

становление мембраны) положительный эффект наблюдается при совместном применении исследуемых комплексов (3-я группа животных), что свидетельствует о синергизме и взаимоусилении их действия.

Разработанный алгоритм позволяет вычислить коэффициенты пересчета долевого вклада (концентрации) каждого ДСПО в абсолютные значения ХЛ, которые возможно будет использовать для вычисления истинной ХЛ при работе с различными биологическими образцами. Однако на данном этапе это, по-видимому, нецелесообразно вследствие недостаточности выборки исследуемых групп и ограниченного спектра ДСПО. Кроме того, в приведенные расчеты для упрощения заложена линейная зависимость концентрации ДСПО и величины их ХЛ. В действительности, согласно нашим представлениям, значение ХЛ увеличивается/уменьшается при увеличении концентрации ДСПО не линейно, а по экспоненте или по S-образной функции. Однако для изучения явления ХЛ с точки зрения практического применения этого показателя для количественной оценки действия повреждающих факторов, а также протекторов ПОЛ, использование приведенного математического алгоритма может быть целесообразно.

Выводы

1. Разработан математический алгоритм вычисления значений истинной ХЛ, предусматривающий новый подход к оценке результатов измерения индуцированной ХЛ.

2. Обоснована необходимость постановки серии экспериментов с целью выявления зависимости величины индуцированной ХЛ от концентрации, вычисления коэффициентов ХЛ и создания формул расчета ХЛ для каждого ДСПО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Закс Л. Статистическое оценивание [Текст] / Л. Закс. Пер. с нем. В.Н. Варыгина. Под ред. Ю.П. Адлера. В.Г. Горского. – М.: Статистика, 1976. – 598 с. с ил.
2. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция. Лекции по биофизике / Ю.А. Владимиров. Московский государственный университет. Факультет фундаментальной медицины.
3. Токсические эффекты монацита и их торможение комплексом биопротекторов [Текст] / О.С. Еременко, Б.А. Кашнельсон, Л.И. Привалова, О.Г. Макеев, Т.Д. Дегтярева, О.Ю. Береснева, И.Е. Валамина, И.А. Миннигалиева, М.П. Сутункова и др. // Токсикологический вестник. – Екатеринбург, 2009, №4. С.5-11.
4. Шляпнотх В.Я. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических реакций [Текст] / В.Я. Шляпнотх. – М.: Наука, 1966. – 300 с.
5. Ястребов А.П. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст. [Текст] / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов. – Екатеринбург: ООО «Уральский следопыт», 2005. – 220 с.: ил.

О.Г. Макеев, П.А. Ошурков, В.А. Буханцев,
И.Х. Измайлов, Н.Н. Ванчугова, С.В. Костюкова

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ ГЕНОМА У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В г. АСБЕСТЕ

Уральская государственная медицинская академия

Уральский экономический регион по количеству вредных выбросов в атмосферу занимает первое место среди остальных регионов России, а на Свердловскую область приходится около трети всех выбросов Урала. В большинстве областных городов сложилась неблагоприятная экологическая обстановка, а такие города, как Екатеринбург, Каменск-Уральский, Кировград, Краснотурьинск, Первоуральск, Ревда, Серов близки к чрезвычайной экологической ситуации [7;10;22].

Не является исключением и город Асбест, в котором на фоне долговременного негативного воздействия на окружающую среду продолжается сверхнормативное загрязнение, связанное с основным городским производством – добычей хризотил-асбеста.

Понятие «асбест» - общий термин, данный группе минералов, кристаллы которых имеют волокнистую структуру. Термин «асбест» был принят только для целей коммерческого обозначения.

Шесть разновидностей асбеста берут начало от двух групп минералов, известных как серпентин (хризотил или белый асбест) и амфиболы (амозит или коричнево-зеленый асбест; крокидолит или синий асбест; антофиллит, тремолит и актинолит). В то время как все они являются силикатным минеральным сырьем, обе группы различаются по химическим и минералогическим свойствам. На сегодня только один минерал — хризотил добывается в неограниченном количестве [8]. Этот минерал является основным промышленным асбестом и представляет собой волокнистый гидросиликат магния [6].

Гидросиликат магния ($3\text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) по химическому составу близок известному минералу тальку ($3\text{MgO} \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), и с химической точки зрения безвреден для организма. Главными его составляющими являются диоксид кремния и оксид магния (до 45% и 42% соответственно) [6]. Остальные компоненты представлены в следовых количествах и не превышают 1-2 %. Кристаллы хризотил-асбеста имеют необычное строение: они представляют собой тончайшие полые трубочки-фибриллы диаметром $2,6 \cdot 10^{-5}$ мм и длиной до 2-3 см. После обогащения асбестовой породы собранные в пучки волокна диаметром 10-100 мкм имеют прочность на разрыв, сравнимую с прочностью лучших марок стали (1700-3700 МПа). Волокна имеют низкую теплопроводность (0,3-0,4 Вт/(м·К)), устойчивость к повышенным температурам (их структура не разрушается при нагревании до 500-600°C) [3]. Волокна обладают высокой стойкостью в щелочах, не разрушаются в воде. Они могут расщепляться (распушиваться) на тонкие, мягкие, гибкие и эластичные волокна, имеющие высокие

адгезионные, когезионные и прядильные свойства. Волокна асбеста имеют высокий коэффициент трения, электро- и радиационно-защитные свойства.

Благодаря своим уникальным характеристикам, хризотил-асбест получил широкое распространение. В настоящее время он используется в 65 странах, где проживает свыше 2/3 населения мира, с его применением изготавливается более трех тысяч наименований изделий. Хризотил-асбест содержат строительные элементы из асбестоцемента (более 75% добываемого в России и мире хризотилового асбеста), мусорные шахты, кровельные и потолочные асбестовые плиты, асбестокартон, асфальтовые и битумные продукты, огнеупорные двери, тормозные колодки, клей для плитки, фасадные краски, материалы для покрытия стен, изоляционные материалы, настилы, штукатурка, шпаклевка, массы для заделки швов, текстиль, картон, бумага, уплотнительные набивки, электроизоляционные материалы и многое другое.

В средствах массовой информации и в статьях публицистического характера можно встретить сведения о безвредности хризотил-асбеста для человека. В реальности дело обстоит несколько иначе.

Согласно оценкам ЦГСЭН по Свердловской области, количество дополнительных случаев заболеваний в Асбесте, обусловленных загрязнением окружающей среды, достигает 653 на 1 тыс. населения, в том числе у детей – 466, что составляет до 30-40% от общего уровня заболеваемости местного населения.

Известно, что асбестовая пыль может приводить к развитию пневмокониозов, обусловленных длительным вдыханием пыли и характеризующихся развитием диффузного интерстициального фиброза. Развитие пневмокониоза зависит от физико-химических особенностей вдыхаемой пыли [3].

Различают следующие основные виды пневмокониозов: силикоз и силикатозы, металлокониозы, карбокониозы, пневмокониозы от смешанной пыли (антракосиликоз, сидеросиликоз и др.), пневмокониозы от органической пыли. Клиническая картина пневмокониозов имеет ряд сходных черт: медленное, хроническое течение с тенденцией к прогрессированию, нередко приводящее к нарушению трудоспособности, стойкие склеротические изменения в легких. Общими являются и принципы профилактики пневмокониозов, предусматривающие осуществление технических и санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на максимальное снижение запыленности воздуха рабочих помещений, проведение предварительных (при поступлении на работу) и периодических медицинских осмотров [3].

Асбестоз — наиболее частая форма силикатоза, вызванная вдыханием асбестовой пыли. В развитии асбестоза играет роль не только химическое действие пыли, но и механическое повреждение легочной ткани асбестовыми волокнами [3]. Развивается у лиц со стажем работы в условиях воздействия асбестовой пыли от 5 до 10 лет, а также у жителей территорий с повышенным содержанием асбестовой пыли в воздухе (к числу последних относятся и территория асбеста).

Хризотил-асбест повреждает мембраны клеток, обуславливает изменение ДНК и ферментных систем.

Это приводит к увеличению риска развития заболеваний, связанных с повреждением генома у людей [15;16]. Вследствие мутагенного эффекта асбестовых волокон возможно развитие новообразований с локализацией в плевре, бронхах, легких.

Ввиду высокой биологической опасности хризотил-асбеста, его производство ограничено Правительством РФ (постановление №32 «Требования по охране здоровья на производстве и безопасности труда, предъявляемые к работам с асбестом» от 2 февраля 2000 г.) и советом ЕС (три основные директивы совета ЕС, в т.ч. директива 87/217/ЕЭС от 19 марта 1987 года «О предотвращении и уменьшении загрязнения окружающей среды асбестом») [8].

Асбестовая пыль при вдыхании в значительной степени задерживается на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и вызывает в ней дистрофические изменения. При этом вследствие дегенерации эпителия слизистых оболочек наблюдается усиленный выход свободного SC (секреторного) компонента, что свидетельствует о нарушении местных защитных механизмов и способствует более глубокому проникновению пыли [12].

Важной особенностью влияния асбеста на иммунокомпетентные клетки являются ультраструктурные изменения мембран макрофагов, фагоцитировавших асбест, и усиление экспрессии на их мембране IgG и C3-рецепторов. Тем самым, волокна хризотил-асбеста стимулируют макрофаг-лимфоцитарное взаимодействие, сопровождающееся изменениями иммунной регуляции, которые выступают в качестве центрального механизма патогенеза асбестоза [12].

Кроме того, асбест индуцирует как классический, так и альтернативный пути активации системы комплемента с последующим включением комплементзависимого лизиса клеток, окружающих асбестовые волокна [12].

При асбестозе в противоположность клеточно-опосредованным реакциям выявляется не ингибция, а стимуляция гуморального звена иммунитета. При этом на фоне увеличения доли В-лимфоцитов наблюдается увеличение в крови титра органоспецифических и органонеспецифических аутоантител, иммуноглобулинов, иммунных комплексов и антинуCLEARных антител.

Особенностью асбестозов, отличающей этот вид пневмокониозов от остальных, является опухолевая трансформация, в основном, Т-клеточных органов (множественная миелома, хронический лимфолейкоз, микроглобулинемия Вальденстрема). Механизм канцерогенного действия асбеста заключается также в его способности вызывать образование продукта дезинтеграции ДНК – 8-гидроксидеооксигуанозина. Генерация свободных цитотоксических радикалов кислорода на поверхности волокон большой биологической протяженности является важным компонентом сложного канцерогенного и аутоиммунного действия асбеста [12].

Волокна асбеста через активацию макрофагов вызывают усиленную пролиферацию фибробластов и синтез ими коллагена. Результатом этого воздействия

может явиться развитие различных стадий пневмоко-
ноза [12]:

- альвеолярного липопротеиноза с нарушением функций мерцательного эпителия бронхов;
- серозно-десквамативного альвеолита с катаральным эндобронхитом;
- кониотического лимфангита с возможным формированием макрофагальных и эпителиоидноклеточных гранулем и развитием катарально-склерозирующего эндобронхита;
- кониотического пневмосклероза с развитием гранулем до их исхода в гиалиноз.

Длительное воздействие волокон асбестовой пыли на легочную ткань приводит к нарушению нормального функционирования органа и развитию цитотоксической реакции гиперчувствительности 4-го типа (РГЧ-4: гранулематозная форма). При этом асбестовая пыль, попавшая в легкие, накапливается, не подвергаясь изменениям. В просвет альвеол выходят макрофаги и поглощают накопившиеся там волокна хризотил-асбеста. Так как длина асбестовых волокон значительно превышает размеры макрофагов, последние, будучи неспособными захватить и переварить волокно, трансформируются в эпителиоидные клетки, которые продуцируют провоспалительные цитокины (рисунок 1). Скопления эпителиоидных клеток сливаются в гигантские клетки инородного тела, способные к захвату волокон хризотил-асбеста. Образуется зона гранулематозного воспаления, в центре которой располагаются эпителиоидные клетки и клетки инородного тела. В зону воспаления мигрируют лимфоциты и фибробласты, отграничивающие зону воспа-

ления от здоровых участков ткани. Продукция эпителиоидными клетками хемотаксических факторов, продолжающаяся миграция клеток и разрастание соединительной ткани приводят к образованию гранулемы, в центре которой, как правило, формируется зона некроза (рисунок 1).

Воздействие цитокинов на генетический аппарат клетки сопровождается развитием тканевой гипоксии, которая запускает процесс апоптоза. Последний опосредуется активацией генов, ответственных за экспрессию внутриклеточных энзимов поли(АДФ-рибоза)полимеразы (ПАРП) и каспаз (биохимических маркеров апоптоза), что приводит к фрагментации ДНК, нарушению функции митохондрий и гибели клеток [1]. В последующем процесс апоптоза сопровождается выработкой провоспалительных медиаторов, кальцификацией зоны некроза и «замуровыванием» гранулемы.

Патогенез действия волокон асбеста со всей очевидностью ставит проблему поиска средств профилактики риска развития заболеваний, связанных с повреждением генома у людей, проживающих на территориях с загрязнением окружающей среды техногенными поллютантами, в том числе асбестосодержащей пылью. Вместе с тем пока известно лишь небольшое число средств, способствующих элиминации повреждений на молекулярно-генетическом уровне. Это обуславливает актуальность проведения испытаний эффективных средств, обладающих антимутатогенным воздействием на организм человека.

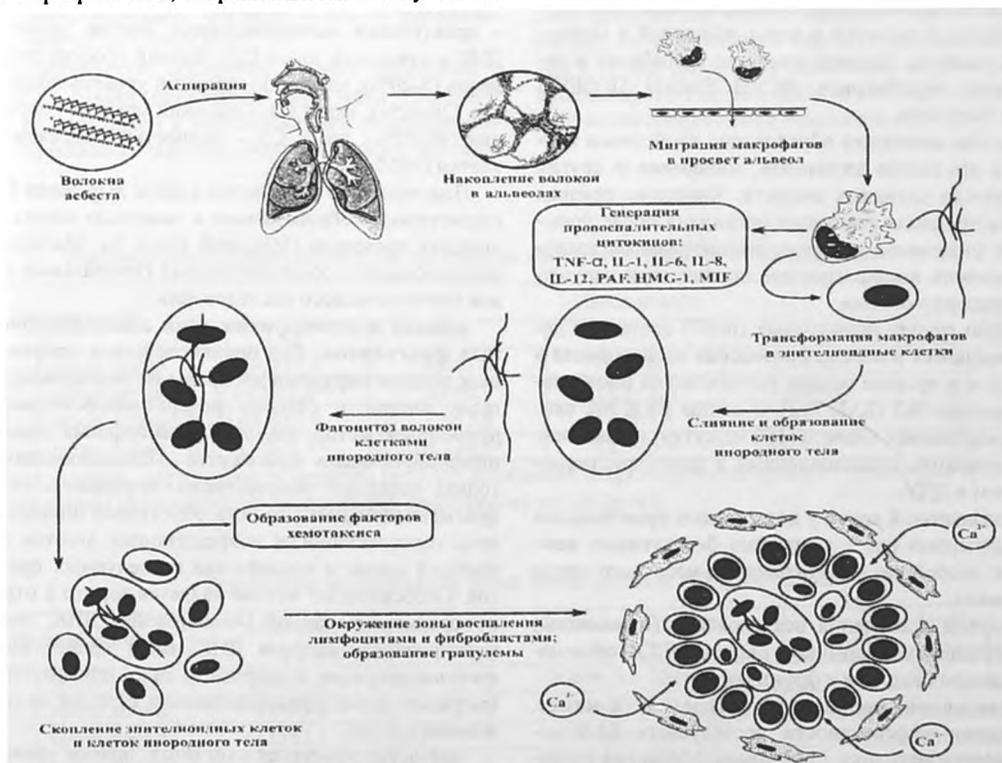


Рис. 1. Формирование очага гранулематозного воспаления

Цель исследования: оценка эффективности исследуемых биоактивных комплексов для коррекции и профилактики развития повреждений генетического аппарата клеток у детей г. Асбеста.

Задачи исследования:

1. Определить степень негативного воздействия комплекса факторов окружающей среды, характерных для территории г. Асбеста, на генетический аппарат клеток детей, проживающих в этом городе.

2. Оценить эффективность исследуемых биоактивных комплексов в отношении коррекции повреждений генетического аппарата клеток детского организма.

3. Выявить наиболее эффективный из исследуемых биоактивных комплексов для элиминации повреждений клеточного генома.

Материалы и методы исследования. Планирование и организация проведения испытаний осуществлялись Екатеринбургским медицинским научным центром охраны здоровья рабочих промышленных предприятий Роспотребнадзора (ФГУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора). Материалом для исследования служили образцы крови, полученные с письменного согласия родителей у 89 испытуемых детей в возрасте трех-четырех лет, с рождения проживающих на территории г. Асбеста и находящихся в период проведения исследования в ДДУ города.

Для проведения исследования испытуемые были разделены на две группы.

Первую группу (n=42) составили дети, размещенные в ДДУ №1, и в течение месяца принимавшие биоактивный комплекс №1 (БАК №1). В состав комплекса входили поливитаминно-минеральный комплекс («Селмевит»), 2 таблетки в день), яблочный и свекловичный пектины. Данный комплекс разработан и неоднократно апробирован ФГУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Действие комплекса обусловлено свойствами входящих в его состав витаминов, минералов и других биологически активных веществ. Комплекс призван ускорять процессы адаптации организма после повышенных физических и нервно-эмоциональных нагрузок, оказывать нормализующее влияние при нарушениях липидного обмена.

Вторую группу испытуемых (n=47) составили дети, находящиеся в период проведения исследования в ДДУ №2 и в течение месяца принимавшие биоактивный комплекс №2 (БАК №2). В состав БАК №2 входили аскорбиновая кислота (150 мг/сутки) и комплекс фитопрепаратов, приготовленный в фитобаре, расположенном в ДДУ.

Забор венозной крови у испытуемых производился дважды: первый раз – до приема биоактивных комплексов; второй раз – по окончании месячного цикла применения.

В период проведения исследования (июнь-июль) дети находились на обычном рационе ДДУ, сезонно-обогатенном овощами и фруктами.

Исследование крови детей методом ДНК-комет. Для оценки эффективности исследуемых БАК использовалась методика ДНК-комет. Методика позволяет определить процентное соотношение клеток раз-

ной степени повреждения ДНК в исследуемом образце. Достоинством используемой методики является её относительная простота и невысокая затратность, а недостаток заключается в том, что метод полуквантитативный, предусматривающий субъективную оценку интенсивности флюоресценции.

На шлифованные предметные стекла наносили слой 0.75% раствора агарозы в среде RPMI 1640. Затем на полученный агарозный слой наслаивали 7 мкл исследуемой крови с 93 мкл 0.5% раствора агарозы. Для защиты исследуемого образца от вымывания электрофоретическим буфером (каждый этап внесения слоя препаратов сопровождался десятиминутным помещением предметного стекла в холодильник до образования геля), наносили третий покровный слой раствора 0,5% агарозы.

Полученные агаровые стекла на 1 час при 4°C помещали в лизирующий раствор (2.5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl-буфера pH 10.0 с тритоном X-100 и 10% диметилсульфоксидом) для раскручивания цепей ДНК, и проводили электрофорез в щелочном буфере (300 мМ NaOH и 1 мМ ЭДТА), при напряжении 20 В и силе тока 30 мА в течение 25 мин.

После электрофореза препараты обрабатывали нейтрализующим буфером (0.4 трис pH 7.5) и окрашивали раствором бромистого этидия (2 мкг/мл).

Кометы анализировали под флуоресцентным микроскопом. Исследовали по 100 клеток, в которых оценивалась степень распределения ДНК в агарозном геле в относительных единицах распределения ДНК в кометах, с определением соотношения между «ядром» и «хвостом».

Визуально клетки относили к 5 классам: класс С1 – практически неповрежденные клетки (менее 5% ДНК в «хвосте»); класс С2 – низкий уровень повреждения (5-20%); класс С3 – средний уровень повреждения (20-40%); класс С4 – высокий уровень повреждения (40-95%); класс С5 – полностью поврежденные клетки (>95%).

Подсчитанное количество клеток выражали в % и статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ (Microsoft Excel for Macintosh) с использованием общепризнанных специальных методов статистического исследования.

Анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов. Для оценки действия повреждающих агентов окружающей среды на генетический аппарат клеток и степени репаративной активности применялся метод анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов. Используемая методика позволяет количественно определить степень фрагментации ДНК, то есть объективно оценить степень генотоксичности повреждающих агентов окружающей среды и воздействие исследуемых препаратов. Особенностью метода является то, что в отличие от фрагментированной («хвостовой») ДНК, нефрагментированная ядерная ДНК имеет крайне низкую степень миграции в агарозном геле, причем степень миграции прямо пропорциональна степени ее повреждения[4;5;19].

Как свидетельствует наш опыт, прямое сравнение между группами по активности включенной метки в

ядерные и хвостовые части исследуемых образцов не всегда информативно. Поэтому нами используется значение соотношения хвостовой и суммарной частей в рамках одной группы – коэффициент фрагментации ДНК (Кфр) [4; 5]. Коэффициент фрагментации ДНК рассчитывали по формуле:

$$\text{Кфр} = \frac{\text{Активность хвостовой части}}{\text{Суммарная активность хвостовой и ядерной частей}} \times 100\%$$

Для исследования из полученных проб цельной крови выделяли лейкоцитарную фракцию в фиколируграфиковом градиенте. Выделение ДНК производилось по стандартной методике фенольной депротеинизации.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в нашей модификации, повышающей чувствительность ПЦР в 8-10 раз. Для постановки реакции использовались специфические праймеры и нуклеотиды (dCTP, dATP, метил-dTTP), меченые тритием. Полученный амплификат был разделен в процессе горизонтального агарозного гель-электрофореза в ТАЕ-буфере при 100 В в течение 15 мин [18].

По окончании электрофореза гелевые пластины разделяли на дорожки, каждая из которых была разрезана на участки длиной 5 мм. Полученные фрагменты геля помещали во флаконы, содержащие 3.0 мл абсолютного изопропанола. Флаконы нагревали до 80°C в течение 2 часов. После экстракции из геля амплифицированных фрагментов, содержащих метку, во флаконы добавляли простой толуоловый сцинтиллятор (6.0 мл). Регистрация результатов производилась на автоматическом жидкостном сцинтилляционном счетчике «Бета-2» (эффективность счета по ³H – 56%) [21].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ (Microsoft Excel for Macintosh) с использованием общепризнанных специальных методов статистического исследования.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование крови детей методом ДНК-комет. Результаты исследования методом ДНК-комет представлены в таблице 1.

Анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ-анализ). Коэффициент фрагментации ДНК в 1 группе детей до приема БАК №1 составил 0,37, что можно принять за величину, характерную для данной группы обследуемых (в рамках коэффициента от 0 до 1,0). Результаты исследования крови детей методом анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов представлены в таблице 2.

Снижение коэффициента фрагментации по окончании месячного цикла использования биоактивного комплекса №1 (до 0,32) не является достоверным.

Во второй группе обследуемых (БАК №2) наблюдается статистически значимое снижение коэффициента фрагментации ДНК на 29,7% (до значения 0,26), по сравнению с состоянием до приема комплекса.

Обобщенные результаты исследования крови детей методом ДНК-комет представлены в процентах на рисунках 2 и 3. По оси абсцисс отложены классы комет (C1, C2, ... C5). Для большей информативности по оси ординат отложена относительная доля клеток, отнесенных к соответствующему классу. За 100% принято количество клеток, полученное при исследовании первичного образца (до приема БПК).

После приема биоактивного комплекса №1 (1-я группа детей) наблюдается трехкратное снижение доли полностью поврежденных клеток (C5) по сравнению с состоянием до приема комплекса. При этом, доля практически неповрежденных клеток (C1) возрастает по сравнению с соответствующим показателем в группе до приема комплекса, на 19%. Это свидетельствует об эффективности БАК №1 в отношении коррекции повреждений генома клеток.

Таблица 1

Распределение повреждений ДНК по классам комет (в %, M±m) в лейкоцитах детей (n=89)

Группа детей		Класс комет				
		C1	C2	C3	C4	C5
1	1 забор крови	49,5±1,8	8,3±1,4	14,5±0,4	17,8±2,7	8,3±0,9
	2 забор крови	58,9±3,6*	9,1±0,7	13,9±2,6	15,6±1,8	2,7±1,3*
2	1 забор крови	48,4±3,4	7,9±1,6	12,6±1,4	19,8±2,1	8,7±1,9
	2 забор крови	63,8±2,7*	10,2±0,5*	12,3±0,9	13,3±1,7*	1,8±0,8*

* - здесь и далее, достоверность отличий (p<0,05) показателя второго образца крови от показателя первичного образца крови (до применения биоактивных комплексов) тех же детей.

Таблица 2

Результаты исследования крови детей методом ПДАФ-анализа

Группа детей		Активность ядра, в Бк/нг ДНК	Активность хвоста, в Бк/нг ДНК	Коэффициент фрагментации
1	1 забор крови	34423,6 ± 1342,58	20486,5 ± 2046,39	0,37
	2 забор крови	37443,8 ± 986,37*	17786,6 ± 1536,12	0,32
2	1 забор крови	33585,1 ± 1679,25	19724,5 ± 986,225	0,37
	2 забор крови	36035,83 ± 1648,13*	12945,33 ± 1729,41*	0,26

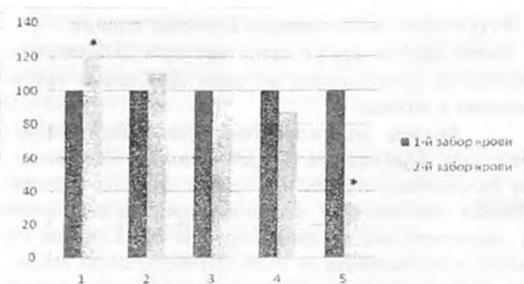


Рис. 2. Результаты исследования крови методом ДНК-комет. 1-я группа детей

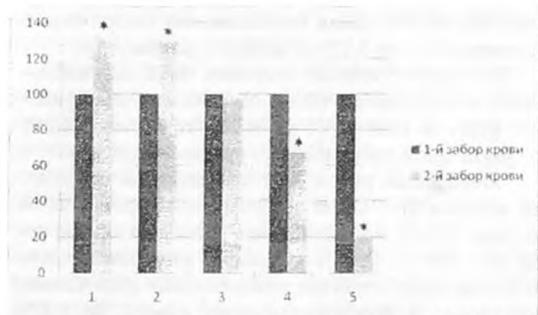


Рис. 3. Результаты исследования крови методом ДНК-комет. 2-я группа детей

Во второй группе обследуемых наблюдается более выраженный благоприятный результат. Так, доля полностью поврежденных клеток (C5) в этой группе после приема БАК №2 снижается по сравнению с состоянием до приема комплекса, в 4,83 раза. Часть клеток с высоким уровнем повреждения ДНК (C4) снижается в 1,5 раза, а доли практически неповрежденных клеток (C1) и клеток с низким уровнем повреждения (C2) возрастают на 31,8 и 29% соответственно. Это свидетельствует о БАК-обусловленной компактизации генома клеток и о большей эффективности БАК №2 по сравнению с БАК №1 в отношении индукции репарации повреждений генома и снижения его фрагментации.

Результаты исследования крови детей методом ПДАФ-анализа представлены на рисунке 4. По оси абсцисс обозначены группы обследованных детей. Для большей информативности по оси ординат отложено относительное значение коэффициента фрагментации ДНК. За 100% принято значение коэффициента фрагментации, полученного при исследовании первичного образца крови (до приема БПК).

Незначимое снижение Кфр в первой группе обследуемых свидетельствует о сравнительно меньшей эффективности биоактивного комплекса №1 по данному показателю.

Достоверное снижение Кфр после приема биоактивного комплекса №2 (2-я группа детей) свидетельствует о большей эффективности БАК №2 по сравнению с БАК №1 в отношении профилактики повреждения генома клеток у лиц, проживающих на территориях с неблагоприятной экологической обстановкой, к числу которых относится и г. Асбест.

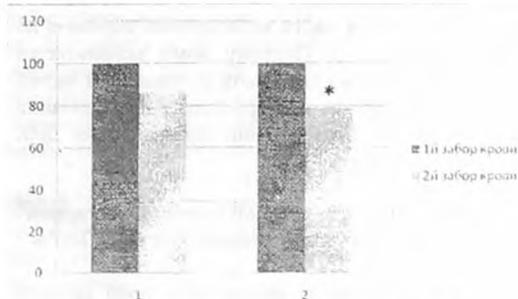


Рис. 4. Результаты анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов

В таблице 3 приведены значения коэффициентов фрагментации, полученные в ранее проведенных нами исследованиях [4;5]. Примечательно, что состояние генетического аппарата детей г. Асбеста сопоставимо с состоянием генетического аппарата у женщин-ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС 64-летнего возраста, получивших дозу облучения от 5 до 25 Бэр, а также у женщин с высоким риском развития онкопатологии, проживающих на территории г. Карпинска. Сравнение данных свидетельствует о высоком уровне повреждения ДНК у детей г. Асбеста.

Таблица 3

Значения коэффициентов фрагментации в группах ранее обследованных лиц [4; 5]

Исследуемые группы	Кфр
Женщины-ликвидаторы аварии на Чернобыльской АЭС	0,37
Мужчины-ликвидаторы аварии на Чернобыльской АЭС	0,43
Женщины, проживающие на территории города Карпинска	0,35
Здоровые женщины, исследование совместно с ГУЗ ДБВЛ НПРЦ «Бонум»	0,31

Зарегистрированный позитивный эффект аскорбиновой кислоты и фитопрепаратов (БАК №2), предположительно можно связать с вовлеченностью витамина С в ферментативно-зависимую антирадикальную цепь, его способностью к перехвату супероксидного анион-радикала кислорода [9] и инактивации активных форм кислорода $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} в водной фазе [2].

Механизм инактивации активных форм кислорода витамином С в настоящее время изучен не полностью [17]. Это связано со сложностями установления структуры образующегося в процессе антиоксидантной защиты свободного радикала аскорбиновой кислоты, который способен подавлять реакции свободно-радикального окисления посредством двух механизмов [17].

Так, аскорбиновая кислота, за счет способности присоединять и отдавать атомы водорода, может восстанавливать окисленную форму витамина Е (токоферола) и, тем самым, поддерживать в мембране концентрацию активной формы восстановленного витамина Е [2].

В свою очередь, превращение аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбат необходимо для его действия как стимулятора иммунной системы. Данный эффект не изучен, но сам факт стимуляции иммунитета не подлежит сомнению [23].

Важным для понимания ДНК-репаративной активности аскорбиновой кислоты представляется связь процессов ее обмена с образованием простагландинов. В ранее проведенных нами исследованиях был показан выраженный репаративный эффект эйкозаноидов [14]. Способность аскорбат-иона активировать синтез простагландинов может являться основой механизма наблюдаемого позитивного действия БАК №2.

Положительный эффект БАК №2 также может быть связан с наличием в составе комплекса фитопрепаратов, являющихся природными хемопротекторами (хемопреенторами), в частности, хлорофилла. Группа биофлавоноидов полифенольного ряда в настоящее время рассматривается в качестве субстратов для получения БАК, обладающих антимуtagenной и репаративной активностью. Также биофлавоноиды рассматриваются в качестве перспективных противораковых средств [11].

Механизм взаимодействия аскорбиновой кислоты и биофлавоноидов в настоящее время изучен не до конца. Однако важно отметить, что наличие витамина С является необходимым для активации биофлавоноидов. Вероятно, сочетание биофлавоноидов с аскорбиновой кислотой в составе БАК №2 может рассматриваться в качестве дополнительного механизма выраженного положительного эффекта комплекса.

Выводы

1. Проживание детей на территории г. Асбеста в условиях действия неблагоприятных факторов окружающей среды сопровождается развитием признаков повреждения ядерной ДНК.

2. Месячный курс применения биологически активного комплекса №1 приводит к умеренной активации репаративных систем ДНК клеток организма.

3. Витамин С, являющийся известным антимуtagenом, в комплексе с фитотерапией обладает более выраженным репаративным эффектом, вероятно, за счет включения в ферментативно-зависимую антирадикальную систему, участия в синтезе простагландинов, а также синергизма действия компонентов комплекса.

4. Месячный курс применения биоактивного комплекса №2 сопровождается значимой активацией репаративных систем клеток и, как следствие, выраженной элиминацией повреждений ядерной ДНК клеток организма детей, проживающих в г. Асбесте. Применение данного комплекса может быть целесообразным в отношении профилактики развития заболеваний, связанных с повреждением генома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багдатыев В.Е. Этиология и патогенез острого повреждения легких, роль внесосудистой воды легких. [Текст] / В.Е. Багдатыев, В.Л. Кассиль, М.Ю. Киров, Э.В. Недашковский // Инфекция в хирургии. – М., 2006. – Т. 4.
2. Биохимия. Учебник для ВУЗов. [Текст] / Т.Л. Алейникова, Л.В. Авдеева, Л.Е. Андрианова, Н.Н. Белушкина,

- Н.П. Волкова, С.А. Воробьева, В.А. Голенченко, А.Е. Губарева, О.В. Корлякова и др.; Под ред. Е.С. Северина. – 3-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 784 с.: ил.
3. Бородулин В.И. Большая медицинская энциклопедия [Текст] / В.И. Бородулин, А.В. Тополянский; Под ред. В.И. Бородулина. – Изд. 4-е, испр. и доп. – М.: РИПОЛ классик, 2007. – 960 с.
4. Буханцев В.А. Оценка эффективности применяемого комплекса факторов растительного происхождения с целью реабилитации лиц, пострадавших при радиационной аварии и проживающих на территории с надфоновым уровнем радиации [Текст] / В.А. Буханцев, Л.А. Власова / Тезисы студенческих работ: Направление «Естественные науки». – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2007. – С.39-41.
5. Возможность коррекции индуцированных УФ-излучением повреждений генома клеток кожи с использованием крема «Эйкозавитол» [Текст] / В.А. Буханцев, О.А. Сониная, П.А. Ошурков, Е.И. Довженко, В.В. Минин // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы 63-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2008. С. 208-209.
6. Глинка Н.Л. Общая химия. Учебное пособие. [Текст] / Общая химия: Учебное пособие для вузов / Под ред. А.И. Ермакова. – Изд. 30-е, исправленное – М.: Интеграл-Пресс, 2005. – 728 с.
7. Государственный доклад о состоянии окружающей среды. Екатеринбург. Администрация Свердловской области 1996г.
8. Директива Совета 87/217/ЕЭС от 19 марта 1987 года «О предотвращении и уменьшении загрязнения окружающей среды асбестом».
9. Дурнев А.Д. Модификация мутационного процесса в клетках человека. [Текст] / Вестник Российской академии медицинских наук. – М.: Медицина, 2001. – №10. С. 70-76.
10. Евсеев Б. Резонанс в унисон с природой [Текст] / Б. Евсеев // Наука Урала. 1998. №19. С. 4-5.
11. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений [Текст] / М.Н. Запрометов, В.Б. Спиричев. – М. 1974.
12. Кашнельсон Б.А. Пневмоконозы: патогенез и биологическая профилактика. [Текст] / Б.А. Кашнельсон, О.Г. Алексеева, Л.И. Привалова, Е.В. Ползик. – Екатеринбург: Уро РАН, 1995. – 325 с.
13. Кашнельсон Б.А. Экспериментальное испытание комплекса средств биологической защиты организма от канцерогенного действия комбинации экотоксикантов. [Текст] / Б.А. Кашнельсон, О.Г. Макеев, Т.Д. Дегтярѳва, Л.И. Привалова, В.А. Буханцев, С.А. Денисенко, Т.В. Слышкина, Н.П. Макаренко, И.Х. Измайлов и др. // Токсикологический вестник. – 2007. – №3. – С.15-20.
14. Макеев О.Г. Роль простагландинов в механизмах регуляции кроветворения при экстремальных воздействиях на организм: Автореф. дисс. д-ра мед. наук. [Текст] / О.Г. Макеев; Уральская гос. мед. академия. – Екатеринбург, 1993. – 36 с.
15. Международная программа по химической безопасности: /ВОЗ/ Женева. – М.: Медицина, Публикация № 37, 1989.
16. Международная программа по химической безопасности: Гигиенические критерии состояния окружающей среды 72: Принципы изучения болезней предположительно химической этиологии и их профилактики /ВОЗ/ Женева. – М.: Медицина, 1989. – 76 с.

17. Мещанинов В.Н. Курс лекций по биохимии [Текст] / В.Н. Мещанинов. ГОУ ВПО УГМА Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию. 2009 г.
18. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммунофорезом и радиоизотопными методами. [Текст] / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1983. - 304 с.
19. Ошурков П.А. Сравнительные аспекты эффектов биоактивных комплексов на процессы репарации поврежденных ядерной ДНК у детей г. Асбеста. [Текст] / П.А. Ошурков, В.А. Буханцев // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы 64-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. - Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2009. - С.172-174.
20. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст] / О.Ю. Реброва. - М.: МедиаСфера, 2003. - 312 с.
21. Ташевский В.А. Измерение радиоактивности биологических образцов с помощью жидких синтилляторов. / В.А. Ташевский. // Мед Радиол. - 1977. - №7. - С.81-89.
22. Терлецкий В. Экологическая обстановка в Свердловской области [Текст] / В. Терлецкий. // Курсив. - 1996. - №2. - С.102-104.
23. <http://www.rusmedserv.com/misc/116/116.htm>. Статья. Аскорбиновая кислота и глюкоза в коррекции процессов свободнорадикального окисления (экспериментальное исследование). [Текст] / Л.Я. Тимен, А.Г. Шерцингер, Т.В. Мачнева, Э.С. Варданян, И.Е. Трубицына, Б.З. Чикунова, С.Б. Жигалова, П.А. Ольховский, Д.М. Протопопов и др. Городская клиническая больница №20; Российский научный центр хирургии РАМН; Российский государственный медицинский университет; ЦНИИ гастроэнтерологии, М.

В.С. Мякотных, А.А. Бальберт, В.Н. Самойлова

КЛИНИЧЕСКИЕ И НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ СТРУКТУР У БОЛЬНЫХ С ОТДАЛЕННЫМИ ПОСЛЕДСТВИЯМИ СОВРЕМЕННОЙ БОЕВОЙ ЗАКРЫТОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Уральская государственная медицинская академия

Среди клинических синдромов отдаленного периода боевой закрытой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) выделяются поражения черепно-мозговых нервов, церебральный арахноидит, атрофия мозга, гидроцефалия, эпилептический синдром, паркинсонизм, вегетативная дистония и др. Прогрессирование последствий ЧМТ может проявляться различными вариантами деменции, эпилептическими изменениями личности [5-8], пограничными психопатологическими и эмоционально-личностными расстройствами: астеническими, психопатоподобными, фобическими, депрессивно-ипохондрическими [3,7,8], которые нередко выступают на первый план.

Один из важнейших патогенетических механизмов формирования последствий закрытой ЧМТ – нарушение ликвородинамики. Внутричерепная гипертензия травма-

тического генеза, ликворо-дисциркуляторные нарушения являются частой причиной посттравматической головной боли, а гемодинамические нарушения у перенесших травмы коррелируют с ликвородинамическими [18]. Возникающая в результате травмы гидроцефалия является причиной развития атрофии элементов мозговой ткани, сморщивания и уменьшения мозгового вещества, расширения желудочковых и субарахноидальных пространств, чем в значительной степени объясняется развитие разнообразной психопатологической симптоматики последствий ЧМТ [4,8,14].

Результаты нейровизуализационных исследований [1,10,11,16,19] подтверждают незавершенность патологических процессов в отдаленном периоде ЧМТ. В оболочках и веществе мозга не только остаются стойкие изменения тканей и посттравматические дефекты, но и прогрессируют нарушения кровотока и ликворообращения, приводящие к гипоксии тканей, частичной атрофии мозгового вещества, нарастающему фиброзу оболочек. Определяются структурные изменения в стволовых отделах мозга, в корково-подкорковых образованиях, гипоталамусе, гипофизе, чем и объясняется формирование нарушений вегетативной, обменной и нейротропной регуляции.

Для правильной оценки состояния больного с последствиями закрытой ЧМТ и выбора оптимальной тактики лечения имеют значение современные методики нейровизуализации – компьютерная и магнитно-резонансная томография (КТ и МРТ). В литературе имеется много работ, посвященных детальному описанию различных КТ и МРТ картин в острейший и острый период травмы, однако довольно редко подробно описываются структурные изменения головного мозга в отдаленный период ЧМТ, в частности, боевой, при сопоставлении выявленных нейровизуализационных изменений с разными клиническими синдромами. Настоящая работа призвана восполнить этот пробел.

Цель исследования – показать зависимость патологических изменений на КТ, МРТ от клинических проявлений отдаленных последствий боевой закрытой ЧМТ, полученной в условиях современных войн, вооруженных конфликтов.

Материал и методы исследования. Обследованы 202 пациента – участники боевых действий в Афганистане, Чеченской республике и других «горячих точках», перенесшие боевые закрытые ЧМТ и имеющие клинические проявления отдаленных последствий травмы, приведшие к инвалидности 2-3 групп. В соответствии с тем или иным ведущим клиническим синдромом наблюдавшиеся больные были подразделены на 3 группы: 1-я – с преобладанием гипертензионно-гидроцефального синдрома (n=96, возраст 23-45 лет), 2-я – с преобладанием психоорганического синдрома (n=56, возраст 25-45 лет), 3-я – с преобладанием эпилептического синдрома (n=50, возраст 27-44 лет). Признаки гипертензионно-гидроцефального синдрома присутствовали также у многих пациентов 2-й и 3-й групп, однако здесь данный синдром рассматривался как сопутствующий, не являясь причиной инвалидизации больных.

МРТ головного мозга проводилась на аппарате «Образ-2» с напряженностью магнитного поля 0,14 Тесла. Оценивались показатели: наличие очаговых