

© Н.В. Чернюк, С.Б. Геращенко, Л.Є. Ковальчук

УДК 575+591.87+616.233-002+616.12-008.331.1

Н.В. Чернюк, С.Б. Геращенко, Л.Є. Ковальчук

МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН І ФУНКЦІОНУВАННЯ ХРОМАТИНУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ОБСТРУКТИВНОМУ ЗАХВОРЮВАННІ ЛЕГЕНЬ ПОЄДНАНОМУ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет" (м. Івано-Франківськ)

Дана робота є фрагментом НДР "Генофонд населення Прикарпаття: вплив еколого-географічних, соціально-економічних факторів на його структуру та формування здоров'я людей" № держреєстрації 0108U008811; Фінансування МОЗ України, код 2301020 "Фундаментальні дослідження у сфері профілактичної та клінічної медицини".

Вступ. Впродовж останніх років в усьому світі зареєстровано вірогідне збільшення питомої ваги хворих з поєднаною соматичною патологією, зокрема хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ) та артеріальною гіпертензією (АГ) [7]. Поєднання окремих захворювань зумовлено подібністю факторів ризику, патогенетичних ланок та може вказувати на можливість участі спільних генів схильності в розвитку патологічних складових і у формуванні конкретної синтропії [8]. Оскільки робочою одиницею системних патологій є клітина, життєдіяльність якої визначає клітинний геном і його морфо-функціональний субстрат ДНК, вивчення структури генів та епігенетичної регуляції є вкрай актуальним [9]. Застосування методів молекулярної медицини дало змогу отримати інформацію про різноманітні поліморфізми генів схильності до мультифакторних захворювань [1]. Однак широкого клінічного впровадження ці методики не набули через високу вартість, відсутність відповідного обладнання та кваліфікованих спеціалістів у кожному медичному закладі. Тому ведеться пошук способів оцінки інтегральних показників морфо-функціонального стану спадкового апарату, доступних клінічним лабораторіям, матеріально необтяжливих та достовірних. Проведені нами дослідження інтерфазних ядер соматичних клітин показали, що більша частина молекулярної основи тканинно-специфічної експресії генів (активації/інактивації) пов'язана з деталями структури хроматину [2, 5]. Його перехід в різні стаціонарні стани конденсації визначає спектри транскрипції, функціональний стан геному (ФСГ). Враховуючи вищесказане, актуальність роботи зі встановлення динаміки інтерфазного хроматину, зумовленої порушенням генних комплексів, при ХОЗЛ поєднаному з АГ не викликає сумніву.

Мета дослідження – встановлення цитоденситометричних маркерів ступеня тяжкості ХОЗЛ поєданого з АГ та можливості компенсаторних змін на клітинному рівні.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження слугували цитологічні препарати епітеліальних клітин слизової оболонки ротової порожнини

(СОРП) 72 хворих (46 чоловіків і 26 жінок) на ХОЗЛ поєдане з АГ II стадії. Особливості забору матеріалу, виготовлення препаратів описані в наших попередніх роботах [4]. Хроматин ядер і його зміни вивчені за допомогою напівавтоматичного аналізатора зображень на базі програмного забезпечення Image Tool for Windows (v 3.0). Перевага даного методу полягає у можливості комбінованої оцінки морфометричних (площа, периметр), спектрометричних (оптична та інтегральна щільність) даних із аналізом мікроанатомії окремих хроматинових блоків і функції хроматину одночасно. Для визначення кореляції останньої з епігенетичними ефектами проаналізовано чотири індекси функціонального стану геному: хроматизації (IX), статевого хроматину (СХ), ядерцевий (ЯІ) та патологічних ядер (ПЯ) з позицій формування цитофенотипу. Статистична обробка результатів проводилась за допомогою пакету програм Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення.

Сотні клітинних типів, розподілених між органами, містять у кожній клітині ідентичну кількість ДНК з унікальними зразками експресії генів, що зумовлено різними способами упакування ДНК з хромосомними білками (тобто формуванням хроматину) [3, 6]. З урахуванням структури останнього нами проаналізовано цитогенетичні показники епітеліоцитів СОРП. В процесі розвитку ХОЗЛ поєданого з АГ виявлено суттєві перебудови інтерфазного хроматину на рівні окремих компонентів і ядра в цілому (**табл.**).

Встановлено вірогідне збільшення периметру і площі ядер епітеліоцитів СОРП при всіх стадіях ХОЗЛ, однак найістотнішими були зміни в пацієнтів з II і IV стадіями захворювання. Спостерігалися особливості інтегральної оптичної щільності хроматину при різній тяжкості перебігу ХОЗЛ. Так, у випадку I стадії зафіксовано навіть зниження цього показника порівняно з контролем, при II і III – загальний рівень конденсації хроматину був майже однаковим. Аналогічна картина спостерігалася щодо співвідношення ядер з перевагою гетеро- до таких з еухроматином. Як і у випадку топографії та щільності інтерфазного хроматину, ідентифікованих в ядрах нейтрофілів [5], нами було визначено його чотири компоненти: q1 – неактивний гранулярний гетерохроматин (найтемніший компонент), q2 – більш активний гетерохроматин (перигранулярний компонент), q3 і q4 – еухроматин (менш і більш світлі компоненти відповідно).

Зміни морфометричних показників і топографії інтерфазного хроматину епітеліоцитів слизової оболонки ротової порожнини хворих на хронічне обструктивне захворювання легень поєднане з артеріальною гіпертензією, $M \pm m$

Параметр	Контрольні показники	Хворі на хронічне обструктивне захворювання легень			
		I стадія	II стадія	III стадія	IV стадія
Периметр ядра, мкм	29,14±1,12	35,65±0,47 p<0,05	37,22±2,84 p<0,05	36,46±2,80 p<0,05	37,72±1,91 p<0,05
Площа ядра, мкм ²	57,48±4,50	79,25±3,10 p=0,05	90,69±5,86 p<0,01	87,08±6,80 p<0,05	94,45±6,21 p<0,01
Інтегральна оптична щільність	156,41±2,31	151,46±2,75	160,27±6,93	160,50±7,89 p>0,05	162,63±5,93 p<0,05
Мінімальна оптична щільність	136,14±2,78	129,63 ±7,01	138,84±8,88	140,65±9,30	139,94±8,86
Максимальна оптична щільність	185,38±1,50	191,45±4,56	197,12±6,70	188,68±9,79	194,22±8,74
Діапазон мінливості оптичної щільності	49,54	61,82	58,28	48,03	54,28
Відношення гетерохроматину до еухроматину, ум.од.	1,22±0,02	1,39±0,12	1,59±0,14 p<0,05	1,60±0,09 p<0,05	1,66±0,01 p<0,05

Примітка: p – до величини у здорових.

Порівнянням мінімальної та максимальної інертності хроматину встановлено найбільший діапазон мінливості при I і II стадіях ХОЗЛ. Тяжкий перебіг ХОЗЛ зумовлений тим, що при зменшенні периметру і площі ядер знижувався діапазон мінливості оптичної щільності. Отриманий факт засвідчує обмеження компенсаторних можливостей відновлення стабільності геному. Незворотне вірогідне зниження активності ядерних структур визначено при IV стадії ХОЗЛ поєданого з АГ.

Таким чином, встановлено збільшення периметру і площі ядер епітеліоцитів, функціональної неоднорідності клітин у пацієнтів з ХОЗЛ та при поєднанні з АГ порівняно з такими у здорових людей. Прогресування конденсації хроматину за рахунок збільшення компонентів q1, q2 в диференційованих епітеліальних клітинах в процесі розвитку захворювання зумовлює зміни транскрипції генів, залежно від тяжкості перебігу хвороби. Збільшені кількісні показники динаміки стану хроматину (інтегральна оптична щільність і співвідношення гетеро- до еухроматину) відображають знижену здатність до репараційних процесів при ХОЗЛ та при поєднанні його з АГ.

Проблема інтерпретації змін топографії та функціонування хроматину в пацієнтів з ХОЗЛ і АГ має ті самі труднощі, як і проблема інтерпретації темних клітин: це результат некротичних чи апоптотичних змін? Відповідь на це питання вимагала детального аналізу кожного компоненту (q1-q4) хроматину. Ріст співвідношення гетеро- до еухроматину в тих ядрах, де площа суттєво не змінювалася, можна пояснити як проапоптотичний стан. У клітинах, ядра яких містять переважно q1 компонент хроматину і різко просвітлену каріоплазму, ймовірно припустити некротичні зміни після завершення ними функціональної програми. Ще одним суттєвим моментом була відсутність реакції з боку морфологічних параметрів

мобільного гетерохроматину (q2). Саме такі епітеліоцити зустрічалися при тяжкому перебігу і IV стадії ХОЗЛ поєданого з АГ, а їхня частота корелювала з такою патологічних ядер. Виявлення понад 10% подібних клітин може бути цитологічним маркером низької репараційної здатності ДНК, завершення функціональної реакції і запуску апоптозу.

Неможливість реалізації динамічних переміщень локусів хромосом в просторі ядер клітин (через невідповідне їх збільшення), необхідних для безпомилкової репарації ДНК, є інтегральною ознакою потенційної нестабільності геному, тобто ризику виникнення коморбідної патології при ХОЗЛ. В ядрах епітеліальних клітин хворих з I-II стадіями ХОЗЛ поєданого з АГ хроматин знаходився у диспергованому вигляді, коли хромосоми деспіралізовані, а клітина перебувала в активному стані. Окрім того, в деяких ядрах диференціювалися ядерця. Вони прилягали переважно до щільного хроматину (місця їх синтезу). Як і в здорових людей, при ХОЗЛ і АГ ідентифікувалися кілька типів ядерець: компактні великих розмірів; нуклеонемні – великі з чітко вираженою нитчастою структурою; кільцеподібні – зі світлою серцевиною, щільною периферією. Іноді траплялися мікроядра (до 1 мкм в діаметрі). Оскільки морфологічним відображенням транскрипції рибосомних генів у клітині є такі параметри нуклеогенезу як кількість, розміри і розподіл ядерець, збільшення останніх у випадку легкого перебігу ХОЗЛ може засвідчувати активацію трансляції за відсутності невеликої кількості іРНК. В епітеліоцитах хворих на ХОЗЛ з тяжким перебігом частіше виявлялися ядра з конденсованим хроматином. При цьому зменшувалася об'єм ядер клітин, збільшувалася щільність упакування хроматину в просторі таких ядер. Це, своєю чергою, обмежує простір всередині ядра для переміщення і/або взаємодії окремих локусів хромосом

у цьому просторі. Показані обмеження можуть бути серйозною перешкодою для нормального функціонування генома і процесів його репарації [6,11].

Таким чином, зміни структури хроматину (компактизація – декомпактизація), які відображають перший етап реалізації генетичної інформації, залежать від тяжкості захворювання і доводять існування епігенетичного механізму, який контролює активність генів [10].

Стабільніший стан компактизації ДНК у жінок, порівняно з таким у чоловіків, може засвідчувати збереження оптимальнішого механізму регуляції генів. Доказом цього може бути рівень компактизації Х-хромосоми, пригнічення контролюючих сайтів якої істотніше у чоловіків. Інактивація єдиної Х-хромосоми, тобто показник СХ, у пацієнтів чоловічої статі збільшувався в 1,63 і в 1,96 рази відповідно при помірному і тяжкому перебігу ХОЗЛ порівняно з таким у здорових людей. Саме таким чином гетерохроматизація локусів, деякі з яких можуть мати важливе значення у регуляції генної експресії, веде до втрати контролю диференціації клітин, зміни метаболізму [3]. Дисрегуляторні процеси впродовж етапів реалізації генетичної інформації також присутні у жінок, хворих на ХОЗЛ, однак зменшення СХ достовірно лише при тяжкому перебігу хвороби.

Закономірним продовженням роботи було дослідження частоти ядер атипової форми. Серед них зустрічалися бобоподібні, лопатоподібні, з інвагінаціями каріолеми, вакуолізовані. Увага до даного показника зумовлена тим, що будь-які виражені зміни форми ядра визначаються зміщенням положення інтерфазних хромосом. Методами FISH-аналізу і конфокальної мікроскопії отримані карти трьохвимірного просторового розміщення хромосом в інтерфазному ядрі, показана їх стійка локалізація. Кожна хромосома має свою територію

в ядрі в деяких місцях плечі хромосом, теломерні і центромерні ділянки кожної з хромосом з'єднані з каріолемою [5]. Тому зміни останньої можуть бути результатом хромосомних аберацій в мітозі або порушенням веретена поділу й анеуплоїдії. Враховуючи механізм утворення клітин з атипovими ядрами, їх, ймовірно, також можна віднести до показників цитогенетичної дії запального фактора. Збільшення індексу ПЯ, залежне від тяжкості перебігу ХОЗЛ поєданого з АГ доповнює результати морфоденситометричних досліджень і корелює з отриманими вище показниками.

Таким чином, зміни структури хроматину (компактизація – декомпактизація), які відображають перший етап реалізації генетичної інформації, залежать від тяжкості ХОЗЛ поєданого з АГ і доводять існування епігенетичного механізму, який контролює активність генів.

Висновки.

1. Комплексне визначення всіх цитоденситометричних показників (периметру, площі, інтегральної оптичної щільності і розподілу типів хроматину) соматичних клітин СОРП служить об'єктивним критерієм порушення епігенетичних механізмів регуляції активності експресії генів при ХОЗЛ поєданому з АГ.

2. Зміни структури хроматину (компактизація – декомпактизація), які відображають перший етап реалізації генетичної інформації, залежать від тяжкості перебігу ХОЗЛ поєданого з АГ.

3. Встановлені кореляційні взаємозв'язки між індексами функції генома та цитоденситометричними показниками доводять універсальність взаємозв'язків геному та епігеному клітин.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні взаємозв'язків між морфоденситометричними параметрами, кініновим статусом організму.

Список літератури

1. Баранов В.С. Тестирование генов системы детоксикации в профилактике некоторых мультифакториальных болезней [Текст] / В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко, Е.В. Баранова // Журн. акушерства и женских болезней. – 2003. – Т.52, №2. – С.11-16.
2. Гвоздев В.А. Гетерохроматин и его функциональные характеристики [Текст] / В.А. Гвоздев, Л.А. Усакин, Г.Л. Коган // Медицинская генетика. – 2003. – №7. – С.290-296.
3. Исследование оптических параметров ядрышек при действии ингибиторов транскрипции методом когенетной фазовой микроскопии [Текст] / В.П. Тынчинский, А.В. Кретушев, И.В. Клемушев, Т.В. Вышенская и др. // Бюл. экспер. биол. – 2006. – Т.142, №10. – С.465-470.
4. Ковальчук Л.Є. Цитогенетичне дослідження соматичних клітин бронхоальвеолярної лаважної рідини та слизової оболонки ротової порожнини у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень [Текст] / Л.Є. Ковальчук, Н.В. Чернюк // Вісник проблем біології і медицини (Полтава). – 2006. – №2. – С.50-54.
5. Тепляков А.И. Топография интерфазного хроматина нейтрофильных гранулоцитов при атеросклерозе: еще одно подтверждение экспрессии генов для завершения ими функциональной программы [Текст] / А.И. Тепляков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – №2. – С.40-43.
6. Управляющая динамика хроматина в ядрах клеток эукариотов, проблема нестабильности хромосом и репарации двойных разрывов ДНК [Текст] / Д.М. Спитковский, Н.Н. Вейко, О.С. Моисеева, А.В. Ермаков [и др.] // Медицинская генетика. – 2002. – Т.4, №11. – С.494-504.
7. Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания [Текст] / А.Г. Чучалин // Пульмонология. – 2008. – №2. – С.5-14.
8. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания [Текст] / Е.И. Шмелев // Пульмонология. – 2007. – №2. – С.5-9.
9. Hendrich B. Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification / B. Hendrich, W. Bickmore // Hum. Mol. Genet. – 2001. – Vol. 10. – P.2233-2242.
10. Lippman Z. The role of RNA interference in heterochromatic silencing / Lippman Z., Martienssen R. // Nature. – 2004. – Vol. 431. – P. 364-370.
11. Micro-organization and visco-elasticity of the interphase nucleus revealed by particle nanotracking / V. Tseng, J.S. Lee, T.P. Kole, L. Jiang, D. Wirtz // J.Cell Sci. – 2004. – Vol. 17. – P.2159-2167.

УДК 575+591.87+616.233-002+616.12-008.331.1

МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН І ФУНКЦІОНУВАННЯ ХРОМАТИНУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ОБСТРУКТИВНОМУ ЗАХВОРЮВАННІ ЛЕГЕНЬ ПОЄДНАНОМУ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

Чернюк Н.В., Геращенко С.Б., Ковальчук Л.Є.

Резюме. Проведено аналіз морфоденситометричних показників ядер епітеліоцитів (периметру, площі, інтегральної оптичної щільності хроматину) та динаміки конденсації хроматину в 72 хворих на хронічне обструктивне захворювання легень поєднане з артеріальною гіпертензією та 78 здорових людей. Встановлено збільшення площі та периметру ядер, функціональної неоднорідності клітин, прогресування гетерохроматизації ядер залежно від ступеня тяжкості хвороби. Кореляції між компактизацією хроматину і гетерохроматизацією X-хромосоми довели порушення оптимального контролю експресії генів. Зростання діапазону мінливості оптичної щільності хроматину при легкому перебігу захворювання засвідчили можливість репараційних процесів на клітинному рівні. Пригнічення компенсаторних механізмів при III і IV стадіях хронічного обструктивного захворювання легень поєданого з артеріальною гіпертензією виявлялося високою частотою патологічних ядер і посиленням компактизації хроматину.

Ключові слова: денситометрія, конденсація хроматину, експресія генів, хронічне обструктивне захворювання легень, артеріальна гіпертензія

УДК 575+591.87+616.233-002+616.12-008.331.1

МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ СОЧЕТАННОЙ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Чернюк Н.В., Геращенко С.Б., Ковальчук Л.Е.

Резюме. Проведен анализ морфоденситометрических показателей ядер эпителиоцитов (периметр, площадь, интегральная оптическая плотность хроматина) и динамики конденсации хроматина у 72 больных хронической обструктивной болезнью легких сочетанной с артериальной гипертензией и 78 здоровых людей. Установлено увеличение площади и периметра ядер, функциональной неоднородности клеток, прогрессирования гетерохроматизации ядер в зависимости от степени тяжести болезни. Корреляции между компактизацией хроматина и гетерохроматизацией X-хромосомы доказали нарушения оптимального контроля экспрессии генов. Увеличение диапазона изменчивости оптической плотности хроматина при легком течении заболевания указывают на возможность репарационных процессов на клеточном уровне. Угнетение компенсаторных механизмов при III и IV стадиях хронической обструктивной болезни легких сочетанной с артериальной гипертензией проявлялось высокой частотой патологических ядер и усилением компактизации хроматина.

Ключевые слова: денситометрия, конденсация хроматина, экспрессия генов, хроническая обструктивная болезнь легких, артериальная гипертензия

UDC 575+591.87+616.233-002+616.12-008.331.1

Morphodensitometric Markers Of Somatical Cells And Functioning Of Chromatin At Chronic Obstructive Pulmonary Disease Combined With A Arterial Hypertension

Chernyuk N. V., Geraschenko S.B., Kovalchuk L.Ye.

Summary. The analysis of morphodensitometric indexes of nuclei of epithelial cells (perimeter, area, integral absorbancy of chromatins) and loud speakers of condensation of chromatin was conducted at 72 patients with chronic obstructive pulmonary disease combined with a arterial hypertension and 78 healthy people. The increase of area and perimeter of nuclei, functional heterogeneity of cages, progress of heterochromatization kernels depending on the degree of disease was found. Correlations between a compactization chromatins and heterochromatization X-chromosome proved violations of optimum control of expression of genes. The increase of range of changeability of absorbancy of chromatins at the easy flow of disease is specified on possibility of repair processes at cellular level. Oppression of compensatory mechanisms at III and IV stages of severity of chronic obstructive pulmonary disease combined with a arterial hypertension showed up by high-frequency of pathological nuclei and strengthening of compactization chromatins.

Key words: densitometrie, condensation of chromatin, expression of genes, chronic obstructive pulmonary disease, arterial hypertension.

Стаття надійшла 28.07.2011 р.