

УДК 577:616.233-002:331.472

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ИХ ВОВЛЕЧЕННОСТЬ В ФОРМИРОВАНИЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО БРОНХИТА

¹Храмцов А.В., ^{1,2}Иванов В.П., ^{1,2}Трубникова Е.В.,
²Бачинский О.Н., ^{1,2}Стабровская Н.В.

¹Курский государственный университет, НИЛ «Генетика», Курск, e-mail: kurskgu@kursk-uni.ru;

²Курский государственный медицинский университет, Курск, e-mail: kurskmed@mail.ru

В статье представлено изучение белкового состава клеточных мембран эритроцитов и функциональной активности рибосомных генов у больных профессиональным бронхитом. В работе принимало участие 78 больных профессиональным бронхитом и 57 здоровых лиц, выступающих в качестве контрольной группы. В исследовании были использованы различные методы анализа: цитогенетические, биохимические, клинические, статистические. Установлено, что в мембранах эритроцитов больных имел место количественный дисбаланс (как дефицит, так и избыток) ряда цитоскелетных, транспортных белков, а также белков, отвечающих за механические свойства клеточных мембран эритроцитов. Выявлено снижение показателей функциональной активности рибосомных генов у больных по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: профессиональный бронхит, белки клеточных мембран, рибосомные гены, корреляции

MOLECULAR-GENETIC FACTORS AND THEIR INVOLVEMENT IN THE FORMATION OF PROFESSIONAL BRONCHITIS

¹Khramtsov A.V., ^{1,2}Ivanov V.P., ^{1,2}Trubnikova E.V., ²Bachinskiy O.N., ^{1,2}Stabrovskaya N.V.

¹Kursk State University, Research laboratory of «Genetics», Kursk, e-mail: kurskgu@kursk-uni.ru;

²Kursk State Medical University, Department of biology, medical genetics and ecology, Kursk, e-mail: kurskmed@mail.ru

This article presents a study of erythrocyte cell membrane protein structure and functional activity of ribosome genes in patients with professional bronchitis. 78 patients with professional bronchitis and 57 control cases were investigated. Different methods of analysis, for example, cytogenetic, biochemical, clinical, statistical, were used in the study. A quantitative imbalance both deficiency and abundance of cytoskeletal transport proteins, and proteins responsible for the mechanical properties of erythrocyte cell membrane was found in erythrocyte of patients. Decrease of some indications of ribosomal genes activity was found in the group of patients in comparison with a control group.

Keywords: professional bronchitis, proteins of cell membranes, ribosomal genes, correlations

В настоящее время по официальной статистике число больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в России составляет около 1 млн человек, но по результатам подсчета с использованием эпидемиологических маркеров больных гипотетически должно быть около 11 млн. Предполагается, что имеющиеся статистические данные не отражают истинной распространенности этой патологии и в действительности она намного выше. Это объясняется тем, что значительное число случаев ХОБЛ не диагностируется на ранних этапах, поскольку больные, как правило, обращаются за помощью в той стадии развития заболевания, когда оно уже приобрело тяжелое или среднетяжелое течение [7].

ХОБЛ занимает четвертое место среди причин смертности в мире, и в ближайшие десятилетия прогнозируется дальнейший рост как распространенности, так и смертности от ХОБЛ. Учитывая высокую заболеваемость, возрастающую смертность, значительный экономический и социальный ущерб от ХОБЛ, своевременная диагностика и современные методы лечения заболевания являются залогом успешного контроля

над болезнью и максимально позднего развития осложнений, определяющих качество и продолжительность жизни больных [1, 7].

Одним из факторов риска заболевания ХОБЛ считается длительное воздействие профессиональных вредностей (пыль, химические соединения, дым, пары, запахи, различные ирританты) и развитие такого заболевания, как профессиональный бронхит [1]. Среди основных факторов риска профессиональной природы наиболее вредными являются кадмий и кремний. В случаях сочетанного воздействия курения и профессиональных вредностей патогенность указанных факторов риска значительно усиливается [6]. Следует учитывать индивидуальные факторы риска ХОБЛ (сочетанное воздействие внешних факторов, генетическая предрасположенность, респираторные инфекции в детстве, наличие сопутствующих заболеваний, прием различных медикаментозных препаратов и др.).

В основе целого ряда патологических состояний лежат изменения свойств клеточных мембран, вызываемые как факторами внешней среды, так и внутренними функциональными расстройствами. Нарушение

в функционировании биомембран может быть не только причиной, но и следствием развития патологических процессов [2].

В последние годы интенсивное развитие цитогенетики позволяет решать ряд важных проблем в медицине, в том числе оценить состояние белоксинтезирующего аппарата организма у больных профессиональным бронхитом, определяя количество функционально активных рибосомных генов. Рибосомные гены содержат наследственную информацию о рибосомах, которые, в свою очередь, обеспечивают синтез белка. Интенсивность синтеза белка влияет на пролиферацию клеток, которая, в свою очередь, определяет скорость роста тканей. Геномная доза рибосомных генов определяет потенциальные возможности общей интенсивности синтеза белков в клетке.

В настоящее время накоплен весомый фактический материал о вовлеченности биохимического состава клеточных мембран и рибосомных генов в такие патологические состояния, как гипертония, злокачественные лимфомы, атеросклероз. Однако остается недостаточно изучена вовлеченность вышеперечисленных факторов в патогенез профессионального бронхита, что и сподвигло нас к проведению настоящего исследования.

Целью настоящего исследования являлось изучение белкового состава клеточных мембран эритроцитов и функциональной активности рибосомных генов, а также характер их взаимосвязи при профессиональном бронхите у человека.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили эритроциты и лимфоциты 78 лиц, страдающих профессиональным бронхитом в возрасте от 50 до 65 лет, и контрольной группы в числе 57 практически здоровых лиц города Курска и Курской области. Средний возраст составил $60,25 \pm 6,57$. Среди обследованных женщины составили 38,68 %, мужчины 61,32 %.

Для получения чистых фракций мембран эритроциты разрушали осмотическим «шоком» по методу Dodge G.T. [8]. Белковые компоненты мембран эритроцитов определяли модифицированным одномерным электрофорезом [4] в присутствии додецилсульфат-натрия по методу Laemmli U.K. [10]. Электрофорез проводили на пластинах ПААГ, приготовленных с линейным градиентом концентрации акрилаида.

Идентификацию и обсчет белковых фракций согласно классификации Стека-Фербенкса [9] проводили на ПВМ IBM PA/AT с использованием программы «OneDscan». Количество белка во фракциях рассчитывалось по известной массе маркерного белка человеческого сывороточного альбумина, исключая массу гемоглобина, и выражалось в микрограммах на 1 миллиграмм общего белка мембраны.

Метафазные пластики получали путем культивирования лимфоцитов периферической крови по стандартной методике [5]. Фиксацию проводили

на 72 часа культивирования, после чего окрашивали раствором нитрата серебра. Активность рибосомных генов оценивали визуально полуколичественным способом и выражали в условных единицах (усл. ед.).

Активность рибосомных генов 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 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 (зерна серебра больше ширины хроматиды);

4 балла – высокоинтенсивная окраска (зерна серебра, выпавшие на каждой хроматиде, значительно шире ее и слипаются вместе, образуя общий конгломерат).

Отдельно считали активность рибосомных генов, расположенных в хромосомах группы D и группы G, так как 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, стандартную ошибку 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 исследования и их обсуждение

Проведено изучение количественного содержания основных белковых фракций мембран эритроцитов больных профессиональным бронхитом и контрольной группы.

Результаты сравнительного анализа количественного содержания основных белков мембран эритроцитов больных профессиональным бронхитом и контрольных групп представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, были обнаружены достоверные различия между группами в количественном содержании по ряду белковых фракций. В структуре мембран эритроцитов у больных профессиональным бронхитом по сравнению с контролем было выявлено высокое содержание анионтранспортного белка, белка полосы 4.1, паллидина, белка полосы 4.9, белка полосы 7.1

и низкое содержание белка полосы 2.1, полосы 2.2. Следует отметить, что наблюдается стремление к статистической достоверности количественного содержания белка 6, которое характеризуется избытком, в сравнении с контрольной группой. Полученные данные показывают, что в структуре эритроцитарных мембран больных профес-

сиональным бронхитом имеет место выраженный количественный дисбаланс как цитоскелетных, так и транспортных белков. Результаты дают основание полагать, что у больных профессиональным бронхитом в сравнении с контролем существуют определенные особенности организации белков в структуре эритроцитарных мембран.

Таблица 1

Сравнительный анализ количественных характеристик белков мембран эритроцитов больных профессиональным бронхитом и контрольной группы

№ п/п	Мембранные белки	Профбронхит N = 78	Контроль N = 57	t
		X ± S _x	X ± S _x	
1	Спектрин (α)	103,68 ± 3,80	102,72 ± 3,85	0,17
2	Спектрин (β)	99,96 ± 4,28	104,37 ± 5,23	0,66
3	Белок 2.1	36,49 ± 2,58	48,07 ± 3,92	2,57*
4	Белок 2.2	14,52 ± 1,43	30,34 ± 2,48	5,86*
5	Белок 2.3	12,02 ± 1,57	16,70 ± 2,50	1,67
6	Белок 3 (анионтранспортный белок)	237,14 ± 4,97	196,67 ± 10,58	3,76*
7	Белок 4.1	57,96 ± 2,85	49,53 ± 2,90	2,03*
8	Белок 4.2 (паллидин)	49,92 ± 2,07	39,58 ± 2,29	3,32*
9	Белок 4.5	38,87 ± 2,01	39,54 ± 2,40	0,22
10	Белок 4.9	63,11 ± 3,18	49,66 ± 2,75	3,06*
11	Белок 5 (актин)	54,29 ± 2,07	56,49 ± 2,64	0,66
12	Белок 6	78,74 ± 2,76	71,77 ± 1,72	1,95
13	Белок 7.1	47,50 ± 2,25	41,32 ± 1,85	2,01*
14	Белок 7.2	18,79 ± 1,04	17,46 ± 1,44	0,77
15	Белок 8 (глутатион-S-трансфераза)	74,42 ± 4,53	66,42 ± 4,06	1,26

Примечание: * – Статистические значимые различия (p < 0,05).

Проведено изучение уровня функциональной активности рибосомных генов (ФАРГ) у больных профессиональ-

ным бронхитом и в контрольной группе. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнительный анализ уровня функциональной активности рибосомных генов у больных профессиональным бронхитом и контрольной группе

№ п/п	Цитогенетические показатели	Профбронхит N = 78	Контроль N = 57	t
		X ± S _x	X ± S _x	
1	10 Ag	19,15 ± 0,19	19,88 ± 0,34	1,99*
2	D	11,28 ± 0,18	12,21 ± 0,30	2,80*
3	G	7,63 ± 0,18	8,30 ± 0,24	2,21*
4	RC	8,64 ± 0,07	9,15 ± 0,10	4,13*
5	AsCr	0,82 ± 0,04	0,70 ± 0,07	1,53
6	CrAs	2,58 ± 0,07	2,47 ± 0,15	0,75

Примечания: *p < 0,05, 10Ag – суммарная ФАРГ по 10 хромосом; 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.

Из табл. 2 следует, что статистически достоверные различия по уровню ФАРГ наблюдались по 10 хромосомам, по хромосомам группы D и G, а также по количеству активных рибосомных цистронов. Причем у больных профессиональным бронхитом

наблюдалось снижение ФАРГ по данным показателям, в отличие от контрольной группы. Данное снижение уровня ФАРГ, по-видимому, вызвано действием профессиональных вредных факторов производств, на которых обследуемые проводили

большую часть своего времени на протяжении нескольких лет.

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 профессиональным бронхитом и контрольной группы. Корреляционные матрицы количественных характеристик представлены в табл. 3 и 4 соответственно.

Таблица 3

Матрица значимых коэффициентов корреляции количественного содержания белков мембран эритроцитов и ФАРГ больных профессиональным бронхитом

	10 Ag	D	G	RC	AsCr	CrAs
α-сп.		-,3528*				
β-сп.		-,3674*				
2.1		-,4406*			-,3939*	
2.2		-,3800*				
2.3						
3						
4.1						
4.2						
4.5		,3770*				
4.5.1				,3936*		
5						
6						
7.1		,3632*				
7.2	,2791*	,4309*				
8		,3513*				

Примечание. * – $p < 0,05$.

Как видно из табл. 3, полученные коэффициенты корреляции имеют как положительную, так и отрицательную направленность. При этом положительные взаимосвязи средней силы наблюдались между количественным содержанием белка полосы 7.2 и ФАРГ по D-хромосомам ($r = 0,43$), белка полосы 4.5.1 и активностью по рибосомным цистронам ($r = 0,39$), белком полосы 4.5 и активностью рибосомных генов по D-хромосомам. Положительные коэффициенты корреляций более низкой силы наблюдались между количественным содержанием белка полосы 7.1 ($r = 0,36$), полосы 8 ($r = 0,35$) и активностью рибосомных генов по D-хромосомам, а также выявлена слабая взаимосвязь между суммарной активностью рибосомных генов по 10Ag хромосомам и количественным содержанием тропомиозина ($r = 0,28$).

Таблица 4

Матрица значимых коэффициентов корреляций количественного содержания белков мембран эритроцитов и ФАРГ в контрольной группе

	10 Ag	D	G	RC	AsCr	CrAs
α-сп.						
β-сп.						
2.1			-,4968*			
2.2						
2.3						
3			,4837*			
4.1				,5499*		
4.2			-,5012*		-,5306*	
4.5						
4.5.1						
5	,4618*		,5348*			
6						
7.1						
7.2					-,5812*	-,5670*
8						

Примечание. * – $p < 0,05$.

Среди обратной направленности средней степени выраженности наблюдались взаимосвязи между белком полосы 2.1 ($r = -0,44$), полосы 2.2 ($r = -0,38$) и активностью рибосомных генов по D-хромосомам, также между количественным содержанием белка полосы 2.1 и количеством ассоциаций хромосом ($r = -0,39$). Менее выраженные отрицательные корреляционные взаимосвязи выявлены между количественным содержанием β-спектрина ($r = -0,37$), α-спектрина ($r = -0,35$) и активностью рибосомных генов по D-хромосомам.

Несколько иная картина наблюдается при анализе результатов, представленных в табл. 4. Сила корреляционных взаимодействий между белковым составом клеточных мембран эритроцитов и ФАРГ превышает полученные коэффициенты, характерные для группы больных профессиональным бронхитом, что, на наш взгляд, может отражать негативное влияние вредных факторов производств, затрагивающее рибосомный аппарат клетки и архитектуру мембран.

Выявленные коэффициенты корреляционных взаимодействий средней силы между рибосомными генами и белковым спектром клеточных мембран эритроцитов могут объясняться тем, что синтез белков регулируется рядом других механизмов, но роль ФАРГ полностью не исключается и непременно вносит свой определенный вклад.

Проводилась оценка прогностической ценности каждого из выделенных показателей для больных профессиональным бронхитом и контрольной группы. Рассчитанные коэффициенты ЛДФ представлены в табл. 5.

Таблица 5

Коэффициенты регрессионного анализа прогностических ценных количественных характеристик мембранных белков эритроцитов и ФАРГ больных профессиональным бронхитом и контрольной группы ($F(8,42) = 6,42$, $p < 0,00002$)

Признак	Ценность признака	<i>b</i>
RC	15,44	-0,339
Белок полосы 4.5.1	6,58	0,006
Белок полосы 3	4,26	0,002
Constanta (b_0)		3,10

Ошибка классификации: 12%.

В табл. 5 обращает на себя внимание высокая прогностическая ценность отдельных показателей как белкового спектра, так и показателей функциональной активности рибосомных генов, особенно число активных рибосомных цистронов, белок полосы 3. Данный белок и цитогенетические показатели коррелируют с подверженностью к профессиональному бронхиту. Полученные коэффициенты регрессионного анализа позволяют прогнозировать развитие профессионального бронхита с вероятностью в 88%, что может служить хорошим подспорьем для врача клинициста.

Заключение

Выявленные различия по количественному содержанию мембранных белков эритроцитов между исследуемыми группами могут отражать определенные особенности организации белков в структуре клеточных мембран больных профессиональным бронхитом. 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 (белка полосы 4.1, 4.2, 4.9, тропомиозин 7.1).

Рассматривая функциональную активность рибосомных генов, можно заключить, что у больных профессиональным бронхитом наблюдается снижение таковой по сравнению с активностью рибосомных

генов в группе контроля. Выявлены корреляции различной направленности средней силы между количественным содержанием ряда белков мембран эритроцитов (белкам полосы 2.1, 2.2, 4.5.1, 4.5, 7.2) и преимущественно активностью рибосомных генов по D-хромосомам.

Полученные данные дают основание полагать, что профессиональные вредные факторы производств (пыль различного происхождения, аэрозоли, загазованность и др.) оказывают непосредственное влияние на организм человека, причем способны вызывать изменения не только на клеточном, но и на субклеточном уровне, вызывая разлад в нормальном функционировании.

Список литературы

1. Артамонова В.Г., Мухин Н.А. Профессиональные болезни. – М.: Медицина, 2006. – 480 с.
2. Введение в биомембранологию / А.А. Болдырев, С.В. Котелевцев, М. Ланио, К. Альварес, П. Перес. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 208 с.
3. Иванов В.П., Полоников А.В., Солодилова М.А. Белки клеточных мембран и сосудистые дистонии у человека. Курск: КГМУ, КМИ, 2004. 280 с.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
5. Современные проблемы в клинической цитогенетике/Под ред. Н.П. Кулешова. – М.: Высш. шк., 1991. – 163 с.
6. Отказ от курения у больных с респираторными заболеваниями: первоочередной компонент лечения / П. Тоннесен, Л. Каррози, К.О. Фагерстрем, К. Грациу, К. Хименез-Руиз, С. Нардини, Дж. Виеджи, К. Лаццаро, И.А. Кэмпелл, Е. Дагли, Р. Вест // Пульмонология. – 2009. – №6. – С. 9–35.
7. Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания // Пульмонология. – 2008. – №2. – С. 5–14.
8. 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.
9. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – №10. – P. 2607–2617.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – №227. – P. 680.

Рецензенты:

Ляпшев Ю.Д., д.м.н., профессор, профессор кафедры патофизиологии ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Курск;

Плотников А.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Курск.

Работа поступила в редакцию 30.09.2011.