: Медицина; 1998.
3. *Ильинских Н.Н., Медведев М.А., Бессуднова С.С., Ильинских И.Н.* Мутагенез при различных функциональных состояниях организма. Томск: ТГУ; 1990.
4. *Семенов В.В.* Возможности лекарственной коррекции повреждений хромосом в соматических клетках. В кн.: Научно-практическая конф. педиатров России "Фармакотерапия и фармакогенетика в педиатрии". М.; 2000.
5. *Черепнев Г.В., Малышев К.В., Слабнов Ю.Д. и др.* Потенциальная роль антимутагенного эффекта препарата ксимедона в модификации иммунореактивности. Экспер. и клин. фармакол. 2000; 63 (6): 43–48.
6. *Буторина О.К., Абрамова З.И., Семенов В.В. и др.* Одно- и двунитевые разрывы ДНК в лейкоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой. В кн.: Генетика человека и патология. Томск: ТГУ; 1992. 53–54.
7. *Lintsov A.E., Pleskach N.M., Usiontsev B.M. et al.* The cytogenetic action of antilymphocyte globulin on the lymphocytes of bronchial asthma patients. Tsitologia 1990; 32 (1): 156–160.
8. *Бочков Н.П., Филиппова Т.В., Яковенко К.Н.* Принципы цитогенетического обследования для выявления профессиональных вредностей. Цитология и генетика 1984; 6: 422–428.
9. *Stich H.F., Curtis J.R., Parida B.D.* Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. Int. J. Cancer 1982; 30: 553–559.
10. *Жулева Л.Ю., Умнова Н.В., Румак В.С.* Регистрация микроядер в слущивающихся клетках слизистой ротовой полости человека на территории Южного Вьетнама. Генетика 1996; 32 (12): 1700–1704.
11. *Семенов В.В., Кошпаева Е.С., Семенов А.В.* Оценка антимутагенной активности веществ на *Crepis capillaris* в скрининговых исследованиях. Казань: КГМУ; 2000.
12. *Каганов С.Ю.* (ред.) Бронхиальная астма у детей. М.: Медицина; 1999.
13. *Чучалин А.Г.* (ред.) Бронхиальная астма. М.: Агар; 1997; т.1,2.
14. *Svjatkina O. et al.* Increased production of IL-4 and IL-5 in children with atopic asthma and dermatitis. Allergy 1997; 51 (suppl.): 340.
15. *Davies K.I.A.* Proteolytic systems as secondary antioxidant defenses. In: Crow C.K., ed. Cellular antioxidant defence mechanism. Boca Raton, FL: CRC; 1988. 25–67.

Поступила 18.07.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616/248–07:[616.155/32+616.155.34]–076

Л.В.Рябова, Т.В.Гавриш, С.И.Комар, С.Н.Теплова, Е.А.Крашенинникова, Н.А.Алексеев

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Городская клиническая больница № 1, Челябинская государственная медицинская академия

LYMPHOCYTE POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS AND NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

L.V.Ryabova, T.V.Gavrish, S.I.Komar, S.N.Teplova, E.A.Krasheninnikova, N.A.Aleksejev

Summary

This work is devoted to population spectrum of lymphocytes and oxigen-dependent metabolism of neutrophils in 140 moderate persisting asthma patients of young, middle and old ages. Markers of persisting inflammation such as increased levels of immunoglobulin E and circulating immune complexes, considerable activation of spontaneous and induced NST-test, increased in elderly, various shifts in lymphocyte populations and subpopulations were revealed in all the groups. These features require additional attention of a doctor and special therapeutic measures.