

УДК 575.174.599.9

РОЛЬ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ КИСЛОРОДА В ИНДУКЦИИ КЛАСТОГЕННОГО ФАКТОРА В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Т.Ф.Саркисян, Р.М.Арутюнян, И.Эмери, А.С.Межлумян,
А.Л.Геворкян, И.Г.Арцруни

*/Ереванский государственный университет, кафедра генетики,
Университет Париж-6, отдел генетики/
375049 Ереван, ул. Чаренца, 8*

Ключевые слова: периодическая болезнь, хромосомная ломкость, кластогенный фактор, продукция свободных радикалов кислорода

В плазме крови больных периодической болезнью (ПБ) выявлен кластогенный фактор (КФ), индуцирующий спонтанные хромосомные повреждения. Роль свободных радикалов кислорода (СРК) в патогенезе ПБ опосредована индукцией кластогенных эффектов, предотвращаемых при добавлении в клеточные культуры супероксиддисмутазы (СОД) или некоторых ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты. Нами показано, что повреждения хромосом вызваны усилением продукции СРК мембранами активированных нейтрофилов, стимулирующих формирование различных КФ. Выявлено достоверное повышение кластогенной активности плазмы и спонтанной продукции СРК в нейтрофилах больных ПБ по сравнению с контролем. В лимфоцитах большинства больных ПБ наблюдалась корреляция между уровнем кластогенной активности и продукцией СРК. Эти данные подтверждают предположение о роли окислительного стресса в патогенезе ПБ.

Воспалительный процесс у больных ПБ, являющийся основным симптомом заболевания, отражается в повышении количества макрофагов, лейкоцитов и полиморфно-ядерных нейтрофилов (ПМН), являющихся основными эффекторами острого воспаления и обладающих высокой агрегационной активностью в плазме крови больных ПБ, где индуцируется повышение количества моно- и дигидрожирных кислот [9]. В остром периоде заболевания наблюдаются определенные изменения, приводящие к дегрануляции ПМН, а также к исчезновению внутриклеточных мембранных элементов плазмы, нарушению метаболизма арахидоновой кислоты и активации лизосомных ферментов [1,3,4]. Период приступа в стадии острого воспаления сопровождается выбросом ПМН в серозные мембраны. В патогенезе ПБ нарушение липоксигеназ-

ного пути окисления арахидоновой кислоты играет более важную роль по сравнению с циклооксигеназным [2,3,4].

Нами впервые выявлена хромосомная нестабильность при ПБ [21]. В обследуемых группах больных разного возраста, помимо повышения спонтанного уровня хромосомных aberrаций в культурах лимфоцитов, в плазме крови был обнаружен КФ, индуцирующий образование хромосомных aberrаций в лимфоцитах здоровых лиц [21]. Вероятно, при ПБ, как и при многих других заболеваниях, повышенная активность ПМН приводит к образованию СРК в крови и серозных жидкостях, индуцирующих кластогенную активность.

КФ впервые выявлен в плазме облученных ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС [13,22,23]. Повышенная кластогенная активность наблюдается при многих хронических воспалительных заболеваниях, сопровождающихся аутоиммунными процессами (прогрессивный системный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, хронический гепатит, язвенный колит и др.). КФ был обнаружен у рабочих, контактирующих с асбестом, а также у лиц, инфицированных вирусом ВИЧ [18–20].

КФ — смесь разных соединений, высвобождаемых ПМН, моноцитами и макрофагами. Компонентами КФ являются продукты перекисного окисления липидов, цитокины, фактор некроза опухолей, а также инозиновые нуклеотиды, образующиеся в процессе дезаминирования аденина в гипоксантин (инозиновые ди- и трифосфаты) [14–16].

В предыдущей работе нами было показано, что СОД и некоторые ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты снижают кластогенный эффект [21]. Однако для прямой оценки роли СРК при ПБ возникла необходимость сравнительного исследования кластогенной активности плазмы крови со спонтанным продуцированием СРК нейтрофилами больных ПБ и здоровых лиц. Это и явилось целью настоящей работы.

Материал и методы *

Обследованные были разделены на две группы: первая группа — 20 взрослых больных ПБ в остром периоде заболевания, а также 20 здоровых доноров того же пола и возраста из Центра гематологии и переливания крови МЗ Армении, вторая группа — 15 больных детского возраста, находящихся на лечении в клинике кафедры педиатрии Ереванского медицинского университета.

Забор крови производили из локтевой вены в пробирки с гепарином в концентрации 50МЕ/мл. Лимфоциты периферической крови культиви-

*Цитогенетический анализ хромосомных препаратов выполнен в отделе генетики Университета Париж-6 под руководством проф. И.Эмери.

ровали по стандартному методу [24] с добавлением 0,5 мл цельной крови, 5 мл питательной среды ТСМ, 199,1 мл эмбриональной сыворотки. Проллиферацию лимфоцитов стимулировали добавлением фитогемагглютинина. Для остановки процесса деления клеток на стадии метафазы на 72-ом часу культивирования вводили колхицин (0,25 мкг/мл) на 2 часа. Перед фиксацией в культуры добавляли гипотонический раствор хлористого калия (0,55%). Клетки фиксировали в растворе метанола и уксусной кислоты (3:1). Цитогенетические препараты окрашивали красителем Гимза. Анализировали клетки, содержащие не менее 45 центромер. Учитывали процент клеток с абберациями хромосом, включающими хроматидные и хромосомные делеции, разрывы, обмены и общее число структурных аббераций хромосом на 100 клеток. Пробелы в качестве аббераций не учитывали. На зашифрованных препаратах в каждом варианте считали по 50 клеток.

КФ выделяли из ультрафильтратов плазмы крови больных ПБ по методу Emerit [18]. Для удаления всех высокомолекулярных компонентов плазму крови больных дважды осаждали на фильтрах "Diaflo": "УМ 10" (размеры пор 10000 дальтон), а также "УМ 2" (размеры пор 1000 дальтон). Полученный КФ вводили в культуры лимфоцитов здоровых лиц в количестве 250 мкг/мл для оценки хромосомоповреждающего воздействия. Одновременно в необработанных культурах лимфоцитов тех же здоровых доноров определяли спонтанный уровень хромосомных аббераций. Различия между этими двумя величинами составляли превышение уровня хромосомных аббераций.

Образование СРК нейтрофилами больных ПБ и здоровых лиц оценивали по методу Johnstone [25]. ПМН выделяли после лизиса эритроцитов в 0,83% NH_4Cl . Интенсивность образования СРК определяли по скорости редукции феррицитохрома С (тип 3, Sigma). Нейтрофилы в концентрации 2,5 млн/мл инкубировали в 1 мл феррицитохрома (в концентрации 80 мкМ) в буфере в течение 15, 30, 60, 90 минут. Все эксперименты проводились дважды. В параллельные варианты для определения СОД-поглощаемой фракции при редукции феррицитохрома вводили СОД в концентрации 10 мг/мл. Поглощение измеряли в спектрофотометре при 550 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно предыдущим данным, полученным нами, в культурах лимфоцитов больных ПБ наблюдается повышение уровня хромосомных аббераций по сравнению с контролем [21]. Частота клеток с абберациями у больных ПБ ($6,34 \pm 2,72\%$) значительно превышала контрольный уровень ($1,70 \pm 0,92\%$, $p < 0,001$).

Сравнение кластогенной активности плазмы со спонтанной продукцией СРК нейтрофилами у 20 взрослых пациентов, страдающих ПБ, и 20 доноров контрольной группы того же возраста показало, что продукция СРК нейтрофилами у больных ПБ в среднем равна $9,94 \pm 0,77$ нМ, а у здоровых лиц — $7,27 \pm 0,75$ нМ ($p < 0,01$).

У больных ПБ общее число лимфоцитов со структурными aberrациями хромосом, индуцированными КФ, варьировало от 6 до 18, что в среднем составило $12,90 \pm 1,62$ на 100 клеток. Уровень спонтанных хромосомных aberrаций в культурах лимфоцитов здоровых доноров составил в среднем $3,37 \pm 0,85$ из расчета на 100 клеток. Превышение уровня хромосомных aberrаций до +6 наблюдалось у 17 больных (85%), а у 14 — до +8 и более (70%). После двойной фильтрации плазмы крови уровень хромосомных aberrаций достиг 22,0%.

Результаты цитогенетического анализа хромосомных aberrаций в культурах здоровых лиц, обработанных ультрафильтратами больных ПБ, представлены ниже. Более высокий уровень продукции СРК в нейтрофилах и хромосомных aberrаций в лимфоцитах наблюдался практически у каждого пациента при попарном сравнении полученных результатов с результатами здоровых доноров (табл. 1).

В табл. 2 представлены данные о превышении уровня хромосомных aberrаций при добавлении ультрафильтратов плазмы крови больных ПБ в культуры клеток здоровых доноров в зависимости от симптомов заболевания. Статистический анализ не выявил достоверной корреляции этих параметров.

Предварительные исследования у больных детского возраста подтвердило выявленную закономерность кластогенного воздействия, в том числе и наличие хромосомной нестабильности: частота клеток с хромосомными aberrациями в среднем составила 13,8%.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии КФ в плазме крови больных ПБ, который индуцировал повышение уровня хромосомных aberrаций у здоровых лиц. В большинстве случаев ультрафильтраты плазмы больных способствовали образованию хромосомных и хроматидных делеций, не вызывая, однако, образования колец, дицентриков и других типов структурных aberrаций. Данные параллельных исследований подтверждают наличие корреляции между интенсивностью образования СРК и кластогенной активностью в клетках больных. Нами была сделана попытка объяснения полученных результатов в зависимости от клинических симптомов обследованных больных ПБ, однако при этом не было выявлено взаимосвязи между тяжестью заболевания, а также развитием амилоидоза почек и образованием КФ. Вероятно, для этого требовались большие выборки больных.

Таблица 1

Уровень свободных радикалов кислорода и хромосомных aberrаций в крови больных ПБ и здоровых доноров

Уровень СРК ($\mu\text{моль O}_2^-$)		Уровень хромосомных aberrаций (на 100 клеток)	
больные ПБ	доноры	больные ПБ	доноры
8.81	7.14	18	4
8.57	6.19	12	4
11.19	5.40	6	6
12.38	7.85	18	2
10.23	9.30	12	6
9.04	4.76	12	2
10.71	8.56	10	-
9.76	7.60	8	0
11.40	8.56	12	4
12.85	7.14	12	6
12.14	6.66	10	4
10.71	6.19	18	4
10.71	6.90	12	4
9.76	8.09	16	6
9.76	5.24	16	2
6.43	12.60	10	2
11.19	6.19	16	2
7.62	6.43	14	2
6.90	7.14	18	0
8.57	7.38	8	4
9.94±0.77	7.27±0.75	12.90±1.62	3.37±0.85

Ранее было показано [29], что окислительный стресс при ПБ вызван действием побочных продуктов метаболизма арахидоновой кислоты, к которым относятся полиненасыщенные жирные кислоты клеточных мембран. Метаболизм арахидоновой кислоты в лейкоцитах связан с активностью 5-липоксигеназы и образованием 5-гидропероксиэйкозанолевой кислоты (5-HPETE), превращающейся в нестойкий лейкотриен A₄ (LTA₄), который, в свою очередь, гидролизуется в лейкотриен B₄ (LTB₄) с образованием конъюгата глутатиона (LTC₄) [29]. LTB₄ является потенциальным хемотактиком в нейтрофилах человека, который стимулирует процесс острого воспаления. Известно, что в остром периоде ПБ происходит выброс нейтрофилов к серозным мембранам, их дегрануляция и секреция лизосомных ферментов и пирогенных веществ

Таблица 2

Уровень хромосомных aberrаций (ХА) в культурах лимфоцитов здоровых доноров, обработанных ультрафильтрами плазмы больных ПБ, в зависимости от клинических симптомов

Симптомы	Больные ПБ																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Лихорадка	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Перитонит	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Плеврит	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Артропатия	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
Амилоидоз	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Длит. приступов (в днях)	2-3	4-5	4-5	4-5	4-6	3-4	4-5	2-3	2-3	1-2	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	4-5	3-4	2	3-4
Число приступов (в месяц)	4-5	1	2-3	4	1	2	2-3	4	2-3	5-6	1-2	1	0-2	1-2	4	оч. длит	3-4	1	1	оч. част
Длит. болезни (в гт.)	22	25	13	43	3	27	5	28	1	26	30	19	38	40	10	24	17	17	8	42
Прод. лечения колхицином (в гт.)	20	11	6	25	3	27	5	11	1	11	16	-	-	-	11	3	12	/	2	11
Возраст (в гт.)	25	31	26	45	15	31	33	33	18	27	54	21	39	45	45	45	46	21	39	44
Пол	М	М	М	М	Ж	М	М	М	Ж	Ж	М	М	М	М	М	М	М	М	М	М
Превышение уровня ХА	+14	+8	+2	+14	+8	+8	+6	+4	+8	+8	+6	+14	+8	+12	+12	+6	+12	+10	+14	+4

[2]. Уровень ЛТВ4 и LTC4 в плазме больных ПБ в 2–3 раза выше, чем в плазме здоровых лиц [5]. Накопление циркулирующих моно- и дигидроксижирных кислот в клетках крови больных ПБ доказывает их ведущую роль [9]. Воспалительные реакции обусловлены супрессией высвобожденных хемоаттрактантов и недостатком сериновой протеазы, являющейся ингибитором рецептора C5a в тканях больных [11,26,27]. В культурах клеток человека образование СРК стимулируется также и в процессе реакции ксантин — ксантин-оксидаза [17]. Арахидоновая кислота окисляется липоксигеназным и циклооксигеназным путем, либо без участия ферментов при действии СРК в культуре клеток, в результате чего образуются соединения с кластогенными свойствами [16]. Окислительный стресс в клетках больных ПБ вызван нарушением метаболизма арахидоновой кислоты в связи с активацией липоксигеназного пути ее окисления, а также с последующим образованием лейкотриенов [3,7].

Таким образом, можно заключить, что при ПБ наблюдаемая хромосомная нестабильность индуцируется КФ вследствие образования СРК активированными нейтрофилами. Полученные результаты являются непосредственным доказательством индукции КФ в результате окислительного стресса в клетках больных ПБ.

Поступила 15.06.97

**ԹԹՎԱԾՆԻ ԱԶՍՏ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ԿԼԱՍՏՈԳԵՆ ԳՈՐԾՈՆԻ
ԱՐԱԳԱՅՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՄԲ ՏԱՌԱՊՈՂ
ԱՆՁԱՆՑ ԲԶԻՋՆԵՐՈՒՄ**

**Թ.Ֆ.Սարգսյան, Ռ.Մ.Հարությունյան, Ի.Էմերի, Ա.Ս.Մեժլումյան,
Ա.Լ.Գևորգյան, Ի.Գ.Արծրունի**

Պարբերական հիվանդությամբ տառապող անձանց արյան պլազմայում հայտնաբերված է կլաստոգեն գործոնը, որը արտացոլում է սպոնտան քրոմոսոմային խաթարումների մակարդակի բարձրացումը: Թթվածնի ազատ ռադիկալների դերը կլաստոգեն էֆեկտների հարուցման դեպքում պարբերական հիվանդությամբ տառապող անձանց բջիջներում կարելի է կանխել ավելացնելով բջիջային կոպտորանների մեջ առախիդոնային թթվի նյութափոխանակության տարրեր ինհիբիտորներ կամ սուպերօքսիդդիսմատազ:

Ցույց է տրված, որ քրոմոսոմային խաթարումները առաջանում են թթվածնի ազատ ռադիկալի արտադրության ուժեղացմամբ բջիջների քաղանքների վրա, հիմնականում նեյտրոֆիլների ակտիվացման և կլաստոգեն գործոնների ստեղծման պատճառով: Պարբերական հիվանդությամբ տառապող անձանց նեյտրոֆիլներում հայտնաբերված է թթվածնային ազատ ռադիկալների սպոնտան առաջացման հստակ բարձրացում ստուգիչի տվյալների համեմատությամբ: Ի հայտ է բերվել կլաստոգեն ակտիվության մակարդակի և թթվածնային ազատ ռադիկալների առաջացման միջև փոխադարձ կապ:

Այս տվյալները հաստատում են օքսիդացման ստրեսի դերը պարբերական հիվանդության ախտածնության մեջ:

ROLE OF OXYGEN FREE RADICALS IN CLASTOGENIC FACTOR INDUCTION IN CELLS OF PATIENTS WITH PERIODIC DISEASE

T.F.Sarkisian, R.M.Aroutyunian, I.Emeri, A.S.Mejloumian,
A.L.Gevorkian, I.G.Artzruni

In the plasma of patients suffering from periodic disease (PD) it is observed presence of clastogenic factor responsible for the increase in spontaneous chromosome breakage. The role of superoxide radicals in pathogenesis of PD is confirmed by the revealed clastogenic effects, which are prevented by superoxide dismutase (SOD), as well as by some inhibitors of arachidonic acid metabolism. We have shown that chromosome damages are membrane mediated and related to increased oxyradical production by activated neutrophils with formation of secondary clastogenic molecules, i.e. clastogenic factors. We have evaluated the clastogenic activity of plasma in comparison to spontaneous superoxide production by neutrophils of PD patients and the referents. Regularly higher values of superoxide production by neutrophils in patients were revealed. There was a correlation between clastogenic activity in the lymphocyte cultures and superoxide production for the majority of patients. These data confirm our hypothesis about the significance of oxydative stress in PD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аствацатрян В.А., Торосян Е.Х., Епископосян Л.М. Медицинская наука Армении, 1995, XXV, 2, с.30.
2. Виноградова О.А. Медицина. М., 1973.
3. Виноградова О., Кочубей Л., Комиссарова И. Тез.докл. V Всесоюзн. съезда терапевтов. М., 1992, 1, с.223.
4. Габриелян Э.С., Давидян Д.Г., Мхитарян Г.С., Паносян А.Г. Бюлл.эксп.биол.и мед., 1990, 110, с.296.
5. Григорян С.В. В сб.: Совр. аспекты рад. медицины. Ереван., 1993, с. 1.
6. Григорян С.В., Карапетян А. В сб.: Совр. аспекты рад. медицины. Ереван, 1992, с.73.
7. Межлумян А.С., Саркисян Т.Ф., Арутюнян Р.М., Паносян А.Г., Григорян С.В. Биол. ж. Армении, 1992, 45, с.28.
8. Паносян А.Г., Григорян С.В., Давидян Д.Г. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1986, 112, с.561.
9. Aisen P.S., Haines K.A., Given W., Abramson S. et al. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1985, 82, p.1232.
10. Auclair Ch., Gouyette A., Levy A., Emerit I. Arch. Biochem. Biophys., 1990, 278, p.238.
11. Ayesh S., Ferne M., Flechner I., Babior B., Matzner Y. J. of Immunology, 1990, 144, p.3066.
12. Borgeat P., Samuelsson B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, p.2148.
13. Goh K.O., Sumner H. Radiation Res., 1968, 6, p.51.
14. Emerit I., Cerutti P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, p.7509.
15. Emerit I. Mutat. Res., 1982, 4, p. 61.
16. Emerit I., Khang S.H., Cerutti P. Free Radicals Biol. & Med., 1985, 1, p. 51.
17. Emerit I., Levy A., Khan Sh. Free Radicals, Lipoproteins and Membrane Lipids. Plenum Press, New York, 1990.
18. Emerit I., Crastes de Paulet A. et al. Free Radicals, Lipoproteins and Membrane Lipids. Plenum Press, New York, 1990.

19. Emerit I., Fabiani J.N., Levy A. et al. Free Radicals Biol.&Med., 1993, 19, p.405.
20. Emerit I. Free Radicals Biol.&Med., 1994, 16, p.99.
21. Emerit I., Arutyunian R., Sarkisian T., Mejlumian H., Torosian E., Panosian A. Free Radicals Biol.&Med., 1993,15, p.265.
22. Emerit I., Oganessian N., Sarkisian T., Arutyunyan R., Levy A., Chernjavski L., Pogonian A. Radiation Research, 1995,144, p.198.
23. Hollowell J.G., Littlefield L.G. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 129, p.240.
24. Hungerford D. Stain Technol., 1965, 40, p. 333.
25. Johnston R. Methods in Enzymology, 1984, 105, p.215.
26. Matzner Y., Partridge R., Levy M., Babior B. Blood, 1984, 63, p.629.
27. Matzner Y., Brzezinski A. N. Engl. J. Med., 1984, 311, p. 287.
28. Samuelsson B. Adv. in prost., thromb. and leuk. res., 1985, 15, p.1.

