

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ АБЕРАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ У ДІТЕЙ ХВОРИХ НА ПОЗА ГОСПІТАЛЬНУ ПНЕВМОНІЮ РІЗНИХ СТУПЕНІВ ВАЖКОСТІ

Гайдаш І.А.

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Гострі інфекційні захворювання органів дихання є найбільш поширеною причиною захворюваності дітей [5, 7, 9, 10]. Пневмонія, за визначенням Міністерства охорони здоров'я України, це гостре неспецифічне запалення легеневої тканини, в основі якого лежить інфекційний токсикоз, дихальна недостатність, водно-електролітні та інші метаболічні порушення з патологічними зсувами у всіх органах і системах дитячого організму [1].

При пневмонії дія інфекційного, токсичного фактора, гіпоксії створює умови для підсилення перекисного окислювання ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран, активації ендогенних фосфоліпаз, пригнічення ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ). Поряд з цим, система клітинної ланки імунітету у хворих на пневмонію характеризується зниженням кількості тотальних Т-лімфоцитів, Т-хелперів/індукторів та імунорегуляторного індексу, що свідчить про формування імунodefіцитного стану [2-5, 8].

Інтенсивність ПОЛ приймає участь у регулюванні функціональної активності хроматину, у тому числі і хроматину імунокomпетентних клітин. Існує зв'язок між інтенсивністю ПОЛ та біосинтезом дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Індукція нестабільності геному значною мірою обумовлена вільними радикалами, які утворюються при активації ПОЛ, і за умов порушення в системі АОЗ активно взаємодіють з піримідиновими азотистими основами і SH-групами протеїнів хроматину, завдяки чому виникають порушення у системі ексцизної репарації і мутагенні зміни [6]. Цілковито можливо, що поламаки хромосомного апарату імунокomпетентних клітин є передуючим фактором виникнення імунodefіцитного стану [2, 3, 5]. Але інтенсивність цитогенетичних аберацій в популяції лімфоцитів, які виконують імунорегулюючу функцію і впливають на силу імунної відповіді, при поза лікарняних пневмоніях у дітей вивчені недостатньо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами: робота являє собою фрагмент наукової теми «Мікробіологічний, імунний і метаболічний статус хворих бактерійними інфекціями» (№ держреєстрації 0110U007082).

Метою даної роботи було вивчення стану хромосомного апарату лімфоцитів крові дітей хворих на поза шпитальну пневмонію різних ступенів важкості.

Матеріали та методи дослідження. Під наглядом знаходилось 259 дітей, хворих на гостру пневмонію, в тому числі 137 (52,9 %) хлопчиків і 122 (47,1 %) дівчинки у віці від 2 до 14 років, які знаходились на лікуванні у відділенні соматичної вірусної патології Луганської міської багатопрофільної дитячої лікарні № 4 з 2001 по 2006 рр. Дітей у віці від 2 років до 5 років 11 місяців та 30 днів

було 127 (49,03%), у віці від 6 до 14 років – 132 (50,97 %). Легкий перебіг пневмонії зареєстрований у 99 дітей (38,22 %), середньотяжкий перебіг – у 97 дітей (37,45 %), тяжкий перебіг – у 63 дітей (24,32 %). В групі дітей від 2 років до 5 років 11 місяців та 30 днів легкий перебіг гострої пневмонії зареєстрований у 48 осіб (37,80 %), середньотяжкий перебіг – у 44 (34,65 %), тяжкий перебіг – у 35 (27,55 %); в групі дітей від 6 до 14 років – у 51 (38,64 %), 53 (40,15 %) та у 28 (21,21 %) осіб відповідно.

Контрольну групу склали 69 практично здорових дітей у віці від 2 до 14 років, із яких 33 дитини були у віці від 2 років до 5 років 11 місяців та 30 днів, і 36 дітей від 6 до 14 років: хлопчиків було 35 (50,72 %), дівчаток – 34 (49,27 %).

Виділення лімфоцитів з периферійної крові здійснювали в градієнті щільності 1,072 фіколу-верографін з наступним лізисом еритроцитів льодяним розчином амонію хлорид. Суцільну кров, розведена в співвідношенні 1:1 середовищем 199, нашаровували на суміш фіколу-верографіну і центрифугували 20 хвилин при 500 g. Зняті інтерфазні кільця мононуклеарних клітин двічі відмивали протягом 10 хвилин середовищем 199. Потім ресуспендували в живильному середовищі. Для підготування суспензії лімфоцитів у концентрації 2 Г/л проводили розрахунок за формулою: $V = (a/40 - 1) \cdot c$, де а - кількість лімфоцитів у камері Горяєва; с - кількість суспензії клітин, які залишились у пробірці; В - кількість фосфатно-буферного розчину, який необхідно додати. Використання описаного методу дозволяє виділяти з крові біля 90 % лімфоцитів. Суправітальне фарбування виділених лімфоцитів трипановою синькою свідчило про життєздатність 98-99 % клітин.

Препарати хромосом готували з культур лімфоцитів суцільної гепаринізованої крові. До стерильних флаконів в стерильних умовах вносили 6 мл середовища 199, 5 мл сироватки великої рогатої худоби, 0,2 мл розчину фітогемаглютиніну, розчиненого згідно з інструкцією, та 0,5 мл крові, яка досліджувалась. Флакони зачиняли та інкубували при 37°C протягом 72 годин. За 2-3 години до приготування препаратів до флаконів вносили колхіцин до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл та витримували культури в термостаті при 37°C. По закінченні терміну культивування до флаконів на 20 хвилин вносили 5-7 мл розчину калію хлорид (0,075 моль/л), попередньо підігрітого до 37°C. Після виділення надосадової рідини клітинну визвесь ресуспендували в 5-7 фіксатора Кларка (3 частини етилового або метилового спирту та 1 частина льодяної оцтової кислоти) та інкубували 20 хвилин в холодильній камері. Зміну фіксатора проводили тричі. Потім 8-10 крапель клітинної суспензії наносили на знежирене охоложене предметне скельце, висушували

препарат і фарбували азур-еозином. Урахування результатів проводили за допомогою імерсійної системи світлового мікроскопа.

Математична обробка отриманих цифрових даних проводилась на персональному комп'ютері Celeron 400A з використанням статистичних програм, розрахованих на обробку біологічної інформації.

Результати дослідження та їхнє обговорення. В гострому періоді захворювання спостерігали суттєве збільшення частоти абераційних метафаз і середньої кількості аберацій на клітину (таблиця 1). В загальній групі обстежених дітей вказані по-

казники перевищували показники в групі здорових дітей у 5,48 і в 2,78 рази відповідно. Домінуючим типом аберацій при цьому були хроматидні, питома вага яких в загальній структурі цитогенетичних поломок хромосомного апарату лімфоцитів склала 95 %, тоді як на хромосомні аберації прийшлося 5 %. Хроматидні аберації були представлені поодинокими фрагментами та обмінами, тоді як аберації хромосомного типу – парними фрагментами, дицентриками, центричними і ацентричними кільцями. З 90 обстежених дітей в гострому періоді пневмонії цитогенетичні порушення були зареєстровані у 100 % випадків.

Таблиця 1. Результати цитогенетичних досліджень у дітей, хворих на гостру пневмонію, при надходженні до стаціонару

Показники (кількість обстежених дітей)	Частота абераційних метафаз (%)	Типи аберацій, %		Середня кількість аберацій на клітину, у.о.
		хроматидні	хромосомні	
Вся група хворих дітей (n=90)	11,5±0,6*	95	5	5,0±0,25*
Легкий перебіг (n=36)	5,8±0,3*	98	2	3,4±0,17*
Середньотяжкий перебіг (n=34)	11,4±0,8*	95	5	5,2±0,15*
Тяжкий перебіг (n=20)	17,2±0,9*	92	8	6,5±0,3*
Здорові діти (n=35)	2,1±0,25	100	0	1,8±0,1

Примітка. * - $p < 0,001$ відносно показників в здорових дітей.

Виразність цитогенетичних змін була різною в залежності від ступеня тяжкості гострої пневмонії. Аналіз даних, наведених у таблиці 3.1, дозволив зробити висновок, що частота абераційних метафаз і середня кількість аберацій на клітину прогресивно збільшувались по мірі наростання ступеня тяжкості пневмонії. Так, при легкому перебігу гострої пневмонії частота абераційних метафаз у розпалі захворювання була вищою показника здорових дітей у 2,76 рази, а середня кількість аберацій на клітину виявилась вищою аналогічної норми у 1,89 рази ($p < 0,05$ в обох випадках). При середньотяжкому перебігу захворювання кратність збільшення вказаних показників проти показників здорових дітей склала 5,43 та 2,88 рази, тобто збільшилась вдвічі порівняно з показниками при легкому перебігу пневмонії. При тяжкому перебігу пневмонії частота абераційних метафаз перевищувала показник в групі здорових дітей у 8,19 рази, а середня кількість аберацій на клітину – у 3,61 рази. Вказані

показники перевищували такі у групі дітей з легким перебігом пневмонії у 2,97 і у 1,91 рази ($p < 0,05$ в обох випадках). Незалежно від ступеня тяжкості пневмонії, серед виявлених поломок хромосомного апарату лімфоцитів домінували хроматидні аберації. Однак по мірі збільшення тяжкості патологічного процесу питома вага хроматидних аберацій зменшувалась, тоді як частота хромосомних аберацій зростала. Так, якщо при легкому перебігу пневмонії на частку аберацій хроматидного типу прийшлося 98 %, то при середньотяжкому та тяжкому перебігу пневмонії, відповідно, 95 % та 92 %. В той же час, частота реєстрації аберацій хромосомного типу у дітей з тяжким перебігом пневмонії перевищувала аналогічний показник у групі дітей з легким перебігом пневмонії у 4,0 рази.

В періоді реконвалесценції рівень цитогенетичних порушень у обстежених дітей знижувався (таблиця 2).

Таблиця 2. Результати цитогенетичних досліджень у дітей, хворих на гостру пневмонію, при виписці з стаціонару

Показники (кількість обстежених дітей)	Частота абераційних метафаз (%)	Типи аберацій, %		Середня кількість аберацій на клітину, у.о.
		хроматидні	хромосомні	
Вся група хворих дітей (n=90)	4,6±0,14*	98	2	3,5±0,1*
Легкий перебіг (n=36)	3,9±0,17*	99	1	2,8±0,14*
Середньотяжкий перебіг (n=34)	4,6±0,12*	98	2	3,5±0,15*
Тяжкий перебіг (n=20)	5,4±0,2*	97	3	4,1±0,12*
Здорові діти (n=35)	2,1±0,25	100	0	1,8±0,1

Примітка. * - $p < 0,001$ відносно показників в здорових дітей.

Як виявилось, у загальній групі хворих дітей середня частота абераційних метафаз та середня кількість аберацій на клітину були у 2,5 і в 1,43 рази меншими, ніж в гострому періоді ($p < 0,05$ в обох випадках). В той же час, вказані показники перевищували аналогічні у групі здорових дітей у 2,19 та в 1,94 рази, тобто, не дивлячись на ліквідацію основних симптомів захворювання, в періоді реконвалесценції поломки хромосомного апарату

зберігались, що можна розцінити як незавершеність патологічного процесу.

Відносно типів аберацій, виявлених в періоді реконвалесценції, слід відмітити переважну реєстрацію хроматидних дефектів (98 % проти 2 % для аберацій хромосомного типу).

Аналіз виразності цитогенетичних порушень в періоді реконвалесценції в залежності від ступеня тяжкості пневмонії дозволив відмітити наступне. У

реконвалесцентів після легкого перебігу пневмонії рівень цитогенетичних зсувів був найменшим. Про це свідчили частота аберантних метафаз в середня кількість аберацій на клітину, які вірогідно відрізнялись від аналогічних показників у дітей з середньо-тяжким і тяжким перебігом пневмонії. Разом з цим, виявлені цитогенетичні порушення у реконвалесцентів після легкого перебігу пневмонії залишалися вірогідно більш високими, ніж аналогічні показники в групі здорових дітей. Так, частота аберантних метафаз у даного контингенту реконвалесцентів перевищувала показник здорових дітей у 1,86 рази, а середня кількість аберацій на клітину – у 1,56 рази ($p < 0,05$ в обох випадках).

У групі дітей, які перенесли пневмонію в середньо-тяжкій формі, кратність перевищення норми склала 2,19 рази для частоти аберантних метафаз і 1,94 рази для середньої кількості аберацій на клітину. В групі дітей, які перенесли тяжку форму пневмонії, ступінь збільшення аналогічних показників склала 2,57 і 2,28 рази відповідно.

У реконвалесцентів, які перенесли середньо-тяжкий та тяжкий перебіг пневмонії, також, як і у

реконвалесцентів з легким перебігом хвороби, домінуючим типом аберацій були хроматидні. На частку хроматидних аберацій приходилось 1-3 % в залежності від ступеня тяжкості пневмонії.

Висновки:

1. У дітей, хворих на гостру пневмонію, має місце порушення хромосомного апарату лімфоцитів периферійної крові, що має прояв у збільшенні частоти аберантних метафаз і кількості аберацій на клітину. Домінуючим типом аберацій є хроматидні.

2. Хроматидні аберації лімфоцитів здебільшого представлені поодинокими фрагментами та обмінами, тоді як аберації хромосомного типу – парними фрагментами, дицентриками, центричними і ацентричними кільцями.

3. Кількість цитогенетичних аберацій збільшується в гострому періоді пневмонії та знижується в періоді реконвалесценції. Кількість хромосомних аберацій залежить від важкості захворювання. Найзначніші порушення хромосомного апарата лімфоцитів зареєстровані у дітей з тяжким перебігом пневмонії.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Волосовець О.П., Кривопустов С.П.** До питання розробки протоколу антимікробного лікування пневмоній у дитячому віці // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2002. – № 2. – С. 24-25.
2. **Гайдаш І.С.** Иммунопатология и иммунокоррекция пневмоний / И.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, И.А. Лавринчук. – Луганск. – 1998. – 142 с.
3. **Гайдаш І.А.** Показники гуморального імунітету в дітей, хворих на пневмонії / І.А. Гайдаш // Український медичний альманах. – 2007. – № 2. – С. 42-45.
4. **Гайдаш І.А.** Стан метаболічних показників у дітей, хворих на пневмонії / І.А. Гайдаш // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2007. – № 1. – С. 31-33.
5. **Давидчук Г.М.** Иммуные и метаболические нарушения у детей, больных пневмонией, и их коррекция: монографія / Г.М. Давидчук, В.В. Флегонтова, Н.Б. Пилькевич, И.А. Гайдаш, С.Ю. Козина. – Луганск: СПД Резников В.С., 2009. – 116 с.
6. **Давидчук Г.М.** Цитогенетичні, імунні, метаболічні та мікроциркуляторні порушення у дітей, хворих на гостру пневмонію: монографія / Г.М. Давидчук, В.В. Флегонтова, Н.Б. Пилькевич, І.А. Гайдаш. – Луганськ: СПД Резников В.С., 2010. – 108 с.
7. **Жирнов В.А.** Факторы риска формирования респираторной патологии у детей / В.А. Жирнов // Практическая медицина. – 2008. – № 6. – С. 42-43.
8. **Козина С.Ю.** Метаболические нарушения у детей 2-5 лет, больных пневмонией, и их коррекция с использованием препарата «Три-Ви-Плюс» / С.Ю. Козина // Украинский медицинский альманах. – 2008. – № 6. – С. 82-85.
9. **Марушко Ю.В., Десятник Д.Г.** Клиническая характеристика и особенности диагностики пневмоний, вызванных атипичными возбудителями у детей // Современная педиатрия. – 2004. – № 1. – С. 37-40.
10. **Pelton S.I., Hammerschlag M.R.** Overcoming current obstacles in the management of bacterial community-acquired pneumonia in ambulatory children // Clinical Pediatrics (Philadelphia). – 2005. – № 1. – P. 1-17.

Гайдаш І.А. Цитогенетична аберация лімфоцитів крові дітей хворих позалікарняною пневмонією // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 44-46.

У дітей хворих гострою позалікарняною пневмонією різного ступеня тяжкості виявлена цитогенетична аберация лімфоцитів периферичної крові. Домінуючим типом аберацій були хроматидні. Кількість цитогенетичної аберації в лімфоцитах хворих дітей була найбільшою в гострому періоді пневмонії і збільшувалася із зростанням ступеня тяжкості захворювання.

Ключові слова: цитогенетична аберация, лімфоцити, пневмонія.

Гайдаш І.А. Цитогенетические aberrации лимфоцитов крови детей больных внебольничной пневмонией // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 44-46.

У детей больных острой внебольничной пневмонией разной степени тяжести выявлены цитогенетические aberrации лимфоцитов периферической крови. Доминирующим типом aberrаций были хроматидные. Количество цитогенетических aberrаций в лимфоцитах больных детей было наибольшим в остром периоде пневмонии и увеличивалось с возрастанием степени тяжести заболевания.

Ключевые слова: цитогенетические aberrации, лимфоциты, пневмония.

Gaidash I.A. Cytogenetical aberrations blood lymphocytes of children which ill out-hospital pneumonia // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 44-46.

The children ill with acute out-hospital pneumonia with different degrees of the weight was discovered cytogenetical aberrations in lymphocytes of peripheral blood. The chromatidic aberrations were prevailed. A number cytogenetical aberrations in the lymphocytes of ill children was greatest in acute period of the pneumonia and was increased with the growth of degree weight pneumonia.

Key words: cytogenetical aberrations, lymphocytes, pneumonia.

Надійшла 08.09.2012 р.

Рецензент: проф. В.В.Флегонтова