

дельных методов, но в основном они сводятся к следующему: 1) полностью или частично восстанавливается глюкокортикоидная активность надпочечников (Н. Н. Зубцовская, В. И. Трофимов и др.), 2) улучшается вегетативная нервная регуляция просвета бронхов (Е. П. Успенская, К. М. Сергеева), 3) улучшаются функциональные характеристики иммунной системы (И. В. Походзей, В. И. Немцов и др.), 4) полностью

или частично нормализуются уровни биологически активных веществ в крови, 5) улучшается переносимость физической нагрузки, гипоксии, легче переносится обструкция бронхов (Д. Т. Мамедов).

Все это вселяет в нас уверенность, что избранное нами направление по развитию немедикаментозных методов лечения больных БА перспективно и заслуживает самого пристального внимания.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.248-092

*Г. Б. Федосеев, А. Е. Линцов, Б. М. Услонцев, Н. М. Плескач,
В. В. Прокофьева, В. М. Михельсон*

АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Санкт-Петербургский медицинский институт им. акад. И. П. Павлова, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

ANALYSIS OF CYTOGENETIC HOMOEOSTASIS DAMAGES IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

G. B. Fedoseev, A. E. Lintsov, B. M. Uslontsev, N. M. Pleskach, V. V. Prokofyeva, V. M. Mikhelson

Summary

The authors describes the results of cytogenetic assay which included the count of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCE) in peripheral blood lymphocytes of 65 patients with bronchial asthma. The significant elevation of chromosomal aberration levels and SCE frequencies in patients was revealed as compared to healthy individuals. The rate of cytogenetic alterations was established with dependence on clinical and pathogenic types of the disease. It was shown that the therapy with oral corticosteroids does not cause any significant genotoxic effect in the examined patients. Possible mechanisms for chromosomal damages in cells of asthmatic patients are discussed.

Резюме

Авторы описывают результаты цитогенетического анализа, включавшего учет хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов (СХО), в лимфоцитах периферической крови 65 больных бронхиальной астмой. Было выявлено достоверное повышение уровня хромосомных aberrаций и частоты СХО у больных по сравнению со здоровыми индивидуумами. Установлена зависимость выраженности цитогенетических изменений от клинико-патогенетических вариантов заболевания. Показано, что терапия пероральными кортикостероидами не оказывает сколько-нибудь существенного генотоксического действия у обследованных больных. Обсуждаются возможные механизмы хромосомных нарушений в клетках больных бронхиальной астмой.

Среди вопросов изучения субклеточных механизмов патогенеза бронхиальной астмы (БА) наименее освещенным аспектом остаются нарушения цитогенетического гомеостаза при данной патологии. В настоящее время имеются сведения о повышении частоты спонтанных хромосомных aberrаций (ХА) и сестринских хроматидных обменов (СХО) в клетках больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких, аллергическими заболеваниями [5, 8]. Вместе с тем практически не изучены особенности цитогенетических изменений при БА. Такого рода исследования могут представлять интерес прежде всего

в плане значения мутационных перестроек как индикатора риска канцеро- и тератогенеза [7, 11], а также с позиций представлений о цитогенетическом гомеостазе как отражении функционального состояния организма и, в частности, Т-системы иммунитета [2, 3].

Исходя из вышеизложенного, целью работы было изучить показатели цитогенетического гомеостаза, включая уровни ХА и СХО в лимфоцитах, у больных БА.

Обследовано 65 больных БА, в том числе 18 мужчин и 47 женщин, в возрасте 15—67 лет (в среднем $41,5 \pm 2,0$ года). Клинико-патогенети-

Частота ХА и СХО у практически здоровых индивидуумов и у больных БА с учетом ведущего клинико-патогенетического варианта и фазы течения заболевания ($M \pm m$)

Показатели	n	Здоровые	n	Больные БА	p ₁	n	АБА	n	ИЗБА	p ₂
Частота ХА, %	20	1,2±0,21	70	7,1±0,39	<0,001	18 18	9,0±0,83*** 4,7±0,52	20 14	8,3±0,67* 6,3±0,55	>0,05 <0,05
Частота СХО, обменов на 1 клетку	20	6,1±0,19	69	10,0±0,39	<0,001	18 19	13,3±0,62*** 7,4±0,44	20 12	10,3±0,59** 8,4±0,53	<0,005 >0,05

Примечание. В числителе — показатели, полученные в фазе обострения, в знаменателе — в фазе ремиссии. Достоверность различий: p₁ — между показателями лиц контрольной группы и больных БА; p₂ — между показателями больных АБА и ИЗБА; звездочка — между показателями, полученными в фазе обострения и ремиссии (одна звездочка — p<0,05, две — p<0,005, три — p<0,001). n — число наблюдений.

ческие варианты и тяжесть течения БА диагностировали по классификации А. Д. Адо и П. К. Булатова, дополненной Г. Б. Федосеевым [9]. Преимущественно атопическая БА (АБА) диагностирована у 32 больных, инфекционно-зависимая БА (ИЗБА) — у 33. Легкое течение БА отмечалось у 10, средней тяжести — у 37, тяжелое — у 18 пациентов. Повторно, с учетом фазы заболевания, обследовано 6 человек, то есть в разработку вошло 71 наблюдение. Обострение и затихающее обострение констатировано у 38 больных, у 33 обследованных заболевание было в фазе ремиссии. Традиционная комплексная терапия включала метилксантины (55 чел.), ингаляционные симпатомиметики (42 чел.), а также стабилизаторы мембран тучных клеток, антагонисты кальция, муколитические средства. Больным ИЗБА по показаниям назначали антибактериальную терапию. Глюкокортикоидные препараты перорально, в том числе преднизолон, триамцинолон (кенакорт и полькортолон) получали 25 пациентов. Короткие курсы внутривенных инъекций глюкокортикоидов (гидрокортизон, преднизолон, дексазон) назначались 30 обследованным. Ингаляционные стероиды (бекломет, бекотид) применялись в лечении 28 больных.

Контрольную группу составили 13 практически здоровых лиц (5 мужчин и 8 женщин) в возрасте 15—56 лет (в среднем 35,1 года). С учетом повторных обследований в целом в контрольную группу вошло 20 наблюдений.

Кровь для исследований (капиллярную или венозную) получали утром в одно и то же время в условиях относительного покоя. Использован метод микрокультуры лимфоцитов периферической крови. Кровь в количестве 0,2 мл вносилась в 3 мл культуральной среды (3/4 среды RPMI 1640 с добавлением глутамина, 1/4 инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, 0,01 мл ФГА Difco Р). Для дифференциации сестринских хроматид через 24 ч после стимуляции лимфоцитов в культуры добавлялся 5-бромдезоксипуридин в концентрации 10 мкг/мл. Колцемид вводился за 3—4 часа до фиксации клеток. Клетки фиксировали на 68—70-м часу культивирования по общепринятой методике смесью абсолют-

ного этанола и ледяной уксусной кислоты. Препараты окрашивали модифицированным методом А. Н. Чеботарева с соавт. [10]. Для учета ХА в клетках больных в каждом наблюдении анализировалось 200 (в отдельных случаях — 100) метафазных пластинок, для здоровых индивидуумов — 200—300 метафазных пластинок первых митозов. СХО учитывали в каждом исследовании по 50 (в некоторых наблюдениях — не менее 26) метафазным пластинкам вторых митозов.

Для статистической обработки результатов исследований использовали t-критерий Стьюдента. Достоверность различий считали установленной при p<0,05.

Результаты выполненных исследований показали достоверно более высокие уровни как ХА, так и СХО в лимфоцитах больных БА по сравнению с контрольной группой практически здоровых людей (табл. 1). При этом у больных с различными клинико-патогенетическими вариантами БА нарушения цитогенетического гомеостаза были выражены неодинаково. Оказалось, что в фазе обострения БА частота СХА в клетках больных преимущественно АБА достоверно выше, чем при ИЗБА. В фазе ремиссии уровень ХА был при ИЗБА существенно более высоким, чем при АБА. Вместе с тем не обнаружено значимых различий по частоте ХА в лимфоцитах больных с ведущим атопическим и инфекционно-зависимым клинико-патогенетическим вариантом БА при обследовании в фазе обострения. Независимо от ведущего клинико-патогенетического варианта, высоко достоверные различия выявлены как по уровню ХА, так и по частоте СХО в лимфоцитах пациентов, обследованных в фазе обострения и ремиссии (см. табл. 1).

Для оценки возможного влияния терапии глюкокортикостероидами на показатели цитогенетического гомеостаза проанализирована частота ХА и СХО в лимфоцитах больных, получавших перорально гормональную терапию. В группу сравнения вошли больные с тяжелым и среднетяжелым течением БА, не принимавшие таблетированных глюкокортикоидов. Как видно из табл. 2, частота ХА в клетках больных, получавших глюкокортикоидную терапию, независимо от дозы,

Частота ХА и СХО у больных БА, получавших перорально терапию глюкокортикостероидами ($M \pm m$)

Показатели	n	Сравнительная группа больных БА	Группа больных, получавших терапию глюкокортикостероидами						p
			n	Группа в целом	n	Получавшие до 2 таблеток в сутки	n	Получавшие до 2—6 таблеток в сутки	
Частота ХА, %	35	$8,0 \pm 0,56$	24	$7,5 \pm 0,55$	12	$7,2 \pm 0,91$	12	$7,8 \pm 0,64$	$>0,05$
Частота СХО, обменов на 1 клетку	34	$11,3 \pm 0,59$	25	$9,3 \pm 0,52^*$	13	$8,3 \pm 0,63^{**}$	12	$10,3 \pm 0,75$	$<0,05$

Примечание. Достоверность различий: звездочка — между показателями больных, получавших терапию глюкокортикостероидами (группа в целом), и больных сравнительной группы (одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$); p — между показателями больных, получавших до 2 таблеток, и больных, получавших более 2 (до 6) таблеток глюкокортикостероидов в сутки. n — число наблюдений.

существенно не отличалась от значений в сравнительной группе пациентов. В то же время уровень СХО у больных, принимавших до 2 таблеток глюкокортикоидов в сутки, оказался достоверно ниже значений, установленных в клетках обследованных, не получавших данной терапии. При суточной дозе глюкокортикоидов более 2 (до 6) таблеток установлена значимо более высокая частота СХО, чем при приеме меньших доз, но не отличающаяся существенно от таковой в группе сравнения.

Итак, у больных БА выявлены существенные нарушения цитогенетического гомеостаза. Эти данные подтверждают обоснованность, в том числе и с цитогенетических позиций, применения в комплексном лечении больных БА антиоксидантных средств, оказывающих протективное влияние на генетический аппарат клеток [15].

Есть основания полагать, что обнаруженные в клетках больных БА хромосомные перестройки не могут объясняться влиянием на генетический аппарат проводимой терапии. Показано [12], что достоверное цитогенетическое действие теофиллиновых производных проявляется при воздействии на клетки доз, существенно превышающих таковые, используемые в клинической практике. Глюкокортикоидная терапия, как показали результаты, в частности, настоящего исследования, не влияла значимо на изучавшиеся цитогенетические показатели. Более того, малые (до двух таблеток в сутки преднизолона и триамцинолона) дозы глюкокортикоидов способствовали достоверному снижению частоты СХО в лимфоцитах, что, вероятно, объясняется прежде всего стабилизирующим влиянием на лизосомальные мембраны [2]. Наконец, продемонстрировано значительное повышение частоты ХА у больных аллергическими заболеваниями, обследованных до начала терапии [5]. Следует, однако, подчеркнуть, что вышеизложенное не ставит под сомнение необходимость и важность контроля цитогенетического действия отдельных видов терапии.

Среди факторов, способных участвовать в формировании цитогенетических изменений, в том числе при БА, могут быть, как нам представляется, выделены следующие: влияние инфекции,

включая прямое цитогенетическое действие вирусов, а также косвенные эффекты бактериальных и вирусных агентов [2, 8]; повышенный выброс медиаторов воспаления [4]; эндокринные нарушения, в частности глюкокортикоидная недостаточность, дисбаланс половых гормонов [2, 14]; количественная и функциональная недостаточность клеточного звена иммунитета [3, 4]; интенсификация перекисного окисления липидов и депрессия антиоксидантной защиты [13, 15].

Роль и значение перечисленных факторов в патогенезе БА в настоящее время установлены [9]. Названные выше и, возможно, некоторые другие гомеостатические нарушения, связанные с заболеванием, способны прямо или косвенно влиять на репарацию ДНК. В литературе имеются сообщения, обращающие внимание на сопряженность цитогенетических перестроек с нарушением процессов репарации и репликации ДНК [1, 8]. Активность указанных внутриклеточных систем сама по себе отражает функциональное состояние иммуноцитов. Кроме того, концепция иммунологического контроля цитогенетического гомеостаза рассматривает уровень хромосомных нарушений во взаимосвязи с активностью Т-клеточного иммунитета [3, 4]. Это согласуется с данными о сопряженности клинической эффективности иммунокоррекции с уменьшением уровня структурных мутаций хромосом в лимфоцитах [6]. Иными словами, речь может идти об определенном патогенетическом значении изменений цитогенетического гомеостаза у больных БА. В плане решения вопроса о возможной первичности выявленных при БА хромосомных нарушений представляется перспективным, особенно с точки зрения прогностических возможностей, изучение показателей цитогенетического гомеостаза, включая ДНК-репаративную способность клеток, у кровных родственников больных.

Таким образом, обнаружены существенные нарушения цитогенетического гомеостаза у больных БА, заключающиеся в достоверном повышении уровня спонтанных ХА и СХО в лимфоцитах по сравнению со значениями в клетках здоровых лиц, показана зависимость этих нарушений от ведущего клинко-патогенетического варианта и

фазы течения заболевания. Установлено, что глюкокортикоидные препараты — преднизолон и триамцинолон — в суточной дозе до 30 и 24 мг соответственно не вызывают у больных обследованной группы сколько-нибудь выраженного гено-токсического действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Засухина Г. Д., Сура В. В., Алехина Н. И. и др. Хромосомная нестабильность, связанная с нарушением процессов репликации и репарации синтеза ДНК, в клетках больных подагрической нефропатией // Генетика.— 1988.— Т. 24, № 6.— С. 1098—1104.
2. Ильинских Н. Н., Бочаров Е. Ф., Ильинских И. Н. Инфекционный мутагенез.— Новосибирск: Наука, 1984.
3. Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Бочаров Е. Ф. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет.— Новосибирск: Наука, 1986.
4. Ильинских Н. Н. Биологические факторы мутагенеза у человека // Генетика человека и патология.— Томск, 1989.— С. 68—69.
5. Керкис Ю. Я., Скорова С. В. Хромосомные нарушения в лейкоцитах у больных аллергией // Бюл. exper. биол.— 1974.— № 3.— С. 101—103.
6. Линцов А. Е. Анализ цитогенетического действия иммуномодулирующей терапии у больных бронхиальной астмой: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— СПб., 1992.
7. Михельсон В. М. Дефекты репарации ДНК и хромосом при наследственных заболеваниях человека // Успехи соврем. генет.— 1979.— № 8.— С. 51—83.

8. Умнова Н. В., Москалева Е. Ю., Порошенко Г. Г. Участие процессов репарации ДНК в изменении частоты сестринских хроматидных обменов в лимфоцитах периферической крови при воспалительных заболеваниях // Бюл. exper. биол.— 1986.— № 12.— С. 743—745.
9. Федосеев Г. Б., Хлопотова Г. П. Бронхиальная астма.— Л.: Медицина, 1988.
10. Чеботарев А. Н., Селезнева Т. Г., Платонова В. И. Модифицированный метод дифференциальной окраски сестринских хроматид // Бюл. exper. биол.— 1978.— № 2.— С. 242—243.
11. Barrios L., Caballin M. R., Miro R. et al. Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from untreated Hodgkin's patients. A possible evidence for chromosome instability // Hum. Genet.— 1988.— Vol. 78, N 4.— P. 320—324.
12. Day P., Shalaby Z., Cohen M. M. et al. Effects of theophylline on chromosomal breakage and sister-chromatid exchange // Mutat. Res.— 1989.— Vol. 224, N 4.— P. 409—413.
13. Emerit I. Chromosomal instability in collagen disease // Z. Rheumatol.— 1980.— Bd. 39, N 3—4.— S. 84—90.
14. Ghosh R., Ghosh P. K. Sister chromatid exchanges in the lymphocytes of control women, pregnant women and women taking oral contraceptives: effects of cell culture temperature // Environ. Mol. Mutagenes.— 1988.— Vol. 12, N 2.— P. 179—183.
15. Topinka J., Binkova B., Sram R. J., Erin A. N. The influence of α -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes // Mutat. Res.— 1989.— Vol. 225, N 3.— P. 131—136.

Поступила 05.05.93

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК [616.24-002.282+616.235-002]-092

Т. П. Сесь, И. В. Походзей, А. Г. Булычев, Е. А. Леонтьева

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ И ИДИОПАТИЧЕСКОГО ФИБРОЗИРУЮЩЕГО АЛЬВЕОЛИТА

Государственный научный центр пульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург

IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PATHOGENESIS OF CRYPTOGENIC FIBROSING ALVEOLITIS AND SARCOIDOSIS

T. P. Ses, I. V. Pochodsey, A. G. Bulychev, E. A. Leonteva

Summary

Immunological and biochemical parameters such as: Interleukin 1 and 2 (IL-1, IL-2), prostaglandin E and F2alpha levels, subpopulations of T-lymphocytes, the activity of elastase and collagenase were studied in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis and pulmonary sarcoidosis.

It was found that the immunoreactivity of the patients is characterized by high levels of the IL-1 and IL-2 activity and the T-lymphocyte subpopulation disbalance. High levels of elastase and collagenase in bronchoalveolar fluid in these patients were detected.

Резюме

Иммунологические и биохимические параметры, такие как уровни интерлейкина 1 и 2 (IL-1, IL-2), простагландина Е и F2alpha, субпопуляции Т-лимфоцитов, активность эластазы и коллагеназы, исследовались у пациентов с криптогенным фиброзирующим альвеолитом и легочным саркоидозом.

Было найдено, что иммунореактивность данных пациентов характеризуется высокими уровнями IL-1 и IL-2 активности и дисбалансом субпопуляций Т-лимфоцитов. Высокие уровни эластазы и коллагеназы были обнаружены в бронхоальвеолярной жидкости у этих пациентов.