

Л.П.Сычева, М.М.Бяхова, Г.М.Земляная, М.А.Коваленко, С.М.Шереметьева

Цитогенетические показатели, пролиферация и апоптоз эпителиальных клеток у детей, больных бронхиальной астмой

ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сысина РАМН, Москва

L.P.Sycheva, M.M.Biakhova, G.M.Zemlyanaya, M.A.Kovalenko, S.M.Sheremetyeva

Cytogenetic indexes, proliferation and apoptosis in epithelial cells of children with bronchial asthma

Summary

Karyological analysis of buccal epithelial cells obtained from 70 children with atopic asthma and 90 non-asthmatic children living in Tula was performed. Asthma children had higher rate of cytogenetic lesions (portions of cells with micronuclei and protrusions were 2.22 % vs 1.66 % in controls; $p < 0.05$) and apoptosis (14.3 % and 11.0 %, respectively; $p < 0.001$) in buccal epithelial cells. The lesions were more prominent in exacerbation and in severe asthma. Alterations of buccal epithelial cells corresponded to those in other tissues, in particular bronchial epithelial cells; this fact confirms similar lesions in these cell populations in asthmatic patients.

Резюме

Проведен полный кариологический анализ буккального эпителия у 70 детей, страдающих atopической бронхиальной астмой (БА) и 90 детей из группы сравнения, проживающих в Туле. У детей с atopической БА повышен уровень цитогенетических нарушений (доля клеток с микроядрами и протрузиями составила 2,22 и 1,66 % соответственно; $p < 0,05$) и апоптоза клеток буккального эпителия (14,3 и 11,0 %; $p < 0,001$). Более выраженные изменения отмечены в период обострения и при тяжелом течении заболевания. Изменения буккального эпителия соответствуют изменениям, выявленным при исследовании других клеточных популяций больных БА, в частности бронхиального эпителия, что свидетельствует об однонаправленных изменениях этих клеточных популяций в организме.

Современная диагностика, лечение и профилактика заболеваний основаны на углубленном изучении молекулярных и клеточных изменений, определяющих развитие патологических процессов. В настоящее время бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных заболеваний. Так, среди взрослого населения она регистрируется в > 5 % случаев, а среди детей – примерно в 10 %. Общее число больных БА в стране приближается к 7 млн человек [1]. БА характеризуется хроническим воспалением воздухоносных путей, приводящим к функциональным и структурным изменениям бронхиальных тканей (т. н. ремоделирование дыхательных путей). Считают, что эти изменения связаны с образованием активных форм кислорода и азота [2]. Повышенный уровень цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови у больных БА также связывают с образованием активных радикалов. Применение антимутагенного препарата позволяет продлить период ремиссии у таких пациентов [3]. Мы предположили, что образование активных форм кислорода и азота при БА является системным процессом и отражается на других клеточных популяциях, в частности клетках назального [4] и, по-видимому, буккального эпителия. Эту клеточную популяцию можно анализировать неинвазивным методом без дополнительного культивирования. В работе проведен анализ уровня цитогенетических нарушений, пролиферации и апоптоза эксфолиативных клеток буккального эпителия у детей с БА.

Материалы и методы

Проведен количественный кариологический анализ буккального эпителия детей, проживающих в Туле. Обследованы 90 детей из контрольной группы (условно здоровые дети, не страдающие хроническими заболеваниями, без патологии бронхолегочной системы и аллергических реакций) и 70 детей с atopической БА. Дети с БА не получали лечения кортикостероидами, приступы заболевания у них снимали β_2 -агонистами. Соответствие детей по полу было приблизительно одинаковым. Средний возраст детей в контрольной группе составил 12 лет, в группе больных БА – 9,4 года. Корреляция исследуемых показателей с возрастом и полом у детей с БА не выявлена.

Исследовали мазки клеток буккального эпителия, полученные из соскоба со слизистой оболочки щеки. Подготовка препаратов, анализ и оценка кариологических показателей проведена в соответствии с Методическими рекомендациями "Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека" [5, 6]. Препараты фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты и окрашивали ацетоорсеином и светлым зеленым. В закодированных препаратах каждого ребенка анализировали по 1 000 клеток и определяли количество клеток с микроядрами, протрузиями, ядром атипичной формы, со двоятым ядром, с кариопикнозом, кариорексисом, кариолизисом, 2-ядерных клеток. Микроядро – небольшое ($1/3$ диаметра

ядра), округлое, с четким контуром ДНК-содержащее образование за пределами основного ядра, состоящее из ацентрического фрагмента хромосомы и / или отставших на стадиях ана- и телофазы митоза одной или нескольких хромосом. Ядерные протрузии (*protrusion, broken eggs, nucleus buds*) – ДНК-содержащие образования, расположенные вне ядра в цитоплазме, шаровидной, нитевидной или иной формы, четко отграниченные от ядра и соединяющиеся с ним перемычкой. Ядра атипичной формы – все виды ядер, имеющие форму, отличающуюся от округлой или овальной и имеющие различного вида лопасти и "выбухания". 2-ядерная клетка – клетка с 2 отдельно лежащими ядрами. Клетка со сдвоенным ядром – клетка с 2 неразшедшимися ядрами (другое название – ядро с перетяжкой, ядро с насечкой). Предполагают, что такие сдвоенные ядра образуются в результате незавершенного митоза. Кариопикноз, кариорексис и кариолизис – поздние стадии деструкции ядра при гибели клетки. Учитывали клетки с неразрушенной, гомогенно окрашенной цитоплазмой, без вакуолизации, поэтому показатели поздних стадий деструкции ядра относили к показателям апоптоза [6]. Для каждого обследованного ребенка рассчитывали апоптотический индекс, соответствующий суммарной доле клеток с кариорексисом, кариопикнозом и кариолизисом (в %).

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы *Statistica* для *Windows*. При межгрупповом сравнении показателей использовали непараметрический критерий χ^2 .

Результаты

Выявлено увеличение доли клеток с микроядрами, протрузиями и атипичной формой ядра на 42, 31 и

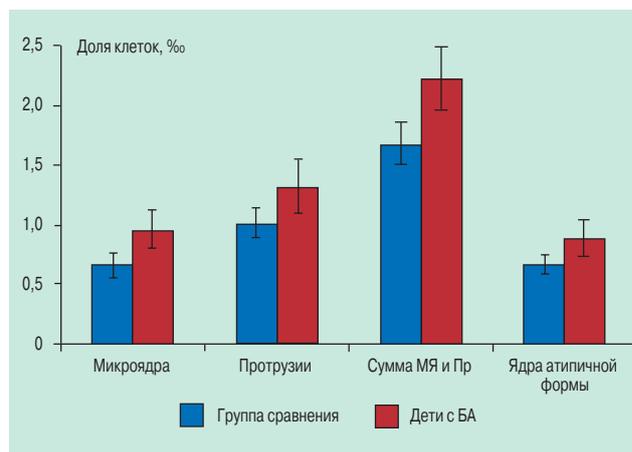


Рис. 1. Цитогенетические показатели у детей с БА и в контрольной группе

35 % соответственно, но в связи со значительной дисперсией показателей эти изменения не достоверны (табл. 1, рис. 1). Однако отмечено достоверное увеличение суммарной доли клеток с микроядрами и протрузиями у детей с БА (2,22 vs 1,66 % в контрольной группе; $p < 0,05$).

У больных детей достоверно повышены: доля клеток с перинуклеарной вакуолью (начало апоптоза) на 59 %, кариопикнозом – на 45 %, кариорексисом – на 41 % и полным лизисом ядра – на 21 %. Апоптотический индекс у детей с БА также достоверно выше (на 30 %), чем в контрольной группе (табл. 1, рис. 2).

Кариологические показатели у детей в зависимости от тяжести течения и периода БА отражены в табл. 2. Цитогенетические нарушения более выражены у детей с тяжелым течением БА. Доля клеток с микроядрами у них в 2,6 раза выше, а доля клеток с протрузиями, суммарно протрузиями и микрояд-

Таблица 1

Сравнение 2 групп детей по цитогенетическим показателям, показателям пролиферации и апоптоза ($M \pm m$)

Показатели, %	Контрольная группа (n = 90)	Больные БА (n = 70)	p
Цитогенетические показатели			
Клетки с микроядрами	0,66 ± 0,09	0,94 ± 0,13	0,0507
Клетки с протрузиями	0,99 ± 0,12	1,30 ± 0,21	0,0655
Клетки с микроядрами и протрузиями	1,66 ± 0,16	2,22 ± 0,27	0,0109 ^a
Клетки с ядром атипичной формы	0,66 ± 0,11	0,89 ± 0,17	0,0965
Показатели пролиферации			
Клетки с 2 ядрами	4,32 ± 0,25	4,59 ± 0,31	0,4073
Клетки с 3 ядрами	0,10 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,5444
Клетки со сдвоенными ядрами	1,33 ± 0,13	1,33 ± 0,14	0,9777
Все клетки с ≥ 2 ядрами	5,76 ± 0,31	6,00 ± 0,35	0,5444
Показатели деструкции ядра (апоптоза)			
Клетки с перинуклеарной вакуолью	11,80 ± 0,69	18,70 ± 1,78	0,0000 ^a
Клетки с кариопикнозом	1,34 ± 0,15	1,94 ± 0,27	0,0025 ^a
Клетки с кариорексисом	3,86 ± 0,41	5,44 ± 0,70	0,0000 ^a
Клетки с полным лизисом ядра	5,76 ± 0,61	6,95 ± 0,62	0,0031 ^a
Апоптотический индекс	11,00 ± 0,87	14,30 ± 1,21	0,0000 ^a

Примечание: ^a – $p < 0,01$.

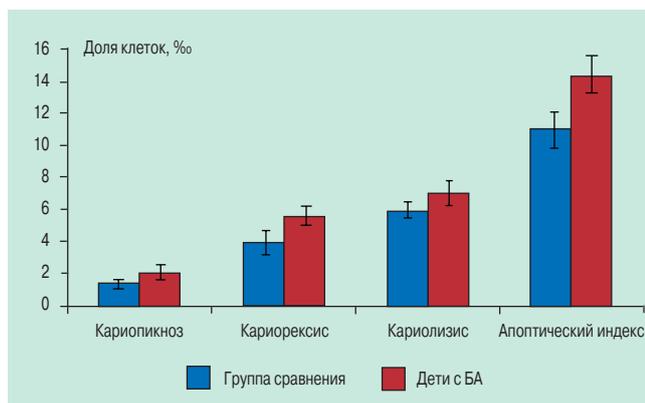


Рис. 2. Показатели поздней деструкции ядра у детей с БА и в контрольной группе

рами – в 1,6 и 2 раза выше, по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Эти показатели у детей с тяжелым течением БА также выше, чем у детей с легким и среднетяжелым течением заболевания. В то же время изменения показателей деструкции ядра клеток, особенно доля клеток с кариорексисом и апоптотический индекс, более выражены у детей со среднетяжелым течением БА в период обострения.

У детей со среднетяжелым течением БА оказалось возможным сравнить кариологические показатели в периоде ремиссии и обострения. Выявлено небольшое, но статистически незначимое повышение цитогенетических показателей у детей в период обострения. Все показатели деструкции ядра также были выше в период обострения, при этом значимыми были отличия следующих показателей: числа

клеток с перинуклеарной вакуолью (в 1,6 раза), доли клеток с кариорексисом (в 2,1 раза), апоптотического индекса (в 1,3 раза).

Показатели, косвенно отражающие пролиферацию (частота клеток со сдвоенными ядрами, 2 и 3 ядрами), не отличаются у детей с БА и в контрольной группе (табл. 1), а также у детей с разной степенью тяжести БА (табл. 2).

Обсуждение

У детей с атопической БА чаще встречались цитогенетические нарушения и апоптоз клеток буккального эпителия. Изменения были более выражены в период обострения и при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания. Но и при легкой БА в периоде ремиссии суммарное число клеток с цитогенетическими нарушениями возросло в 1,7 раза, а апоптотический индекс – в 1,3 раза. Наши данные подтверждаются исследованиями, полученными на материале других клеточных популяций. У больных атопической БА повышалась частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах. При легком течении БА уровень цитогенетических нарушений был в 1,8 раза выше, чем в контрольной группе, а при усугублении тяжести заболевания нарушения были более выраженными [3, 7]. Апоптоз лимфоцитов периферической крови также повышен в 1,4 раза [8] – возможно, как ответ на повреждение ДНК.

У больных БА повышался уровень ДНК-повреждений назальных эпителиоцитов [4]. Уровень цитогенетических нарушений в бронхиальном эпителии

Таблица 2

Сравнение цитогенетических показателей, показателей пролиферации и апоптоза у детей с БА разной степени тяжести в период ремиссии и обострения ($M \pm t$)

Показатели, %	Контрольная группа (n = 90)	БА, легкое течение, ремиссия (n = 14)	БА, среднетяжелое течение, ремиссия (n = 24)	БА, среднетяжелое течение, обострение (n = 24)	БА, тяжелое течение, обострение (n = 7)
Цитогенетические показатели					
Доля клеток с микроядрами	0,66 ± 0,09	1,51 ± 0,39 ^a	0,76 ± 0,17	0,58 ± 0,16 ^b	1,71 ± 0,47 ^{a, b, r}
Доля клеток с протрузиями	0,99 ± 0,12	1,36 ± 0,45	0,97 ± 0,23	1,52 ± 0,49 ^a	1,57 ± 0,57
Доля клеток с микроядрами и протрузиями	1,66 ± 0,16	2,80 ± 0,71 ^a	1,73 ± 0,32 ^b	2,10 ± 0,56	3,29 ± 0,57 ^{a, b}
Доля клеток с ядром атипичной формы	0,66 ± 0,11	0,69 ± 0,26	0,83 ± 0,21	1,10 ± 0,42 ^a	0,86 ± 0,40
Показатели пролиферации					
Доля клеток с 2 ядрами	4,32 ± 0,25	5,50 ± 0,66	4,50 ± 0,60	4,44 ± 0,54	3,71 ± 0,60
Доля клеток с 3 ядрами	0,10 ± 0,03	0,14 ± 0,10	0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,06	0
Доля клеток со сдвоенными ядрами	1,33 ± 0,13	1,37 ± 0,32	1,44 ± 0,26	1,23 ± 0,22	1,43 ± 0,57
Сумма всех клеток с ≥ 2 ядрами	5,76 ± 0,31	7,01 ± 0,60	5,99 ± 0,71	5,76 ± 0,61	5,14 ± 0,91
Показатели деструкции ядра (апоптоза)					
Доля клеток с перинуклеарной вакуолью	11,80 ± 0,69	26,7 ± 7,01 ^a	12,70 ± 1,52 ^b	20,20 ± 2,14 ^{a, b, r}	18,00 ± 4,10 ^{a, b, r}
Доля клеток с кариопикнозом	1,34 ± 0,15	1,75 ± 0,41	2,13 ± 0,51 ^a	2,10 ± 0,56 ^a	1,29 ± 0,52
Доля клеток с кариорексисом	3,86 ± 0,41	4,76 ± 0,99	3,66 ± 0,59	7,86 ± 1,76 ^{a, b, r}	5,14 ± 1,39 ^r
Доля клеток с полным лизисом ядра	5,76 ± 0,61	7,64 ± 1,45	6,77 ± 1,19	7,00 ± 1,08 ^a	6,00 ± 1,07
Апоптотический индекс	11,00 ± 0,87	14,10 ± 2,05 ^a	12,6 ± 1,77 ^a	17,00 ± 2,66 ^{a, b, r}	12,4 ± 2,80 ^r

Примечание: ^a – достоверно отличается от контрольной группы, $p < 0,05$; ^b – достоверно отличается от легкого течения в ремиссии, $p < 0,05$; ^r – достоверно отличается от среднетяжелого течения в ремиссии, $p < 0,05$; ^c – достоверно отличается от среднетяжелого при обострении, $p < 0,05$.

больных atopической БА не определен, однако в ряде исследований установлено ускорение апоптоза бронхиальных клеток — это один из важных аспектов ремоделирования бронхиального эпителия при БА [9–11].

По современным представлениям, пусковым сигналом atopической БА является реакция иммунокомпетентных клеток на аллергены, но основные процессы связаны с хроническим воспалением и изменением структурно-функционального состояния бронхов. Воспаление сопровождается макрофагальной реакцией и оксидативным стрессом, который характеризуется выработкой эндогенных активных форм кислорода и азота, дисбаланс которых оказывает прямое токсическое воздействие на различные отделы бронхолегочной системы [9]. Цитогенетические нарушения, выявленные у больных БА, по-видимому, происходят в результате действия этих активных радикалов [12]. Повреждение белков и ДНК активирует сигнальный путь p53 и апоптоз клеток бронхиального эпителия. Это приводит к их активному отторжению — вплоть до оголения базальной мембраны, которое является характерным признаком БА и усиливается при тяжелом течении и в периоды обострения [9, 11].

Отличия группы больных БА от контрольной группы по частоте клеток с микроядрами и протрузиями оказались недостоверны, однако интегральный цитогенетический показатель (суммарная частота клеток с микроядрами и протрузиями) позволил выявить статистически значимые отличия (рис. 1).

Результаты исследования дают возможность судить о последствиях выявленных кариологических изменений. В европейских ретроспективных исследованиях показана связь частоты хромосомных aberrаций с повышенным риском раковых заболеваний [13]. Эти данные позволяют предположить, что у больных БА также возможно развитие новообразований. И, действительно, в последние годы появились работы, указывающие на повышенный риск рака, ассоциированный с БА [14, 15].

Заключение

При исследовании буккального эпителия детей с atopической БА выявлено учащение цитогенетических нарушений и апоптоза, более выраженное в период обострения, а также при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания. Эти изменения соответствуют процессам, наблюдаемым при исследовании других клеточных популяций, в частности лимфоцитов периферической крови, назального и бронхиального эпителия больных БА, что свидетельствует об однонаправленных системных изменениях этих тканей в организме. Можно предположить, что оценка кариологического статуса, включающего анализ цитогенетических нарушений, показателей пролиферации и апоптоза буккального эпителия, может применяться как дополнительный метод не-

инвазивного контроля течения БА (в частности, состояния бронхиального эпителия).

Литература

1. Чучалин А.Г. Тяжелые формы бронхиальной астмы. Тер. архив 2001; 73 (3): 5–9.
2. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. J. Biochem. Mol. Biol. 2003; 36 (1): 95–109.
3. Семенов А.В. Хромосомная изменчивость и ее фармакологическая коррекция при atopической бронхиальной астме у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Казань; 2003.
4. Fortoul T.I., Valverde M., Lopez M. et al. Single-cell gel electrophoresis assay of nasal epithelium and leukocytes from asthmatic and nonasthmatic subjects in Mexico City. Arch. Environ. Hlth 2003; 58 (6): 348–352.
5. Методические рекомендации "Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека". М.: Науч. совет РАМН и МЗ и СР РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды; 2005.
6. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. Мед. генетика 2007; 11: 3–11.
7. Линцов А.Е., Барабанова Е.Н., Федосеев Г.Б. Анализ цитогенетических нарушений в клетках больных бронхиальной астмой. В кн.: 6-й Национальный конгресс по болезням органов дыхания. Новосибирск; 1996. 0101.
8. Grzegorzcyk J., Kowalski M.D., Pilat A., Iwaszkiewicz J. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma / rhinitis: relation to serum markers of apoptosis. Mediat. inflamm. 2002; 11: 225–233.
9. White S.R., Dorscheid D.R. Corticosteroid induced apoptosis of airway epithelium. A potential mechanism for chronic airway epithelial damage in asthma. Chest 2002; 122 (6): 278–274.
10. Bucchieri F., Puddicombe S.M., Lordan J.L. et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2002; 27 (2): 179–185.
11. Trautmann A., Kruger K., Akdis M. et al. Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma. Int. Arch. Allergy Immunol. 2005; 138 (2): 142–150.
12. Величковский Б.Т. Экологическая пульмонология (Роль свободно-радикальных процессов). Екатеринбург: Изд. ЕМНЦ ПОЗРПП МЗ РФ; 2003.
13. Hagmar L., Stromberg U., Bonassi S. et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. Cancer Res. 2004; 64: 2258–2263.
14. Brown D.W., Young K.E., Anda R.F. et al. Asthma and risk of death from lung cancer: NHANES II Mortality Study. J. Asthma 2005; 42 (7): 597–600.
15. Tennis P., Sherrill B., Fernandez C., Dolan C. Cancer risk in asthmatic populations. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2005; 95 (4): 354–360.