



УДК 616.12-008.1+616.079.3

С. В. Федоров, Л. Е. Ковальчук

Каріологічні показники моноцитів/макрофагів у хворих на хронічну серцеву недостатність ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Ключові слова: серцева недостатність, цитогенетичний аналіз, моноцити, макрофаги.

Протягом останніх років активно вивчають роль генетичних факторів у становленні синдрому хронічної серцевої недостатності. З метою оцінювання цитогенетичного статусу пацієнтів із серцевою недостатністю ішемічного генезу шляхом виконання каріологічного аналізу моноцитів/макрофагів обстежили 24 хворих і 12 практично здорових осіб (група контролю). Якщо діагностована серцева недостатність, то частіше відзначали наявність міжядерних містків, перинуклеарної вакуолізації, вакуолізації та конденсації ядерного хроматину в моноцитах/макрофагах у порівнянні з групою контролю. Це свідчить, що при серцевій недостатності ішемічного генезу відбуваються зміни каріологічних показників моноцитів/макрофагів, які характеризуються одночасною активацією процесів проліферації та початкових ознак апоптозу/некрозу цих клітин.

Каріологические показатели моноцитов/макрофагов у больных хронической сердечной недостаточностью

С. В. Федоров, Л. Е. Ковальчук

В последнее время активно изучается роль генетических факторов в формировании хронической сердечной недостаточности. С целью изучения цитогенетического статуса больных сердечной недостаточностью ишемического генеза обследовали 24 больных и 12 практически здоровых людей (группа контроля), у которых проводили каріологический анализ моноцитов/макрофагов. При сердечной недостаточности чаще отмечали наличие междуядерных мостиков, перинуклеарной вакуолизации, вакуолизации и конденсации ядерного хроматина в моноцитах/макрофагах в сравнении с группой контроля. Это свидетельствует, что при сердечной недостаточности ишемического генеза происходят изменения каріологических показателей моноцитов/макрофагов, которые характеризуются одновременной активацией процессов пролиферации и начальных признаков апоптоза/некроза данных клеток.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, цитогенетический анализ, моноциты, макрофаги.

Запорожский медицинский журнал. – 2015. – №1 (88). – С. 31–33

Monocytes/macrophages karyologic indices in patients with chronic heart failure

S. V. Fedorov, L. Ye. Kovalchuk

Genetic factors impact in chronic heart failure (HF) development is discussed during last decades. The aim was to evaluate cytogenetic status of patients with ischemic HF with karyologic analyzes of monocytes/macrophages.

Methods and results. 24 patients and 12 practically healthy persons (control group) were included into the study. Internuclear bridges, perinuclear vacuolization, vacuolization and nuclear chromatin condensation were detected more frequent in patients with HF than in control. Conclusion. This indicates proliferation activation and is initial signs of apoptosis/necrosis in observed cells.

Key words: Heart Failure, Cytogenetic Analysis, Monocytes, Macrophages

Zaporozhye medical journal 2015; №1 (88): 31–33

Серцева недостатність (СН) – прогресивний мульти-системний розлад, який запускається первинним ушкодженням чи погіршенням функціонування міокарда (зокрема припиненням вільного кровотоку чи посиленням навантаженням внаслідок гіпертензії) [1]. Згідно з даними Європейського кардіологічного товариства (ESC), щонайменше 15 млн населення континенту страждає на СН [2]. У США цей показник сягає 6 млн [3]. У розвинутих країнах світу СН зумовлює 5% ургентних госпіталізацій, 10% зайнятості ліжка, 2% від загальних витрат на охорону здоров'я, переважно на покриття направлень до стаціонару [4]. 17–45% пацієнтів, які госпіталізовані з приводу СН, помирають упродовж року після направлень до стаціонару, більшість – протягом 5 років [5].

Сучасна концепція патогенезу СН на основі взаємодоповнення акумулює різноманітні теорії (нейрогуморальна, запальна, «кардіопатії перевантаження» тощо) та пояснює єдиний механізм розвитку та прогресування синдрому. Ґрунтуючись на результатах фундаментальних досліджень у галузі молекулярної біології та генетики, сформована

також концепція фенотипової модуляції, що означає здатність клітин змінювати фенотип і функцію в межах однієї тканини [1]. При СН трапляється зміна експресії генів, які відповідають за контрактильну функцію кардіоміоцитів (ген ангіотензинперетворювального ферменту, ген дистрофіну, ген актину тощо) [6]. Обидва варіанти СН залежать від двох регульованих біологічних детермінант: несприятливих наслідків адаптаційних процесів (наприклад, гіпертрофія, дилатація лівого шлуночка) та фіброзу. Розвиток систолічної дисфункції зумовлюють зміна генів важких ланцюгів міозину, зміна експресії генів білків, які забезпечують переміщення кальцію в кардіоміоцитах, порушення експресії генів аденілатциклази, депресія активації генів, які кодують β1-адренергічні та М2-мускаринові рецептори [7]. Відкриті понад 30 генів, котрі зумовлюють гіпертрофію міокарда (гени білків саркомерів, факторів росту тощо) та кардіофіброз [7].

Одним із різновидів оцінювання цитогенетичного статусу людини є каріологічний тест. У низці робіт описане виконання каріологічного аналізу експлікативних клітин чи



лімфоцитів [8,9], але в доступній нам фаховій літературі не виявили відомостей про використання цього методу під час дослідження моноцитів/макрофагів.

Мета роботи

Дослідити цитогенетичний статус хворих на хронічну серцеву недостатність ішемічного генезу шляхом здійснення каріологічного аналізу моноцитів/макрофагів.

Пацієнти і методи дослідження

Обстежили 24 хворих із синдромом СН II–IV ФК (NYHA) ішемічного генезу. Діагноз верифікували з використанням лабораторно-інструментальних методів відповідно до рекомендацій Європейського кардіологічного товариства (2012, 2013). До контрольної групи ввійшли 12 практично здорових осіб, які репрезентативні за віком і статтю.

Дослідження здійснили відповідно до принципів Гельсінської декларації (щодо наукових досліджень із залученням людей) і рекомендацій належної клінічної практики (GCP – good clinical practice) [10]. Дизайн дослідження затверджений комісією з питань етики ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет». Усі учасники підписали інформовану згоду.

Моноцити/макрофаги виділяли з периферійної крові за методом Н. Recalde [11]. Чистота суспензії моноцитів (89–96%) підтверджена імунофлуоресцентним методом із використанням моноклональних анти-CD14 антитіл (Daco, Glostrup, Данія). Життєздатність клітин у суспензії підтверджена тестом із трипановим синім і становила 89–93%. Після фіксації мазків із суміші цих клітин у рідині Карнуа протягом 5–10 хв виконали фарбування ацето-орсеїном [12] у власній модифікації.

Препарати досліджували методом світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа Laboval-4 (Carl Zeiss, Jena, ФРН) зі збільшенням 40×15 та програмного забезпечення оптико-електронного комплексу Метаскан-2. Визначали 4 групи каріологічних показників: цитогенетичні (мікроядра, протрузії, мости у двоядерній клітині, ядра атипової форми); проліферації (двоядерні клітини з ізольованими чи здвоєними ядрами); ранньої деструкції ядра (перинуклеарні вакуолі, вакуолізація ядра, конденсація хроматину); пізньої стадії деструкції ядра (каріопікноз, каріорексис, каріолізис) [8]. Частоту виявлення каріологічних змін обчислювали щодо ядер незмінених клітин.

Статистичний аналіз здійснили з використанням стандартного пакета програм «Statistica for Windows 12.0» (StatSoft, Tulsa, OK, USA). З метою перевірки нормальності розподілу використовували тест Шапіро – Уїлка. У випадку нормального розподілу визначали середнє арифметичне (M) та похибку середнього (m); при розподілі, відмінному від нормального, визначали медіану та 25–75 інтерквартильний розмах (Me [LQ; UQ]). Для порівняння параметричних даних застосовували метод t-критерію Стьюдента для залежних чи незалежних величин. При порівнянні непараметричних даних застосовували U-критерій Манна – Уїтні (незалежні величини); при аналізі залежних величин – T-критерій Вілкоксона. Здійснювали лінійний

регресійний аналіз. Відмінність вважали вірогідною при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Обчислювали співвідношення виявлення ушкоджених ядер і неушкоджених («нормальних») клітин (табл. 1). Серед цитогенетичних каріологічних показників атипові ядра частіше ідентифікували у пацієнтів із СН, але ця різниця не була вірогідною ($p > 0,05$). Різного ступеня протрузія ядер була більше притаманною для практично здорових осіб, її виявляли частіше в 6,6 раза ($p < 0,01$).

Таблиця 1

Основні каріологічні показники моноцитів/макрофагів у хворих на СН

Ознака Me [LQ; UQ]	Хворі із СН, n=24	Контрольна група, n=12
Протрузія ядра	0,005 [0; 0,022]**	0,033 [0,012; 0,038]
Атипове ядро	0,149 [0,100; 0,189]	0,076 [0,067; 0,148]
Перинуклеарна вакуолізація	0,104 [0,094; 0,159]**	0,029 [0,025; 0,062]
Вакуолізація	0,352 [0,259; 0,670]*	0,20 [0,141; 0,308]
Конденсація хроматину	0,783 [0,692; 1,524]**	0,592 [0,495; 0,594]
Здвоєні ядра	0 [0; 0,036]	0 [0; 0,017]
Містки	0,190 [0,099; 0,379]*	0,048 [0,035; 0,133]

Примітки: вірогідність різниці між показниками: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Вважається, що протрузії виникають внаслідок різних механізмів: брунькування інтерфазних ядер, «вибухання» в інтерфазному ядрі довгих плечей маркерних дицентричних хромосом, розриву в анафазі мітозу хромосомних чи хроматидних містків тощо [13].

Здвоєні ядра як ознака проліферації однаково рідко траплялись в обох групах обстежених ($p > 0,05$). Натомість містки у двоядерних моноцитах/макрофагах частіше траплялися за умов наявності СН – у 3,96 раза в порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Збільшення частоти появи двоядерних клітин і міжядерних містків свідчить про інтенсифікацію процесів клітинної проліферації, що спрямована на утворення нових клітин замість загинувших. Такі процеси спостерігають при токсичних впливах, запаленні, пухлинах тощо [14].

Початкові ознаки апоптозу/некрозу моноцитів/макрофагів виявили у хворих на СН. Зокрема, у цих осіб у порівнянні з групою контролю в 3,57 раза частіше виявляли перинуклеарну вакуолізацію ядер ($p < 0,01$); в 1,76 раза – вакуолізацію ядер ($p < 0,05$); в 1,32 раза – конденсацію хроматину ($p < 0,01$).

На нашу думку, висока частота виявлення вакуолізації ядер моноцитів/макрофагів, конденсації ядерного хроматину є свідченням посилення процесів фізіологічної (апоптоз) чи патологічної (некроз) загибелі цього типу імунокомпетентних клітин при прогресуванні атеросклерозу та синдрому СН. Фактори, що запускають процеси клітинної смерті: дисбаланс системи цитокінів у бік зростання прозапальних білків, підвищений вміст циркулюючих імунних комплексів, велика кількості окислених ліпопротеїдів у плазмі крові тощо.



Висновки

Отже, при серцевій недостатності ішемічного генезу відбуваються зміни каріологічних показників моноцитів/макрофагів, що характеризуються одночасною активацією процесів проліферації та початкових ознак апоптозу/некрозу цих клітин.

Перспективи подальших досліджень полягають у встановленні взаємних зв'язків між каріологічними показниками моноцитів/макрофагів і величиною змін гемодинамічних параметрів при серцевій недостатності.

Список літератури

1. Патогенез хронической сердечной недостаточности: изменение действующей парадигмы / В.В. Калюжин, А.Т. Тепляков, Ю.Ю. Вечерский и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – №4. – С. 71–80.
2. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 / J. Mc Murrey, S. Adamopoulos, S. Anker et al. // European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33. – P. 1787–1847.
3. Heart diseases and stroke statistics – 2013 update: a report from the American Heart Association / A.S. Go, D. Mozaffarian, V.L. Roger et al. // Circulation. – 2013. – Vol. 127. – P. e6–e245.
4. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from HNF registries / A.P. Ambrosy, G.C. Fonarov, J. Butler et al. // Am. Coll. Cardiol. – 2014. – Vol. 63. – P. 1123–1133.
5. Blair J.E. Heart failure in North America / J.E. Blair, M. Huffman, S.J. Shah // Curr. Cardiol. Rev. – 2013. – Vol. 9. – P. 128–146.
6. Angiotensinogen M235T and T174M gene polymorphisms in combination doubles the risk of mortality in heart failure / A.P. Pilbrow, B.R. Palmer, C.M. Frampton et al. // Hypertension. – 2007. – Vol. 49. – P. 322–327.
7. Fatkin D. Genetics and disease of ventricular muscle / D. Fatkin, C. Seidman, J. Seidman // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2014. – Vol. 4. – P. 23–32.
8. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра каріологіческих показателей при оценке цитологического статуса человека / Л.П. Сычева // Медицинская генетика. – 2007. – №11. – С. 3–11.
9. Юрченко В.В. Цитогенетические нарушения в эпителии щеки человека при экспозиции генотоксикантами / В.В. Юрченко // Токсикологический вестник. – 2005. – №6. – С. 14–21.
10. European Medicines Agency. ICH Harmonised Tripartite Guideline E6: Note for Guidance on Good Clinical Practice (PMP/ICH/135/95). – London : European Medicines Agency, 2002. – 46 p.
11. Recalde H.R. A simple method of obtaining monocytes in suspension / H.R. Recalde // J. Immunol. Meth. – 1984. – Vol. 69. – P. 71–77.
12. Лечение рака молочной железы с учетом показателя «половой хроматин»: методические рекомендации. – К. : АН УССР, 1974. – 22 с.
13. Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns / Z. Pan, C. Yan, R. Peng et al. // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – P. 1730–1735.
14. Китаева Л.В. Цитогенетические нарушения в слизистой оболочке фундального отдела желудка у пациентов с хроническим гастритом / Л.В. Китаева // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – №1. – С. 36–41.
2. McMurrey, J., Adamopoulos, S., Anker, S., et al. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal*, 33, 1787–1847. doi:10.1093/eurheartj/ehs104.
3. Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., et al. (2013). Heart diseases and stroke statistics – 2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 127, e6–e245. doi: 10.1161/CIR.0b013e31828124ad.
4. Ambrosy, A. P., Fonarov, G. C., Butler, J., Chioncel, O., Greene, S. J., Vaduganathan, M., et al. (2014). The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from HNF registries. *Am. Coll. Cardiol.*, 63, 1123–1133. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.053.
5. Blair, J. E., Huffman, M., Shah, S. J. (2013). Heart failure in North America. *Curr. Cardiol. Rev.*, 9, 128–146. doi: 10.2174/1573403X11309020006.
6. Pilbrow, A. P., Palmer, B. R., Frampton, C. M., Yandle, T. G., Troughton, R. W., Campbell, E., et al. (2007). Angiotensinogen M235T and T174M gene polymorphisms in combination doubles the risk of mortality in heart failure. *Hypertension*, 49, 322–327.
7. Fatkin, D., Seidman, C., & Seidman, J. (2014). Genetics and disease of ventricular muscle. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 4, 23–32. doi: 10.1101/cshperspect.a021063.
8. Sycheva, L. P. (2007). Biologicheskoe znachenie, kriterii opredeleniya i predely var'irovaniya polnogo spektra kariologicheskikh pokazatelej pri ocenke citologicheskogo statusa cheloveka [Biological significance, criteria for determining and limits of variation of the full range of caryological indicators at evaluating of human cytological status]. *Medicinskaya genetika*, 11, 3–11. [in Russian].
9. Yurchenko, V. V. (2005). Citogeneticheskie narusheniya v epiteliy scheki cheloveka pri ekspozicii genotoksikantami [Cytogenetic abnormalities in the epithelium of the human cheek upon exposure genotoxicants]. *Toksikologicheskij vestnik*, 6, 14–21. [in Russian].
10. (2002). *European Medicines Agency (2002). ICH Harmonised Tripartite Guideline E6: Note for Guidance on Good Clinical Practice (PMP/ICH/135/95)*. London: European Medicines Agency.
11. Recalde, H. R. (1984). A simple method of obtaining monocytes in suspension. *J. Immunol. Meth.*, 69, 71–77. doi: 10.1016/0022-1759(84)90278-3.
12. (1974) *Lechenie raka molochnoh zhelezi s uchetom pokazatelya "polovoj khromatin"* [The treatment of breast cancer with indicator «sex chromatin»]. Kyiv [in Ukrainian].
13. Pan, Z., Yan, C., Peng, R., Zhao, Y., He, Y., & Ding, J. (2012). Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns. *Biomaterials*, 33, 1730–1735. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.023.
14. Kitaeva, L. V. (2010). Citogeneticheskie narusheniya v slizistoy obolochke fundal'nogo otдела zheludka u pacientov s khronicheskim gastritom [Cytogenetic abnormalities in fundic mucosa of the stomach in patients with chronic gastritis]. *E'kologicheskaya genetika*, 1, 36–41. [in Russian].

References

1. Kalyuzhin, V. V., Teplyakov, A. T., Vecherskij, Yu. Yu. (2007). Patogenez khronicheskoy serdechnoj nedostatochnosti: izmenenie dejstvuyushej paradygmy. [The pathogenesis of chronic heart failure: the change of current paradigm. *Bulleten' sibirskoj medicyny*, 4, 71–80. [in Russian].

Відомості про авторів:

Федоров С.В., к. мед. н., доцент каф. терапії і сімейної медицини післядипломної освіти, Івано-Франківський національний медичний університет, E-mail: serfed@i.ua.

Ковальчук Л.Є., д. мед. н., професор, зав. каф. медичної біології та генетики, Івано-Франківський національний медичний університет.

Сведения об авторах:

Федоров С.В., к. мед. н., доцент каф. терапии и семейной медицины последилового образования, Ивано-Франковский национальный медицинский университет, E-mail: serfed@i.ua.

Ковальчук Л.Е., д. мед. н., профессор, зав. каф. мед. биологии и генетики, Ивано-Франковский национальный медицинский университет.

Information about authors:

Fedorov S.V., MD, PhD, Assoc. Professor of Therapy and Family Medicine Department of Postgraduate Education of SHEE «Ivano-Frankivsk National Medical University», E-mail: serfed@i.ua.

Kovalchuk L.Ye., MD, PhD, DSci, Professor, Head of Medical Biology and Genetics Department of SHEE «Ivano-Frankivsk National Medical University».

Поступила в редакцию 12.01.2015 г.