

УДК 576

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

А.С. Водунон, Н.А. Пономарева, З.И. Абрамова

Аннотация

Проведено исследование цитогенетической нестабильности эритроцитов больных атопической бронхиальной астмой (АБА). Обнаружено увеличение количества эритроцитов с микроядрами в периферической крови у больных АБА, это увеличение было прямо пропорционально степени тяжести заболевания. Образование микроядер может быть связано с повышением уровня эндомутагенеза в организме больных АБА и, вероятно, выполняет определенную роль в регуляции процесса апоптоза.

Ключевые слова: анеугенез, микроядра, эритроциты, атопическая бронхиальная астма.

Введение

Генетические повреждения являются результатом хромосомных aberrаций, и приводят к образованию микроядер, которые, в свою очередь, служат показателем разных типов нарушений. Появление хромосомных нарушений на уровне клеточной популяции является источником непрерывной и самообновляющейся изменчивости, которая может предшествовать развитию опухолевого процесса в организме [1, 2]. Для оценки мутагенеза в качестве средства принято использовать частоту спонтанного мутагенеза [3, 4]. Микроядра представляют собой цитоплазматические хроматин-содержащие тела, которые формируются, если ацентрические хромосомные фрагменты или хромосомы запаздывают во время анафазы и неудачным образом соединяются в ядрах дочерних клеток в ходе клеточного деления [5]. Микроядерный анализ оценен как удобный метод, позволяющий определить наличие или отсутствие цитогенотоксичности, а также мутагенности различных соединений. Это дает основание полагать, что все факторы, способные вызывать двунитевые хромосомные разрывы, по существу, стимулируют образование микроядер. К настоящему времени учет микроядер *in vitro*, по мнению исследователей, стал возможен в большинстве популяций делящихся клеток, где можно регистрировать клетки, претерпевшие первый митоз, и точно идентифицировать время возникновения микроядер, так как повышение уровня микроядер в лимфоцитах периферической крови, возникающее в результате нарушений в системе репарации, может приводить или к углублению иммунодепрессивного состояния организма [6], или к нарушению способности иммунной системы элиминировать aberrантные клетки [7]. Тем самым результаты учета микроядер в полихромных эритроцитах отражают результаты кластогенного действия на хромосомы [8]. Это связано с тем, что

полихромные эритроциты (ПХЭ) легко распознаются, имеют короткий жизненный цикл, и любое содержащееся в них микроядро является следствием хромосомных aberrаций в эритробластных клетках. Многие структурные нарушения, однако, могут привести непосредственно к гибели клеток, и поэтому являются причинами токсичности. Увеличение числа клеток с микроядрами, как правило, сопровождается подавлением митотической активности. Это может быть обусловлено понижением жизнеспособности клеток с микроядрами и увеличением гибели клеток путем апоптоза.

Целью данной работы было изучение интенсивности анеугенеза у больных atopической бронхиальной астмой (АБА).

1. Материалы и методы исследования

Объектом исследований явились эритроциты периферической крови больных АБА и условно здоровых доноров. Группу больных АБА составили лица с легкой, среднетяжелой и тяжелой формами заболевания. Обследованию подвергались 39 больных в возрасте 30–40 лет. Из них 17 человек страдали легкой формой АБА, 15 имели среднетяжелую форму и 10 пациентов болели тяжелой формой АБА. В группах соотношение мужчин и женщин было примерно одинаково. На момент забора крови больные находились на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Республиканской клинической больницы МЗ РТ г. Казани, никто из них не болел инфекционными заболеваниями в течение 3 месяцев до обследования и не имел контакта с мутагенными факторами. Образцы крови у больных и в контрольной группе забирались в один и тот же период времени. Для выявления цитогенетических аномалий в соматических клетках использовался микроядерный тест (учет в периферической крови эритроцитов с микроядрами). Мазки периферической крови для стандартного общего анализа крови брали у больных при поступлении в стационар (то есть до лечения), у здоровых лиц – во время диспансерного обследования в поликлинике. Приготовление препаратов для исследования эритроцитов с микроядрами всегда было совмещено с плановыми лабораторными анализами, и больные не подвергались дополнительным манипуляциям. Капля крови наносилась на чистое, сухое предметное стекло для приготовления мазка. Препараты высушивались на воздухе в течение нескольких часов. Приготовленные мазки фиксировались в растворе метиловый спирт : ледяная уксусная кислота (3 : 1) в течение 3 мин, затем высушивались. Окрашивание проводили в растворе аzur-эозинового красителя Романовского – Гимза (1 : 5) на дистиллированной воде в течение 20 мин, препараты хорошо промывали. Полученные образцы (от каждого лица) шифровались и подвергались микроскопическому цитогенетическому анализу, основанному на регистрации клеток с микроядрами. Для исследования на микроядерный тест были просмотрены по 2–3 препарата от каждого человека. Поскольку частота встречаемости эритроцитов крови с микроядрами у человека низка, то в каждом случае анализировали 2000 клеток. Число эритроцитов с микроядрами пересчитывали в процентах. Микроядра отличали от артефактов в соответствии с рекомендацией Н.Н. Ильинского [9]. Каких-либо факторов, способных индуцировать цитогенетические нарушения у лиц контрольной группы, не выявлено. Математическая обработка полученных результатов проводилась с исполь-

зованием пакета программ “Statistica 5,0”. Уровень достоверности (P) определяли, используя t -тест для долей с поправкой Бонферрони.

2. Результаты и обсуждение

Критерием позитивного результата является воспроизводимое и статистически значимое изменение числа полихроматофильных и монохромных эритроцитов с микроядрами, по крайней мере, в одной из опытных групп по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует об индукции хромосомного повреждения и/или нарушения митотического аппарата клеток у больных АБА. Микроядерный анализ эритроцитов периферической крови выявил значительное увеличение числа эритроцитов, содержащих микроядра (табл. 1). Увеличение количества эритроцитов с микроядрами периферической крови наблюдалось у всех больных АБА в периоде клинической ремиссии. При легкой тяжести заболевания число эритроцитов с микроядрами увеличилось в 1.7 раза ($0.036 \pm 0.002\%$), при средней – в 2.5 раза ($0.053 \pm 0.003\%$), при тяжелой – в 4.3 раз ($0.090 \pm 0.004\%$) по отношению к здоровым донорам ($0.021 \pm 0.002\%$).

Табл. 1

Уровень эритроцитов с микроядрами в периферической крови больных АБА

Группы обследуемых	Число обследованных	Изучено эритроцитов	Эритроциты с микроядрами		Уровень достоверности, P	
			Абс. число	$M \pm m$ (%)		
Здоровые	17	34000	7	0.021 ± 0.002	–	
АБА:	легкое течение	14	28000	10	0.036 ± 0.002	н. з.
	среднее течение	15	30000	16	0.053 ± 0.003	< 0.001
	тяжелое течение	10	20000	18	0.090 ± 0.004	< 0.001

Таким образом, полученные результаты демонстрируют повышение уровня эритроцитов с микроядрами в периферической крови, причем увеличение оказывается пропорциональным степени тяжести заболевания. Это свидетельствует, по крайней мере, об интенсификации в клетках двух процессов: процесса нарушения деления клетки и эндомутагенеза.

При повреждении митотического аппарата и при индукции перестроек хромосом в стволовых клетках костного мозга возможно образование фрагментов ДНК (или хромосомы), которые остались в клетке и не были удалены с ядром из эритроцита. Таким образом, можно предположить, что микроядро является результатом действия в клетке двух процессов – нарушения митоза либо повреждения хромосом. Оба процесса носят название анеугенез.

Как правило, повышение уровня хромосомной изменчивости связано с повышением уровня эндомутагенеза в организме больных, а последнее связано с возрастанием количества эндомутагенов чаще всего за счет усиленной генерации эндогенных кластогенных факторов из различных метаболических циклов

кластогенеза. В экспериментальных исследованиях повышение уровня хроматидных и хромосомных aberrаций объясняется влиянием перекисных соединений, выделяемых иммунными клетками при иммунологических конфликтах, инактивация которых невозможна вследствие дефектов в антиоксидантной системе клеток [10]. Так, при бронхиальной астме обнаружено повышение выработки активных форм кислорода на фоне снижения антиоксидантной защиты.

Повышение хромосомной изменчивости в клетках крови вызывает интерес к изучению неспецифических факторов защиты генома, а именно антикластогенной активности плазмы крови. Следует отметить, что установленный нами высокий процент микроядер в эритроцитах больных свидетельствует о достаточно сильном прессинге мутагенов на геном клеток больных бронхиальной астмой.

Исходя из этого, следует ожидать повышения уровня апоптотически измененных клеток крови у больных АБА. Причем вероятность обнаружения апоптотически измененных клеток, скорее всего, следовало ожидать у больных со среднетяжелой или тяжелой формой АБА, у которых уровень анеугенеза достаточно высок. Как следует из табл. 1, это 25 человек из 39, то есть 64.1%.

Полученные нами данные подтверждают предположения о том, что АБА представляет собой не только клеточную, но и генетическую патологию. Исследование цитогенетических изменений в эритроцитах больных АБА является перспективными с точки зрения выяснения как причин появления высоких количеств микроядер, так и их роли в патогенезе астмы.

Выводы

Содержание микроядер в эритроцитах периферической крови является достоверным критерием токсического действия. Такой микроядерный анализ *in vivo* может быть интегративным тестом для оценки мутагенной опасности.

Summary

A.C. Vodounon, N.A. Ponomareva, Z.I. Abramova. Cytogenetical Changes in the Erythrocytes of Patients with Atopic Bronchial Asthma.

A research has been carried out upon cytogenetical instability in erythrocytes of the patients with atopic bronchial asthma. An increment was revealed in the number of erythrocytes with micronuclei in peripheral blood of patients with atopic bronchial asthma. This increment was in direct ratio with the level of disease severity. The formation of these micronuclei can be connected with the increment of the endomutagenesis level in the patients' organism, and possibly plays an important role in apoptosis regulation.

Key words: aneogenesis, micronuclei, erythrocytes, atopic bronchial asthma.

Литература

1. *Монахов А.С.* Раннее выявление опухолевых заболеваний по цитогенетическим критериям, определяемым в лимфоцитах периферической крови (на примере рака желудочно-кишечного тракта у человека) // *Вопр. онкол.* – 2001. – Т. 47, № 4. – С. 401–407.
2. *Болтина И.В.* Использование показателя «частота aberrаций хромосом» при формировании групп риска относительно онкологических заболеваний // *Цитология и генетика.* – 2007. – Т. 41, № 1. – С. 66–74.

3. *Бигалиев А.Б., Краус Э.В.* Цитогенетический мониторинг населения из экологически неблагоприятных районов // *Цитология и генетика*. – 1992. – Т. 26, № 1. – С. 64–66.
4. *Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов А.С. и др.* Здоровье среды: методика оценки // *Экол. экспертиза*. – 2001. – Т. 1, № 5. – С. 103–116.
5. *Бочков Н.П., Чеботарёв А.Н.* Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.
6. *Илющенко В.Г.* Классификация спонтанной генотипической клеточной адаптации // *Цитология и генетика*. – 2002. – Т. 36, № 5. – С. 34–42.
7. *Скорова С.В.* Влияние иммунологических реакций организма на частоту структурных мутаций хромосом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1982. – 24 с.
8. *Heddle J.A., Salamone M.F.* Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity // *Environ. Health Perspect.* – 1981. – V. 39, No 6. – P. 23–27.
9. *Ильинский Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н.* Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. – Томск: Том. гос. ун-т, 1992. – 272 с.
10. *Emerit I., Levy A., Michelson A.M.* Effect of superoxide dismutase on the chromosomal instability of New Zeland black mice // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1981. – V. 30, No 2. – P. 65–69.

Поступила в редакцию
04.03.08

Водунон Сирил Алоде – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: sweetiebj@yahoo.fr

Пономарева Наталья Александровна – ассистент кафедры медицинской биологии и генетики Казанского государственного медицинского университета.

E-mail: mopron@inbox.ru

Абрамова Зинаида Ивановна – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета.

E-mail: Zinaida.Abramova@ksu.ru