

А.В. Храмов^{2*}, В.П. Иванов^{1,2}, Е.В. Трубникова^{1,2},
О.Н. Бачинский¹, Н.В. Стабровская^{1,2}, Н.В. Кононыхина¹

УДК 616.253-002.2(045)

¹ ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, кафедра биологии, медицинской генетики и экологии
² ГОУ ВПО Курский государственный университет, научно-исследовательская лаборатория «Генетика»

ХРОНИЧЕСКИЙ БРОНХИТ НЕПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ГЕНЕЗА И ВОВЛЕЧЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ЕГО ПАТОГЕНЕЗ

Резюме

В статье представлены результаты сравнительного изучения белкового состава клеточных мембран эритроцитов и функциональной активности рибосомных генов у 85 больных хроническим бронхитом непрофессионального генеза и 68 здоровых лиц. Установлено, что в мембранах эритроцитов больных имел место количественный дисбаланс ряда цитоскелетных, транспортных белков, а также белков, отвечающих за механические свойства клеточных мембран эритроцитов. Выявлено как снижение, так и повышение показателей функциональной активности рибосомных генов у больных в сравнении с контрольной группой. Показано, что изменение количественных характеристик молекулярного состава мембран эритроцитов влияет на варибельность цитогенетических показателей у больных хроническим бронхитом непрофессиональной этиологии. С учетом биохимических, цитологических и клинических аспектов патологии разработана модель, позволяющая с точностью в 91% прогнозировать развитие хронического бронхита.

Ключевые слова: хронический бронхит, непрофессиональная этиология, белки клеточных мембран, рибосомные гены.

Abstract

This article presents the results of a study of the protein composition of erythrocyte cell membrane and functional activity of ribosomal genes in 85 patients with chronic bronchitis of nonprofessional genesis and 68 healthy persons. Found that in erythrocytes of patients has been quantitative imbalance of the number of cytoskeletal, transport proteins, and proteins responsible for the mechanical properties of erythrocyte cell membrane. Identified either a reduction, or increase of functional activity of ribosomal genes in patients, compared with a control group. Shown that changing the quantitative characteristics of molecular composition of erythrocyte membranes affects indicators of cytogenetic variability in patients with chronic bronchitis of unprofessional etiology. In view of the biochemical, cytological and clinical aspects of pathology developed model, allowing 91% accuracy to predict the development of chronic bronchitis.

Key words: chronic bronchitis, nonprofessional etiology, proteins of cell membranes, ribosomal genes.

В настоящее время около 600 млн человек в мире страдают хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Основной причиной развития ХОБЛ является табакокурение. В России курят 70% мужчин и 30% женщин [7]. Возраст начала курения, его продолжительность, количество и качество выкуриваемого табака, а также социальный статус курильщика могут служить прогностическими факторами течения и сроков неблагоприятного исхода ХОБЛ [8]. У курильщиков быстрее развиваются стойкие клинические признаки заболевания, курение ведет к ежегодному уменьшению объема форсированного выдоха (ОФВ1) [9]. У 15–20% курильщиков выявляется повышенная конституциональная чувствительность к патогенному влиянию курения, а темп снижения ОФВ1 у них в 2 раза выше в сравнении со всей популяцией курящих, что приводит к развитию клинически значимой ХОБЛ у этой категории людей [2]. По данным ВОЗ, показатель смертности

при ХОБЛ в РФ составляет 16,2 на 100 тыс. населения, что сравнимо с большинством европейских стран: в Германии — 12,5, в Италии — 13,7, в Великобритании — 23,1 [4].

Важным элементом патогенеза любого мультифакторного заболевания, в том числе и хронического бронхита, является изучение вовлеченности молекулярно-генетических факторов (белкового спектра мембран и активности рибосомных генов). Реализация программы генома осуществляется через синтез белков на рибосомах с вовлечением в этот процесс функционально активных рибосомных генов. Рибосомные гены на молекулярном уровне обеспечивают работу белоксинтезирующего аппарата клетки. В свою очередь, в основе целого ряда патологических состояний лежат изменения свойств клеточных мембран. Нарушение функционирования биомембран может быть не только причиной, но и

следствием развития патологических процессов [4]. Углубление знаний химического состава и свойств мембран во взаимосвязи с функционированием рибосомного аппарата клетки представляется важным для понимания их ключевой роли в структурной организации и обеспечении жизнеспособности всех клеток организма, а также является необходимым условием определения принципов коррекции патологии. Изложенная проблематика подвигла нас к проведению настоящего исследования.

Целью работы являлось изучение белкового состава клеточных мембран эритроцитов и функциональной активности рибосомных генов, а также характер их взаимосвязи при хроническом бронхите непрофессиональной этиологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили эритроциты и лимфоциты 85 лиц, страдающих хроническим бронхитом непрофессионального генеза в возрасте 47–65 лет и контрольной группы в числе 68 практически здоровых лиц города Курска и Курской области. Средний возраст испытуемых — $60,25 \pm 6,57$ года. Среди обследованных женщины составили 38,68%, мужчины — 61,32%. Забор материала (кровь) проводился из локтевой вены в гепаринизированную сухую посуду в количестве 10 мл. Для получения чистых фракций мембран эритроциты разрушали осмотическим «шоком» по методу G.T. Dodge [10]. Гемолиз эритроцитов и отмывку «теней» проводили двукратно в 10 мМ и однократно в 5 мМ Na-фосфатном буфере с добавлением фенилметансульфанилфторид-ингибиторов протеиназ. Белковые компоненты мембран эритроцитов определяли в модифицированном одномерном электрофорезе [5] в присутствии додецилсульфат натрия по методу U.K. Laemmli [13]. Электрофорез проводили на пластинах полиакриламидного геля (ПААГ), приготовленных с линейным градиентом концентрации акриламида.

Содержание белковых фракций в исследуемом образце определяли по известной массе маркерного белка бычьего сывороточного альбумина, через полученные при денситометрировании площади альбумина и каждой белковой фракции. Дальнейший пересчет количественного содержания белковых фракций проводили на 1 мг общего белка, исключая содержание гемоглобина в образце. Идентификация мембранных белков эритроцитов осуществлялась по классификации Steck–Fairbanks [11].

Метафазные пластинки получали путем культивирования лимфоцитов периферической крови по стандартной методике [6]. Фиксацию проводили на 72-м часу культивирования, после чего окрашивали раствором нитрата серебра. Активность

рибосомных генов оценивали визуально полуколичественным способом, выражали в условных единицах [12] и определяли по интенсивности окраски серебром ядрышкообразующих районов индивидуальных акроцентрических хромосом (13–15 D и 21, 22 G). Для каждого случая анализировали 20 метафазных пластинок. Визуальная оценка этого показателя производилась по 5-балльной системе согласно критериям, предложенным в лаборатории общей цитогенетики Медико-генетического научного центра РАМН: 0 баллов — окраска отсутствует; 1 балл — окраска слабая (зерно серебра много меньше ширины хроматиды); 2 балла — средняя окраска (зерно серебра примерно соответствует ширине хроматиды); 3 балла — интенсивная окраска (зерно серебра больше ширины хроматиды); 4 балла — высокоинтенсивная окраска (зерна серебра, выпавшие на каждой хроматиде, значительно шире ее и соединяются, образуя общий конгломерат). Отдельно считали активность рибосомных генов, расположенных в хромосомах группы D и G, т.к. рибосомные гены собраны в кластеры. Число активных рибосомных цистронов (RC) определяли по количеству окрашенных хромосом. Также подсчитывали число ассоциаций акроцентрических хромосом на одну клетку и число хромосом, вступивших в ассоциации.

Для выбора методов статистического анализа проводилась проверка на нормальность распределения признака. Для этого использовали критерий Колмагорова–Смирнова. Полученные значения p были выше критического ($p = 0,05$). При описании количественных признаков использовали параметры нормального распределения: среднее значение, стандартная ошибка среднего значения. Для проверки статистических гипотез использовался критерий Стьюдента (t). Для оценки сложного взаимодействия характеристик проводили расчет коэффициентов корреляций по Пирсону (r), являющихся мерой линейной связи признаков. При регрессионном анализе рассчитывали парную логистическую регрессию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изначально 2 группы обследуемых (больные хроническим бронхитом и группа здоровых лиц) сравнивались по клинико-функциональным показателям с целью дальнейшей проверки этих данных на предмет прогностической ценности. Результаты сравнения приведены в *табл. 1*.

Проведено сравнительное изучение количественного содержания основных белковых фракций мембран эритроцитов больных бронхитом непрофессионального генеза и контрольной группы (*табл. 2*). Были обнаружены достоверные различия между группами в количественном содержании ряда белковых фракций. В структуре мембран эритроцитов

* Контакты. E-mail: hramcov86@yandex.ru. Телефон: (4712) 58-81-47

№ п/п	Показатели	Бронхит непрофессионального генеза (n = 85)	Контроль (n = 68)	t
		X ± Sx	X ± Sx	
1	Индекс курильщика, пачка/лет	29,72 ± 1,34	19,42 ± 1,51	5,01*
2	ЖЕЛ, %	51,69 ± 1,41	97,08 ± 1	26,24*
3	ФЖЕЛ, %	45,59 ± 1,4	98,01 ± 1,43	24,66*
4	ОФВ1	45,89 ± 1,33	99,06 ± 1,24	26,02*

* Статистические значимые различия (p < 0,05).
Примечание. ЖЕЛ — жизненная емкость легких. ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких. X ± Sx — среднее значение показателя и стандартная ошибка.

Таблица 1. Клинико-функциональные показатели сравниваемых групп (M ± m)

у больных бронхитом непрофессионального генеза по сравнению с контролем было выявлено высокое содержание анионтранспортного белка, белка полосы 4.2, белка полосы 4.5 и низкое содержание белка полосы 2.1, полосы 2.2.

Полученные данные показывают, что в структуре эритроцитарных мембран больных непрофессиональным бронхитом имеет место выраженный количественный дисбаланс цитоскелетных и транспортных белков, что дает основание предполагать наличие определенных особенностей организации белков в структуре эритроцитарной мембраны больных ХОБЛ в сравнении со здоровыми людьми. Проведено изучение уровня

№ п/п	Мембранные белки	Бронхит непрофессионального генеза (n = 85)	Контроль (n = 68)	t
1	Спектрин (α)	90,36 ± 4,69	93,32 ± 3,69	0,48
2	Спектрин (β)	99,82 ± 4,77	101,59 ± 4,29	0,27
3	Белок 2.1	42,87 ± 3,14	52,24 ± 3,23	2,06*
4	Белок 2.2	15,79 ± 1,39	27,28 ± 2,18	4,62*
5	Белок 2.3	16,42 ± 1,79	15,37 ± 1,97	0,39
6	Белок 3 (анионтранспортный белок)	230,12 ± 7,15	198,47 ± 9,32	2,74*
7	Белок 4.1	53,98 ± 1,98	56,09 ± 2,75	0,64
8	Белок 4.2 (паллидин)	45,79 ± 1,62	38,82 ± 2,04	2,72*
9	Белок 4.5	43,36 ± 2,6	34,61 ± 2,11	2,51*
10	Белок 4.9	57,04 ± 3,58	53,33 ± 3,37	0,74
11	Белок 5 (актин)	49,51 ± 2,05	52,74 ± 2,34	1,04
12	Белок 6	79,30 ± 2,65	85,78 ± 3,25	1,56
13	Белок 7.1	52,28 ± 2,91	52,22 ± 3,05	0,01
14	Белок 7.2	20,70 ± 1,44	18,6 ± 1,21	1,08
15	Белок 8 (глутатион-S-трансфераза)	86,74 ± 5,32	96,36 ± 5,9	1,21

* Статистические значимые различия (p < 0,05).
Таблица 2. Сравнительный анализ количественных характеристик белков мембран эритроцитов больных бронхитом непрофессионального генеза и контрольной группы (M ± m)

функциональной активности рибосомных генов (ФАРГ) у больных и в контрольной группе (табл. 3). Статистически достоверные различия уровня ФАРГ наблюдались по количеству активных рибосомных цистронов, ассоциаций хромосом и хромосом в ассоциациях. При этом у больных бронхитом непрофессионального генеза наблюдалось снижение числа рибосомных цистронов и повышение как количества ассоциаций хромосом, так и числа хромосом в таких ассоциациях, в отличие от контрольной группы. Данная вариабельность показателей уровня ФАРГ, видимо, вызвана развитием хронической бронхообструкции при длительном табакокурении.

С целью установления характера корреляционной структуры взаимосвязей между показателями количественного содержания основных мембранных белков эритроцитов и функциональной активности рибосомных генов проведен корреляционный анализ в выборках больных ХОБЛ и контрольной группы. Полученные коэффициенты корреляции имеют как положительную, так и отрицательную направленность. При этом положительные взаимосвязи средней силы наблюдались между количественным содержанием белка полосы 2.2 и ФАРГ по 10Ag (r = 0,52), белка полосы 2.2 и ФАРГ по D-хромосомам (r = 0,50) Положительные коэффициенты корреляций более низкой силы наблюдались между количественным содержанием белка полосы 2.3 и ФАРГ по D-хромосомам (r = 0,39). Взаимосвязи обратной направленности средней степени выраженности наблюдались между β-спектрином и количеством ассоциаций хромосом (r = -0,38), белком полосы 6 и ФАРГ по 10Ag (r = -0,36).

Вышеперечисленные взаимосвязи не нашли отражения при анализе корреляционных показателей в контрольной группе, что может свидетельствовать о вовлеченности указанных показателей функциональной активности рибосомных генов и белков мембран эритроцитов в патогенез хронического бронхита непрофессиональной этиологии.

Проводилась оценка прогностической ценности каждого из выделенных показателей для больных бронхитом непрофессионального генеза и контрольной группы. Коэффициенты линейно-дискриминантной функции представлены в табл. 4. Полученные коэффициенты регрессионного анализа позволяют прогнозировать развитие

№ п/п	Цитогенетические показатели	Непроф. бронхит n = 85	Контроль n = 68	t
		X ± Sx	X ± Sx	
1	10Ag	19,99 ± 0,22	19,88 ± 0,34	0,28
2	D	11,97 ± 0,21	12,21 ± 0,3	0,65
3	G	8,06 ± 0,19	8,3 ± 0,24	0,77
4	RC	8,88 ± 0,08	9,15 ± 0,1	1,96*
5	AsCr	0,98 ± 0,04	0,7 ± 0,07	3,71*
6	CrAs	2,08 ± 0,09	1,54 ± 0,15	3,20*

* Статистические значимые различия (p < 0,05).
Примечание. 10Ag — суммарная ФАРГ по 10 хромосомам. D — показатель ФАРГ по D-хромосомам. G — показатель ФАРГ по G-хромосомам. RC — количество рибосомных цистронов. AsCr — количество ассоциаций хромосом. CrAs — количество хромосом в ассоциациях. X ± Sx — среднее значение показателя и стандартная ошибка.

Таблица 3. Сравнительный анализ уровня функциональной активности рибосомных генов у больных бронхитом непрофессионального генеза и в контрольной группе (M ± m)

Признак	Ценность признака	b
ЖЕЛ	6,47	-0,009
CrAs	6,23	0,081
Индекс курильщика	5,38	0,005
Constanta (b0)	2,21	

Примечание. Ошибка классификации: 9%. F (5,11) = 115,52, p < 0,00002. b — коэффициент регрессионного анализа.

Таблица 4. Коэффициенты регрессионного анализа прогностических ценных количественных характеристик клинических показателей и ФАРГ больных бронхитом непрофессионального генеза и контрольной группы (M ± m)

хронического бронхита непрофессиональной этиологии с вероятностью в 91%, что может служить хорошим подспорьем для врача-клинициста.

Выводы

Выявленные различия по количественному содержанию мембранных белков эритроцитов между исследуемыми группами могут отражать определенные особенности организации белков в структуре клеточных мембран больных хроническим бронхитом непрофессионального генеза. В мембранах эритроцитов у больных установлен выраженный дефицит цитоскелетных белков (анкирина 2.1 и 2.2), а также избыток анионтранспортного белка (полосы 3), ряда белков, отвечающих за механические свойства мембран эритроцитов (белков полосы 4.1, 4.5).

Рассматривая функциональную активность рибосомных генов, можно заключить, что у больных хроническим непрофессиональным бронхитом наблюдается дисбаланс (как снижение, так и избыток) отдельных показателей ФАРГ по сравнению с активностью рибосомных генов в группе контроля. Выявлены корреляции различной направленности средней силы между количественным содержанием

ряда белков мембран эритроцитов (белков полосы 2.2, 2.3, 6, β-спектрина) и преимущественной активностью рибосомных генов по D-хромосомам и общей функциональной активности по 10 хромосомам. Полученные данные дают основание полагать, что хроническая бронхообструкция, формирующаяся на фоне длительного табакокурения, способна вызывать изменения не только на клеточном, но и на субклеточном уровне, обуславливая особенности в нормальном функционировании клеток.

Таким образом, в результате исследования были выявлены маркерные клинико-функциональные характеристики и показатели функциональной активности рибосомных генов, которые, вероятно, имеют непосредственное отношение к патогенезу хронического бронхита непрофессионального генеза. Принимая во внимание эти показатели, в случае их отклонений от нормы можно судить о развитии именно хронического бронхита непрофессиональной этиологии. Более глубокие аспекты этих взаимосвязей являются предметом нашего дальнейшего изучения.

Список литературы

- Болдырев А.А., Котелевцев С.В., Ланио М., Альварес К., Перес П. Введение в биомембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
- Васильева О.С. Хроническая обструктивная болезнь легких и профессиональные факторы // Пульмонология. 2007. № 6. С. 5–11.
- Иванов В.П., Полоников А.В., Солодилова М.А. Белки клеточных мембран и сосудистые дистонии у человека. Курск: КГМУ, КМИ, 2004. 280 с.
- Илькович М.М., Кузубова Н.А., Киселева Е.А. Борьба с табакокурением как основа профилактики хронической обструктивной болезни легких // Пульмонология. 2010. № 2. С. 37–39
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
- Современные проблемы в клинической цитогенетике. Под ред. Н.П. Кулешова. М.: Высш. шк., 1991. 163 с.
- Тоннесен П., Карроззи Л., Фагерстрем К.О. и др. Отказ от курения у больных с респираторными заболеваниями: первоочередной компонент лечения // Пульмонология. 2009. № 6. С. 9–35.
- Чучалин А.Г. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких. М.: Издательским дом «Атмосфера», 2007. 96 с.
- Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания // Пульмонология. 2008. № 2. С. 5–14.
- Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. 1963. № 100. P. 119–130.
- Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. № 10. P. 2607–2617.
- Howell W.M., Denton T.E., Piamons I.R. Differential staining of the satellite of human acrocentric chromosomes // Experientia. 1975. № 31. P. 260–265.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 227. P. 680–685.