

УДК: 576.316.33:616.24-002-053.2

© Гайдаш І.А., 2012

СЕСТРИНСЬКІ ХРОМАТИДНІ ОБМІНИ В ЛІМФОЦИТАХ ДІТЕЙ ХВОРИХ НА ПОЗАШПИТАЛЬНІ ПНЕВМОНІЇ

Гайдаш І.А.

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

При пневмонії дія інфекційного, токсичного фактора, гіпоксії створює умови для посилення перекисного окислювання ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран, активації ендогенних фосфоліпаз, пригнічення ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) [2, 3, 5].

Інтенсивність ПОЛ приймає участь у регульованні функціональної активності хроматину, у тому числі і хроматину імунокомпетентних 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 примідиновими азотистими основами і SH-групами протеїнів хроматину, завдяки чому виникають порушення у системі ексцизної репарації і мутагенні зміни [2, 4].

Індукція аберацій хромосом і сестринських хроматидних обмінів (СХО) стимулюється в культурах клітин після обробки їх ксантинооксидазою і ксантином – системою, яка генерує супероксидні радикали і H_2O_2 . Напроти, кількість аберацій хромосом знижується в присутності супероксиддисмутази і каталази – ключових ферментів системи АОЗ [4, 6].

Інтенсивність виникнення СХО у лімфоцитах периферійної крові дітей хворих на пневмонію раніше не досліджувалася.

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 у 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. 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 фікол-

верографін з наступним лізисом еритроцитів льодяним розчином амонію хлорид. Суцільну кров, розведену 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: $V=(a/40-1)*c$, де a - кількість лімфоцитів у камері Горяєва; c - кількість суспензії клітин, які залишились у пробірці; V - 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 видалення надосадової рідини клітинну вивіть 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 незжирене охолоджене предметне скельце, висушували препарат і фарбували азур-скельце. Урахування результатів проводили за допомогою імерсійної системи світлового мікроскопа. Числові аномалії каріотипу аналізували за критеріями, запропонованими Н.П. Бочковим і співавторами (1972) [1]. Вивчення сестринських хроматидних обмінів (СХО) проводили шляхом додавання 5-бромдеоксиридину до культури лімфоцитів за 28-30 годин до їх фіксації, в кінцевій концентрації 10 мкг/мл. Після отримання препаратів хромосом за загальноприйнятою методикою їх на 10 хвилин приміщали до водяного розчину акридину оранжевого (10 М), промивали водою та висушували. Потім препарати прикривали тонким шаром 0,07 М розчину Na_2HPO_4 та опромінювали 15 хвилин ультрафіолетовою лампою СВД-120А на відстані 30-40 см, після чого препарати промивали в проточній воді та обробляли насиченим розчином барію гідрооксиду при 20-22°C протягом 5

хвилин. Далі препарати промивали, висушували, фарбували протягом 15-20 хвилин 2 % розчином Гімзи, приготованим на фосфатному буфері (рН=6,8). Аналіз кількості СХО проводили під мікроскопом з імерсійною системою.

Отримані результати та їх обговорення.
Аналіз мутагенних процесів у хромосомному апараті лімфоцитів периферійної крові дітей, хворих на гостру пневмонію, проводили на основі рахунку кількості СХО на клітину (таблиця 1).

Таблиця 1. Кількість сестринських хроматидних обмінів на клітину при гострій пневмонії у дітей

| Показники (кількість обстежених дітей) | Розпал хвороби | Реконвалесценція |
|--|----------------|------------------|
| Вся група хворих дітей (n=67) | 23,8±0,9* | 16,9±0,7* |
| Легкий перебіг (n=23) | 15,7±0,8* | 13,3±0,4* |
| Середньотяжкий перебіг (n=24) | 24,4±1,0* | 17,5±0,5* |
| Тяжкий перебіг (n=20) | 31,3±1,3* | 19,8±0,7* |
| Здорові діти (n=35) | 10,0±0,5 | |

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

Встановлено, що при гострій пневмонії відбувається активація мутагенезу, що має прояв у збільшенні кількості СХО на клітину. В загальній групі дітей, хворих на пневмонію, у розпалі захворювання кількість СХО перевищувала показник у групі здорових дітей у 2,38 рази. При цьому виразність мутагенних процесів залежала від ступеня тяжкості гострої пневмонії і була найбільшою у дітей, які перенесли тяжкий перебіг захворювання. У даного контингенту пацієнтів кратність перевищення кількості СХО на клітину склала 3,13 рази порівняно з аналогічними показником в групі здорових дітей, а також виявилась у 1,28 рази і у 1,99 рази вищою порівняно з кількістю СХО при середньотяжкому і тяжкому перебігу пневмонії відповідно.

В групі дітей із середньотяжким перебігом пневмонії рівень СХО перевищував показник здорових дітей у 2,44 рази, а у дітей з легким перебігом захворювання аналогічне переважання склало 1,57 рази (p<0,05 в обох випадках). Повторне дослідження кількості СХО на клітину в фазі реконвалесценції дозволило відмітити зниження інтенсивності мутагенних процесів. Як виявилось, в загальній групі обстежених реконвалесцентів середня кількість СХО на клітину була у 1,41 рази нижчою, ніж в гострому періоді пневмонії (p<0,01). В той же час, зареєстрований рівень СХО у дітей, які перенесли захворювання, залишався вірогідно вищим аналогічного показника в групі здорових дітей (кратність превалювання – 1,69 рази).

Виразність залишкових змін СХО в періоді реконвалесценції була різною залежно від ступеня тяжкості перенесеної пневмонії. Так, в групі дітей з легким перебігом захворювання серед-

ня кількість СХО на клітину виявилась вищою показника в здорових дітей у 1,33 рази (p<0,05). Порівняно з аналогічним показником в гострому періоді захворювання, кількість СХО на клітину зменшилась на 18 %.

В групі дітей, які перенесли пневмонію середнього ступеня тяжкості, середній рівень СХО на клітину перевищував такий в групі здорових дітей у 1,75 рази, та був вищим, ніж у реконвалесцентів після легкого перебігу пневмонії у 1,32 рази. Порівняно з рівнем СХО у гострому періоді, кількість хромосомних обмінів в фазу реконвалесценції знизилась у 1,39 рази (p<0,05).

В групі дітей, які перенесли тяжкий перебіг пневмонії, середній рівень СХО перевищував показник в здорових дітей у 1,98 рази, а також виявився вищим на 13 % порівняно з рівнем СХО у реконвалесцентів після середньотяжкого перебігу пневмонії. Порівняно з кількістю СХО, встановленою в гострому періоді хвороби, кратність зниження даного показника в фазу реконвалесценції склала 1,58 рази (p<0,05).

Отримані результати дозволили відмітити, що відносно високий залишковий рівень СХО в лімфоцитах крові дітей, які перенесли пневмонію, свідчить про незавершеність патологічного процесу і необхідність корекції цитогенетичних змін.

Аналіз цитогенетичних змін у дітей, хворих на гостру пневмонію, проведений в залежності від віку дітей, наведений в таблиці 2. Як показав проведені дослідження, суттєво вищий рівень цитогенетичних порушень мав місце у групі дітей молодшого віку (від 2 років до 5 років 11 місяців і 29 днів).

Таблиця 2. Кількість сестринських хроматидних обмінів на клітину при гострій пневмонії у дітей молодшої та старшої вікових груп, M±m

| Показники (кількість обстежених дітей через дріб) | Розпал хвороби | Реконвалесценція |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Вся група хворих дітей | 26,44±1,06* 21,16±0,84* | 18,14±0,73* 15,59±0,62* |
| Легкий перебіг (n=18/18) | 18,14±0,73* 13,26±0,52* | 14,73±0,59* 11,87±0,47* |
| Середньотяжкий перебіг (n=17/17) | 26,72±1,04* 22,08±0,85* | 18,47±0,74* 16,53±0,66* |
| Тяжкий перебіг (n=10/10) | 34,46±1,37* 28,14±1,12* | 21,23±0,85* 18,37±0,73* |
| Здорові діти (n=17/18) | 11,73±0,47 8,25±0,33 | |

Примітки: В чисельнику – діти від 2 років до 5 років 11 місяців і 29 днів, у знаменнику – діти 6-14 років. * - p<0,05 відносно показників в здорових дітей. ` - p<0,05 при порівнянні показників молодшої та старшої груп дітей.

Відмічена особливість простежувалась як в періодах розпаду хвороби і реконвалесценції, так і

при різних ступенях її тяжкості. Дана обставина в певній мірі пояснює більш тяжкий клінічний пере-

біг пневмонії у дітей молодшої вікової групи порівняно з таким у дітей старшого віку.

В загальній групі дітей молодшого віку частота СХО в гострому періоді пневмонії перевищувала аналогічний показник в групі дітей 6-14 років у 1,25 рази ($p < 0,05$). Відмічена особливість мала місце при різних ступенях тяжкості гострої пневмонії. Так, кратність переважаючої кількості СХО в групі хворих дітей молодшого віку над аналогічним показником у хворих дітей 6-14 років при легкому перебігу пневмонії в гострому періоді склала 1,37 рази, при середньотяжкому і тяжкому перебігу – 1,21 та 1,26 рази відповідно ($p < 0,05$ в усіх випадках). Поряд з цим, отримані результати дослідження мали вірогідні відмінності з відповідними віковими показниками в групі здорових дітей.

Більш виразні залишкові порушення в хромосомному апараті лімфоцитів у дітей молодшої вікової групи реєстрували і в періоді реконвалесценції. Як виявилось, у загальній групі реконвалесцентів молодшого віку кількість СХО на клітину перевищила у 1,16 рази показник у дітей старшого віку ($p < 0,05$).

Кратність переважаючої кількості СХО на клітину в групі реконвалесцентів молодшого віку над аналогічним показником у дітей 6-14 років склала 1,24 рази, після середньотяжкого і тяжкого перебігу пневмонії – 1,12 та 1,16 рази відповідно ($p < 0,05$ в усіх випадках порівняння). Результати дослідження СХО в періоді реконвалесценції, незалежно від вікової групи дітей, вірогідно перевищували такі в групі здорових дітей відповідного віку.

Висновки:

1. Розвиток пневмонії у дітей супроводжується підвищенням кількості СХО у лімфоцитах периферійної крові. Найбільша кількість СХО має місце у гострому періоді хвороби, і зменшується у періоді реконвалесценції.

2. Мутагенні процеси більш активніше проходять у лімфоцитах хворих на пневмонію дітей молодшого віку (від 2 до 5 років), ніж у дітей старшої вікової групи (6-14 років).

3. Кількість СХО у лімфоцитах периферійної крові дітей хворих на пневмонію зростає з підвищенням важкості захворювання.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Авербах М.М., Мороз А.М., Апт А.С.** Иммуногенетика инфекционных заболеваний. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
2. **Гайдаш И.С.** Иммунопатология и иммунокоррекция пневмоний / И.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, И.А. Лавринчук. – Луганск. – 1998. – 142 с.
3. **Давидчук Г.М.** Имунные 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.
4. **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.

5. **Козина С.Ю.** Метаболические нарушения у детей 2-5 лет, больных пневмонией, и их коррекция с использованием препарата «Три-Ви-Плюс» / С.Ю. Козина // Український медичний альманах. – 2008. – № 6. – С. 82-85.

6. **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. Сестринські хроматидні обміни в лімфоцитах дітей хворих на позашпитальні пневмонії // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 6. – С. 33-35.

Розвиток пневмонії у дітей супроводжується підвищенням кількості СХО у лімфоцитах периферійної крові. Найбільша кількість СХО має місце у гострому періоді хвороби, і зменшується у періоді реконвалесценції. Мутагенні процеси більш активніше проходять у лімфоцитах хворих на пневмонію дітей молодшого віку (від 2 до 5 років), ніж у дітей старшої вікової групи (6-14 років). Кількість СХО у лімфоцитах периферійної крові дітей хворих на пневмонію зростає з підвищенням важкості захворювання

Ключові слова: сестринські хроматидні обміни, лімфоцити, пневмонія

Гайдаш И.А. Сестринские хроматидные обмены в лимфоцитах детей больных внебольничной пневмонией // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 6. – С. 33-35.

Развитие пневмонии у детей сопровождается повышением количества СХО в лимфоцитах периферийной крови. Наибольшее количество СХО имеет место в остром периоде болезни, и уменьшается в периоде реконвалесценции. Мутагенные процессы более активнее проходят в лимфоцитах больных пневмонией детей младшего возраста (от 2 до 5 лет), чем у детей старшей возрастной группы (6-14 лет). Количество СХО в лимфоцитах периферийной крови детей больных пневмонией растет с повышением тяжести заболевания

Ключевые слова: сестринские хроматидные обмены, лимфоциты, пневмония.

Gaidash I.A. Sisters chromatid exchanges in lymphocytes of children with community-acquired pneumonia // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 6. – С. 33-35.

Development of pneumonia in children accompanied by an increase in the number of SHO peripheral blood lymphocytes. The largest number of SHO occurs in acute illness, and decreases in the period of convalescence. Mutagenic processes are more active in lymphocytes of patients with pneumonia of young children (2 to 5 years) than in children older age group (6-14 years). Number SHO in peripheral blood lymphocytes of children with pneumonia increases with disease severity.

Key words: sisters chromatid exchanges, lymphocytes, pneumonia.

Надійшла 20.10.2012 р.
Рецензент: проф. Н.К.Казимірко