

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.В. Беляева¹, В.Ю. Афонин¹, М.В. Анисович¹, Е.Ю. Проценко²

*ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»¹,
ул. Академика В.Ф. Купревича, д. 5, к. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь
Республиканский научно-практический центр «Кардиология»²,
ул. Розы Люксембург, д. 110, 220036, г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: Aleksandra447@yandex.ru*

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одними из самых распространенных и опасных патологий во многих странах мира. В настоящее время кардиоваскулярные нарушения становятся большой проблемой современной медицины. В связи с этим разработка и внедрение новых методов профилактики, диагностики и лечения патологий сердечно-сосудистой системы является актуальным.

Цель работы. Изучить цитогенетические показатели периферической крови людей, страдающих патологиями со стороны сердечно-сосудистой системы.

Материалы и методы. В проводимое исследование были включены пациенты с ССЗ. В ходе выполнения анализа было изучено содержание эндотелиальных прогениторных клеток (CD117+, CD34+, CD117+/CD34+) в крови людей с желудочковыми нарушениями ритма сердца. В контрольную группу людей были включены практически здоровые пациенты. Исследование проводилось на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 («Beckman Coulter»). Выделение «гейтов» клеток для анализа осуществляли по параметрам прямого и углового светорассеяния (FSC vs SSC), в смешанных линейно-логарифмических режимах (SSC vs FL1, FL2, FL3) или только с применением параметров флуоресценции с логарифмическим усилением сигнала (log/log). В каждом из образцов проводили сбор не менее 10 000 событий. Применялись коммерческие моноклональные антитела («Beckman Coulter», США). Исследования проводились с одноцветными метками.

Для исследования молекулярно-биологических показателей крови пациентов, страдающих ССЗ, использовался проточный цитофлуориметр Cytomics FC500 («Beckman Coulter»). Был изучен процент клеток с признаками повреждения генетического материала и количество клеток в G₀/G₁, S, G₂/M фазах клеточного цикла на основании гистограмм распределения ДНК в клетках.

Анализ содержания ДНК проводили в клетках, которые предварительно фиксировались в этаноле. Образцы клеток отмывали дважды ФСБ (фосфатно-солевым буфером), фиксировали в охлажденном этаноле (70%) и хранили при -20⁰С до момента проведения эксперимента. Фиксированные в этаноле клетки отмывали ФСБ, обрабатывали раствором РНК-азы (150 Ед/мл) и окрашивали раствором PI (пропидиум иодид, 50 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы анализировались с использованием цитометрического анализа.

Количество апоптотических клеток рассчитывали на основании измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной иодистым пропидием (50 мкг/мл). Регистрировали апоптотические клетки с содержанием ДНК менее 2n.

Результаты и их обсуждение. В ходе изучения количества стволовых клеток с поверхностными клеточными маркерами CD117+, CD34+ и CD117+/CD34+ в крови детей, страдающих желудочковыми нарушениями ритма сердца, были получены следующие результаты, представленные в таблице 1. Установлено, что число эндотелиальных прогениторных клеток у данных пациентов значительно выше по сравнению со здоровыми людьми (p<0,05). Так, показано, что процент клеток с CD117+ у детей с сердечной патологией был на уровне 1,17 ± 0,14%, в то время как у здоровых обследуемых данный показатель составил 0,73 ± 0,13% (p<0,05). Количество клеток с фенотипом CD34+ у людей, страдающих желудочковыми нарушениями сердечного ритма, было значительно выше по

сравнению с контрольными показателями ($2,02 \pm 0,34\%$ и $1,20 \pm 0,32\%$, соответственно). В результате проведения анализа числа клеток с CD117+/CD34+ в крови пациентов с патологией со стороны сердечно-сосудистой системы было выявлено достоверное увеличение описываемого параметра по сравнению с контрольной группой людей. Так, количество клеток CD117+/CD34+ в группе детей с желудочковыми нарушениями ритма сердца составило $0,96 \pm 0,15\%$, а в контрольной группе людей процент данных клеток равнялся $0,49 \pm 0,12\%$ ($p < 0,05$).

Таким, образом, можно сделать вывод о том, что увеличение количества эндотелиальных прогениторных клеток в крови детей с желудочковыми нарушениями ритма сердца является результатом мобилизации стволовых клеток в ответ на развитие повреждений и нарушений работы сердечно-сосудистой системы.

Таблица 1 – Результаты изучения количества стволовых клеток в крови у детей с желудочковыми нарушениями ритма сердца

Группа, (кол-во человек)	CD117+, %	CD34+, %	CD117+/CD34+, %
Здоровые (12)	$0,73 \pm 0,13$	$1,20 \pm 0,32$	$0,49 \pm 0,12$
Пациенты с заболеваниями (22)	$1,17 \pm 0,14^*$	$2,02 \pm 0,34^*$	$0,96 \pm 0,15^*$
* – различия со здоровыми людьми $P < 0,05$			

В дальнейшем был проведен анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, а также изучено число клеток с признаками апоптоза и микроядрами. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты изучения молекулярно-биологических показателей крови детей с желудочковыми нарушениями ритма сердца

Группа (кол-во человек)	апоптоз, %	G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %	микроядра, %
Здоровые (12)	$11,73 \pm 3,00$	$96,13 \pm 0,59$	$0,55 \pm 0,16$	$3,32 \pm 0,52$	$6,46 \pm 0,93$
Пациенты с заболеваниями (22)	$5,04 \pm 0,73^*$	$96,52 \pm 0,50$	$0,43 \pm 0,07$	$3,09 \pm 0,47$	$1,73 \pm 0,25^*$
* – различия со здоровыми людьми $P < 0,05$					

Было установлено, что у исследуемых пациентов происходит изменение количества апоптотических клеток и клеток с микроядрами. Так, процент клеток с признаками апоптоза у детей с желудочковыми нарушениями ритма сердца составил $5,04 \pm 0,73\%$, а в контрольной группе равнялся $11,73 \pm 3,00\%$ ($P < 0,05$). Число клеток с микроядрами у пациентов с заболеваниями сердца и сосудов было $1,73 \pm 0,25\%$, в то время как у здоровых людей составляло $6,46 \pm 0,93\%$ ($P < 0,05$). Таким образом, можно сделать вывод, что количество клеток с признаками повреждения ДНК у больных детей меньше по сравнению со здоровыми. Распределение клеток по фазам клеточного цикла у пациентов с желудочковыми нарушениями ритма сердца соответствовало таковому контрольных людей (таблица 2).

Были исследованы молекулярно-биологические показатели людей с различной степенью развития ССЗ и установлено, что существует зависимость между количеством клеток с повреждениями ДНК и степенью прогрессирования патологии (таблицы 3 – 5).

1	1,16±0,19	96,15±0,54	0,58±0,28**	3,28±0,30	3,85±0,54	0,11±0,02**
2	4,01±1,16	97,81±0,39	0,15±0,10	2,04±0,44	2,20±0,39	0,14±0,02
3	2,43±0,66	97,55±0,44	0,04±0,03	2,41±0,44	2,45±0,44	0,14±0,05
*различия с пациентами CH1 P<0,05;						
** различия у пациентов до и после операции CH1 P<0,05						

Заключение. Выявлено значительное увеличение числа стволовых клеток CD117+, CD34+ и CD117+/CD34+ в крови у детей с нарушениями ритма сердца. Также отмечено снижение количества клеток с повреждениями ДНК. У людей с ССЗ в условиях изменения процессов дифференцировки, деления и гибели клеток происходит формирование «клеточного фенотипа», который выражается в изменении соотношения клеток с различными молекулярно-биологическими маркерами. Нельзя исключить влияние на клеточные процессы фармакотерапии и чувствительности к ней пациентов.

THE RESULTS OF INVESTIGATION OF CYTOGENETIC PARAMETERS OF BLOOD FROM PEOPLE SUFFERING FROM CARDIOVASCULAR DISEASES

A.V. Beliyeva¹, V.Yu. Afonin¹, M.V. Anisovich¹, E.Y. Procenko²

*The Institute of Bioorganic chemistry NAS of Belarus¹,
Republican scientific and practical center «Cardiology»²*

Summary

At present study we describe the results of the investigation of cytogenetic parameters of blood from people suffering from cardiovascular diseases. It is shown that the number of stem cells CD117+, CD34+ and CD117+/CD34+ increases in children suffering from heart rhythm disorders. There are cytogenetic variations in population of blood cells of people who suffers from cardiovascular diseases, and the level of these changes depends on degree of disease development.