

На правах рукописи

ДОРОЩУК

Наталья Александровна

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕРОВ В
ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНОМ РИСКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ
СОСТОЯНИЯХ**

03.01.04 - Биохимия (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

РЯЗАНЬ – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Тихазе Алла Карловна**

Научный консультант:

доктор медицинских наук **Постнов Антон Ювенальевич**

Официальные оппоненты:

Камилов Феликс Хусаинович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологической химии

Шумаев Константин Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотофиксации и метаболизма азота

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» января 2018 года в 12.00 на заседании совета Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д.9

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Фомина М.А.

Актуальность проблемы

В нашей стране сердечно-сосудистые заболевания стоят на первом месте по смертности и инвалидизации трудоспособного населения. В связи с этим, важно иметь критерии для предсказания сердечно-сосудистых осложнений с целью их возможного предотвращения. Окислительный стресс вносит важный вклад в патогенез заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда, сердечная недостаточность и артериальная гипертензия. Развитие окислительного стресса сопровождается интенсификацией свободнорадикальных процессов, которая вызывает повреждения биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), сопровождающиеся нарушением их функциональной активности. В частности, активация свободнорадикальных процессов может приводить к окислительной деструкции молекул ДНК, что в итоге может вызывать укорочение теломерных повторов в хромосомах клеток. Тем не менее, в доступной литературе не имеется достаточно убедительных данных, подтверждающих взаимосвязь между развитием окислительного стресса и уменьшением длины теломерных повторов хромосом в клетках крови при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Исходя из вышесказанного, тема настоящей диссертации, посвященной изучению влияния окислительного стресса на окислительный катаболизм теломерной ДНК, представляется весьма актуальной.

Степень разработанности темы исследования

Ранее в лаборатории биохимии свободнорадикальных процессов Отдела сердечно-сосудистой патологии НИИКК им. А.Л.Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ была показана интенсификация свободнорадикальных процессов при развитии сердечно-сосудистой патологии. Установлено, что выраженность окислительного стресса связана с накоплением продуктов свободнорадикального окисления в крови больных атеросклерозом (Ланкин

В.З., Тихазе А.К., 2016). Показано, что снижение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, GSH-пероксидаза) связано с модификацией молекул этих ферментов дикарбонилами, накапливающимися при карбонильном стрессе (Ланкин В.З. и др., 2016).

В лаборатории медицинской генетики Отдела сердечно-сосудистой патологии НИИМК им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ был налажен и модифицирован количественный метод полимеразной цепной реакции в реальном времени для измерения длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови для отечественного оборудования.

Цель исследования: изучить влияние окислительного стресса на длину теломер в лейкоцитах крови у пациентов с различным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и у больных ИБС, а также у здоровых добровольцев, находившихся в искусственно созданных экстремальных климатических условиях (волны летней жары).

Задачи исследования

1. Определить длину теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови практически здоровых людей в различных возрастных группах жителей г. Москвы.
2. Изучить связь между уровнем окЛНП плазмы крови и длиной теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у пациентов с различным риском сердечно-сосудистых заболеваний и у больных ИБС.
3. Исследовать связь между развитием сердечно-сосудистых осложнений в течение 5 лет и длиной теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови.
4. Определить информативность определения длины теломер на прогноз развития осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы.
5. Исследовать влияние искусственно моделируемых экстремальных климатических условий (волны летней жары) на содержание МДА в

плазме крови и длину теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у практически здоровых добровольцев.

Научная новизна

Определена относительная длина теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови жителей московского региона в различных возрастных группах с использованием модифицированного метода количественной полимеразной цепной реакции. Впервые установлена связь между выраженностью окислительного стресса (увеличение уровня окЛНП в плазме крови) и проявлениями окислительной деструкции ДНК (уменьшение длины теломерных повторов в лейкоцитах крови) у пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых событий (по шкале SCORE) и больных ИБС. Впервые выявлены критические значения длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови, при которых у пациентов с ИБС и различным риском развития этого заболевания достоверно возрастает опасность развития сердечно-сосудистых событий (нестабильная стенокардия, реваскуляризация миокарда, инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, сердечно-сосудистая смерть) в течение последующих пяти лет. Установлено уменьшение длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у добровольцев при моделировании действия неблагоприятных климатических факторов (гипертермия), способных индуцировать развитие окислительного стресса.

Теоретическая значимость работы

Результаты работы создают основу для понимания молекулярного механизма окислительного катаболизма молекул ДНК при патологических и экстремальных состояниях организма, сопровождающихся развитием окислительного стресса. Кроме того, результаты работы позволяют выявить критерии для оценки риска заболеваний сердечно-сосудистой системы по изменению длины теломерных повторов в лейкоцитах крови.

Практическая значимость работы

Полученные результаты обосновывают возможность использования новых прогностических маркеров риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, основанных на изучении таких показателей как относительная длина теломеров в лейкоцитах крови и уровень окЛНП в плазме крови.

Методология и методы исследования

Для характеристики выраженности окислительного стресса исследовали уровень окисленных липопротеидов низкой плотности в плазме крови больных с использованием иммунохимического метода, а также проводили спектрофотометрическое определение содержания вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов в ЛНП плазмы крови - малонового диальдегида (МДА) по образованию окрашенного аддукта с 2-тиобарбитуровой кислотой. Исследование длины теломеров проводили с использованием биохимических и молекулярно-биологических методов при помощи ПЦР в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Увеличение риска сердечно-сосудистых заболеваний или наличие клинических проявлений ишемической болезни сердца сопровождается снижением длины теломеров и увеличением уровня окисленных липопротеидов в плазме крови;
2. При уменьшении длины теломеров ниже 70% от значений длины теломеров практически здоровых людей риск развития сердечно-сосудистых заболеваний возрастает;
3. При моделировании экстремальных климатических условий у практически здоровых добровольцев длина теломеров снижается.

Степень достоверности и апробации результатов

Результаты получены с помощью адекватных методов с использованием современного высокоточного оборудования. Объем выборки, а также количество независимых экспериментов позволили получить достоверные результаты при проведении статистического анализа.

Результаты работы доложены на 4 конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Возможности современной кардиологии в рамках модернизации» (Москва, 2013), Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Достижения современной кардиологии» (Москва, 2014), XXII Российском Национальном Конгрессе «Человек и Лекарство» (Москва, 2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Кардиология 2016: итоги и перспективы» (Москва, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Личный вклад автора

Автором модифицирован и внедрен метод измерения длины теломеров для клинического использования. Автором лично выполнено: все экспериментальные исследования, включая измерения генетических и биохимических параметров, статистическая обработка результатов, статистическая обработка полученных данных, телефонное анкетирование пациентов, анализ литературы по исследуемой теме, подготовка публикаций по теме диссертации.

Структура диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 142 источника, из них 19 – отечественные. Диссертация изложена на 102 страницах. Результаты и обсуждение представлены 31 рисунком и 10 таблицами.

Финансовая поддержка и благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 15-04-03030 и Российского Научного Фонда № 14-15-00245.

Материалы и методы

Клиническая характеристика обследованных больных

В работе использовали 629 образцов крови обследованных в возрасте от 18 до 69 лет, которые проходили обследование в ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ по теме государственного контракта «Апробация и внедрение в практику амбулаторно-поликлинических учреждений новых алгоритмов предупреждения, диагностики и лечения атеросклероза на примере ЗАО г. Москвы» по научно-технической программе «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения атеросклероза и его осложнений». Все участники данной программы были разделены на 3 группы: низкого/умеренного риска сердечно-сосудистой смерти по шкале SCORE (211 человек, средний возраст $48,5 \pm 1,4$), высокого/очень высокого риска развития сердечно-сосудистой смерти по шкале SCORE (217 человек, средний возраст $58 \pm 1,2$), группу с клиническими проявлениями ИБС (201 человек, средний возраст $61,5 \pm 1,3$). Разделение по группам производилось на основании клиничко-анамнестических данных и результатов инструментальных методов обследования (ЭКГ, мониторинг ЭКГ по Холтеру, ВЭМ-проба, ЭХО-КГ).

Взятие венозной крови для выделения ДНК из лейкоцитов и определения показателей окислительного стресса производили на первые сутки и 31 сутки после начала исследования. Условия проведения эксперимента были утверждены на этическом комитете НИИКК «РКНПК» МЗ РФ и ГНЦ РФ ИМБП РАН. Все испытуемые прошли предварительное медицинское обследование и подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Контрольная группа (187 человек) была сформирована из числа обследованных участников с низким и умеренным риском развития сердечно-сосудистой смерти по шкале SCORE (без выявленной сердечно-

сосудистой патологии и нарушений углеводного обмена). В группу сравнения были включены практически здоровые лица с нормальными значениями АД и нормальными показателями уровня сахара в крови.

Из 629 обследованных 258 человек были опрошены по телефону через 5 лет после проведения генетических исследований о сердечно-сосудистых осложнениях, которые наблюдались у них в течение этого времени.

Характеристика добровольцев, включенных в исследование по влиянию искусственно созданных экстремальных климатических условий

В уникальном исследовании определяли изменение биохимических и генетических параметров 6 добровольцев, принявших участие в исследовании по изучению влияния искусственно созданных экстремальных условий окружающей среды на человека (возраст от 22 до 46 лет), которое проводили на базе медико-технического комплекса Института медико-биологических проблем РАН. Все участники эксперимента прошли предварительное медицинское обследование и подписали информированное согласие на участие в данном климатическом исследовании. В ходе исследования добровольцы в течении 30 дней находились в медико-техническом комплексе при искусственно созданных климатических условиях, соответствующих волнам жары в июле-августе 2010 года на территории г. Москвы (условия моделировали на основании данных Росгидромета РФ). Дневная температура колебалась в пределах от 27⁰С до 37⁰С, ночная температура колебалась от 26⁰С до 31⁰С. Атмосферное давление не превышало 753 мм.рт.ст.

Условия пребывания добровольцев в МТК представлены на рисунке 1.

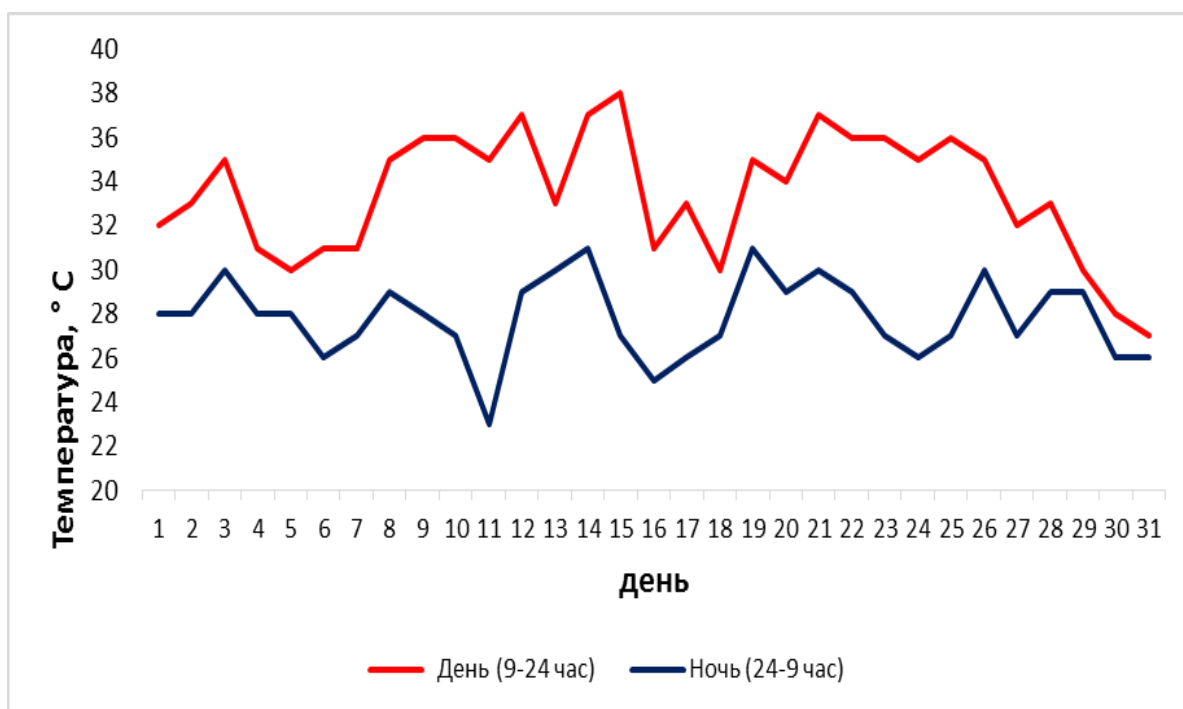


Рисунок 1. Колебания температуры в процессе пребывания добровольцев в медико-техническом комплексе.

Биохимические методы исследования

Определение уровня окисленных липопротеидов низкой плотности.

Содержание окисленных липопротеидов низкой плотности в плазме крови пациентов определяли иммунобиохимическим методом, используя тест-наборы Mercodia (Швеция). Данный метод разработан как твердофазный иммуноферментный анализ, в основе которого лежит принцип взаимодействия двух типов моноклональных антител против различных антигенных детерминант молекулы окисленного аполипопротеина В-100. Концентрацию окЛНП рассчитывали по калибровочной кривой. Измерение концентрации каждого образца производили дважды.

Определение содержания малонового диальдегида в плазме крови.

Содержание МДА оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса, с регистрацией оптической плотности при длине волны 532 нм на спектрофотометре Hitachi-557 и выражали в ΔD 532 на 1 мл плазмы.

Молекулярно-биологические методы исследования

Выделение ДНК. Кровь собирали в пробирки с ЭДТА (1мг/мл) в качестве антикоагулянта. ДНК из замороженной крови выделяли с использованием набора для выделения ДНК «ДНК-Экстран1» (ЗАО «Синтол» Россия). Полученную ДНК разводили в 100 мкл T₁₀E₁-буфера (10 mM Трис-НСl, рН 8,0, 1мМ ЭДТА). Концентрацию ДНК измеряли при помощи нанофотометра IMPLEN (Германия). Полученный раствор ДНК хранили при температуре -20⁰С.

Измерение относительной длины теломеров. Для измерения относительной длины теломеров в лейкоцитах крови использовали метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Реакционная смесь содержала: 20 нг ДНК, 10 мкл смеси SIBR Green, по 1 мкл праймеров (концентрация 900нМ каждого):

- telg (5'-АСАСТААGGТТТGGGТТТGGGТТТGGGТТТGGGТТАGТGT-3'),
- telc(3'-GТТАGGТATCCСТАТCCСТАТCCСТАТCCСТАТCCСТААСА-5'),
- albu(5'-GGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGaaatgctgcacagaatccttg -3'),
- albd (3'-GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGgaaaagcatggtcgcctgtt-5').

Амплификацию в реальном времени проводили на анализаторе нуклеиновых кислот «АНК-32» (Россия) в следующем режиме (Richard M. Sawthon 2009):

- Денатурация ДНК: 15мин при 95⁰С
- Синтез синтетической матрицы теломерного повтора: 2 цикла 15сек при 94⁰С, 15 сек при 49⁰С.
- Амплификация теломерного повтора и гена альбумина: 50 циклов 15 сек при 94⁰С, 10 сек при 62⁰С, 15 сек при 74⁰С, 10 сек при 84⁰С, 15 сек при 88⁰С

Альбумин служил внутренним контролем, относительно которого определяли длину теломерного повтора. В качестве калибратора использовали ДНК, выделенную из клеточной линии HeLa.

Определение относительной длины теломеров проводили 3 раза для каждого образца ДНК.

Расчет относительной длины теломеров. Кривые накопления продукта, полученные в процессе ПЦР в реальном времени, были подвергнуты математической обработке. Нами был разработан метод математической обработки данных, который ранее не был описан в литературе. Показания уровня флюоресценции для теломеров снимали при температуре 74°C, для альбумина – при температуре 88°C. На основании полученных показаний строили две отдельные кривые роста уровня флюоресценции для теломеров и для альбумина, после чего переводили эти кривые в логарифмический вид и определяли расстояние между ними как ΔCT . Относительную длину теломеров вычисляли по формуле: $2^{\Delta CT}$. Результаты обработки относительной длины теломеров представлены в процентах от величины калибратора.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 21.0 (SPSS Inc., США).

При сравнении групп по количественному признаку использовали параметрический (t-критерий Стьюдента) метод. При сравнении групп по качественному признаку использовали критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Для выявления взаимосвязи между длиной теломерных повторов и возрастом, а также длиной теломерных повторов и уровнем окЛНП применяли метод корреляционного анализа по Спирману. Параметры, имеющие нормальное распределение признака, представлены в виде среднего значения и доверительного интервала (Mean; 95%CI). Анализ

межгрупповых различий по количественным признакам, имеющим непараметрическое распределение, проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. О динамике длины теломерных повторов в климатическом исследовании судили по показателю $\Delta\%$, который рассчитывали по формуле $\Delta\% = \frac{ОДТ_1 - ОДТ_{30}}{ОДТ_1} \times 100$, где $ОДТ_1$ – относительная длина теломерных повторов в первый день исследования, $ОДТ_{30}$ – значение относительной длины теломеров на 30-е сутки климатического исследования. Динамику длины теломерных повторов в период пребывания в МТК оценивали при помощи критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Исследование длины теломерных повторов хромосом

В ходе работы были определены значения относительной длины теломеров в общей группе обследованных (635 человек).

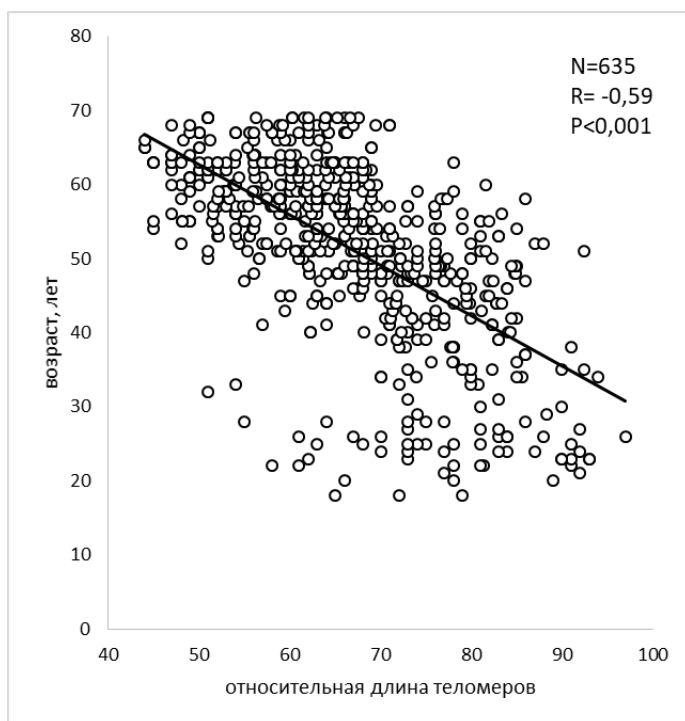


Рисунок 2. Корреляционная зависимость длины теломеров от возраста участников исследования.

Значения длины теломеров колебались в пределах от 39 до 97 относительных единиц, среднее значение составило $66,5 \pm 11$. Значимых различий в длине теломеров у мужчин и женщин обнаружено не было. Была выявлена отрицательная зависимость длины теломеров от возраста ($R = -0,59$, $P < 0,001$) (рис.2).

Для определения нормальных значений длины теломеров в данном исследовании были использованы значения ОДТ пациентов группы сравнения, которая состояла из практически здоровых лиц. Для этого всех членов группы сравнения распределили по возрасту: 18 человек 20-29 лет, 12 человек 30-39, 28 человек 40-49, 47 человек 50-59, 22 человека 60-69 лет. Длина теломеров у мужчин и женщин в контрольной группе достоверно не различалась, поэтому при определении возрастных норм не проводили разделение по полу. Полученные в работе значения возрастных норм представлены в таблице 1.

Таблица 1

Нормальные значения длин теломеров в различных возрастных группах

Возраст (n)	Среднее значение относительной длины теломеров (\pm ДИ)
20-29 (18)	$80,5 \pm 3,4$
30-39 (12)	$74,3 \pm 6,2$
40-49 (28)	$70,2 \pm 3,3$
50-59 (47)	$68,4 \pm 3,1$
60-69 (22)	$62,7 \pm 4,2$
70-79 (25)	$60,0 \pm 3,0$

Исследование биохимических и генетических параметров у обследованных в различных группах риска развития сердечно-сосудистых событий

При сравнении уровня окЛПН в плазме крови и длины теломеров в нашем исследовании было показано, что происходит снижение длины теломеров на 14,3% от группы с низким и умеренным риском до группы с клиническими проявлениями ИБС и, одновременно, на 17,8% возрастает уровень окЛПН в плазме крови у этих же пациентов (рис.3).

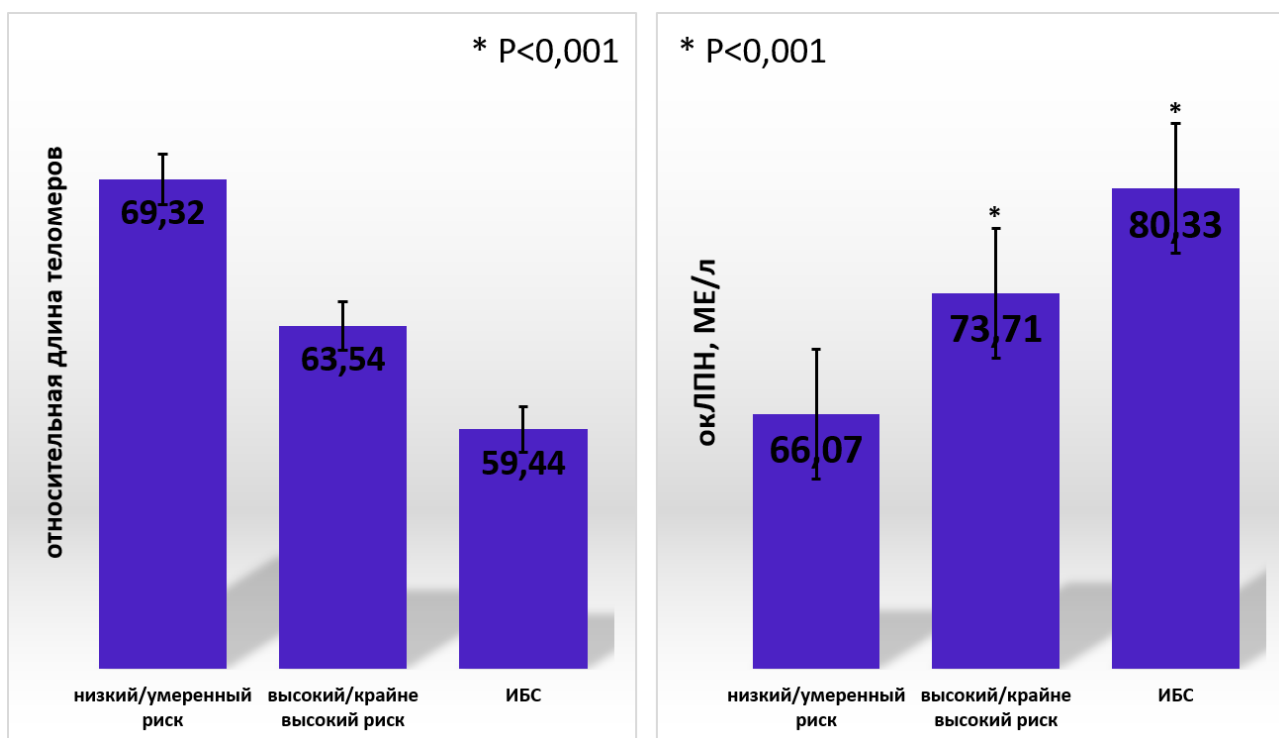


Рисунок 3. Относительная длина теломеров и уровень окЛПН у обследованных с различным риском сердечно-сосудистой смерти по SCORE и с клиническими проявлениями ИБС.

При проведении корреляционного анализа нами было подтверждено наличие зависимости между длиной теломеров и уровнем окЛПН. Как видно из рисунка 4, нами была выявлена умеренная отрицательная корреляция ($R=-0,43$) между этими параметрами.

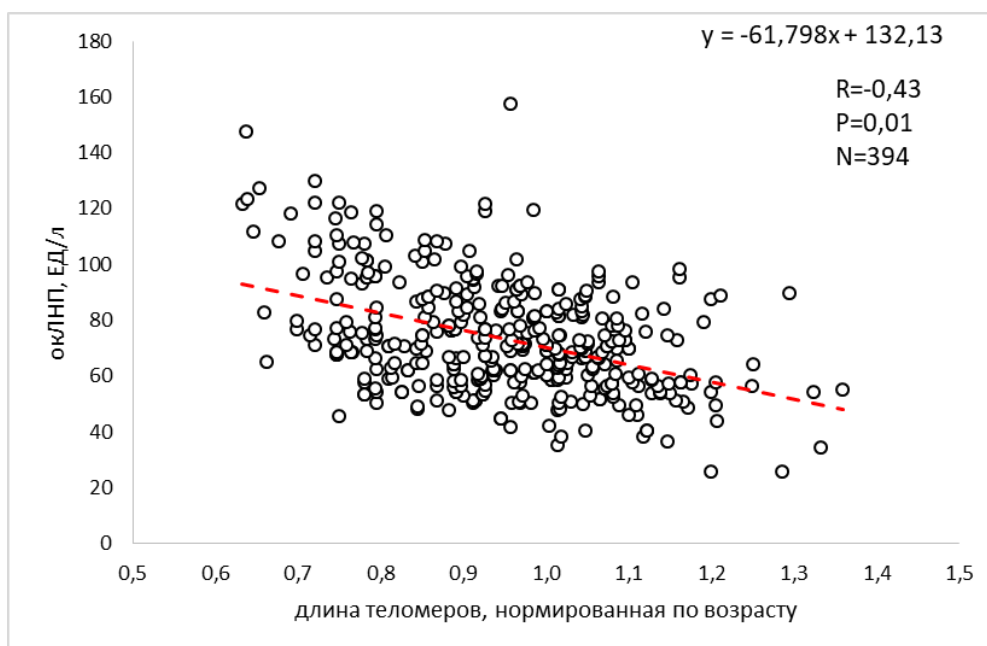


Рисунок 4. Зависимость длины теломерных повторов хромосом от уровня окЛНП у обследованных с различным риском сердечно-сосудистой смерти по SCORE и с клиническими проявлениями ИБС.

Для введения поправки на возрастные изменения длины теломеров при исследовании обследованных с различным риском нами была построена кривая зависимости длины теломеров от возраста практически здоровых людей. С возрастом длина теломеров, как и следовало ожидать, достоверно снижается. Как видно из рисунка 5, у обследованных с низким и умеренным риском длина теломеров совпадает с длиной теломеров практически здоровых людей соответствующего возраста. При этом у обследованных с высоким риском сердечно-сосудистой смерти по шкале SCORE и у больных с клиническими проявлениями ИБС длина теломеров была достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц соответствующего возраста. Таким образом, изменение длины теломеров, которое мы наблюдали у обследованных с высоким риском и у больных ИБС не могла быть связана только с возрастными изменениями и, по всей вероятности, может быть объяснена наличием окислительного стресса у этих пациентов.

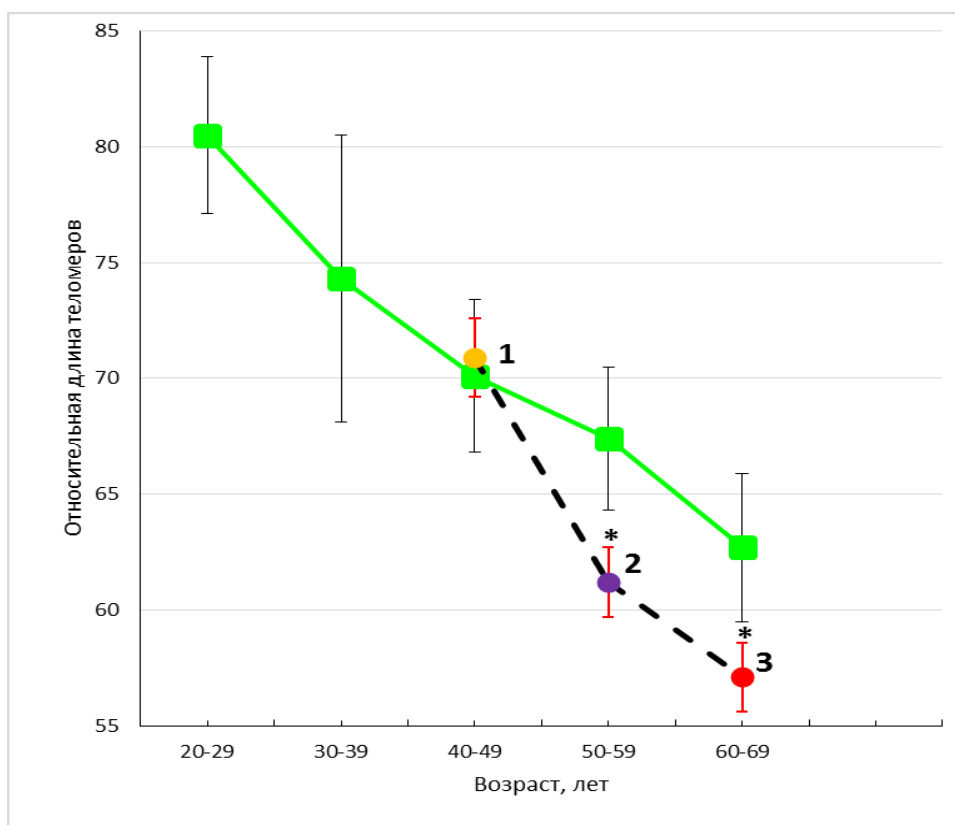


Рисунок 5. Возрастные изменения длины теломеров у практически здоровых людей и у пациентов с различным риском сердечно-сосудистой смерти (по шкале SCORE) и с клиническими проявлениями ИБС. 1– длина теломеров у пациентов с низким и умеренным риском, 2- длина теломеров у пациентов с высоким и крайне высоким риском, 3- длина теломеров у больных ИБС.

Анализ сердечно-сосудистых событий, произошедших в течение пяти лет после измерения длины теломерных повторов хромосом

По прошествии пяти лет после проведенного обследования было опрошено 257 человек о возникших у них сердечно-сосудистых осложнениях (76 человек - из группы низкого/умеренного риска, 91 человек из группы высокого/крайне высокого риска, 90 человек из группы с клиническими проявлениями ИБС). Сердечно-сосудистые события, выявленные в результате опроса, представлены в таблице 2. Как и следовало ожидать, больше всего событий наблюдалось в группе с клиническими проявлениями ИБС. Причем, если в группе с низким и умеренным риском количество событий было не велико и не отмечались инфаркт миокарда и летальный

исход, то в группе с клиническими проявления ИБС такие события были зафиксированы 16 и 5 раз соответственно.

Таблица 2

Сердечно-сосудистые события через 5 лет после обследования 257 человек

Осложнения	Низкий/умеренный риск сердечно-сосудистой смерти по SCORE (n=76)	Высокий/крайне высокий риск сердечно-сосудистой смерти по SCORE (n=91)	Клинические проявления ИБС (n=90)
Нет событий	74 (97,4%)	80 (87,9%)	43 (47,8%)
Нестабильная стенокардия	1 (1,3%)	7 (7,7%)	10 (11,1%)
Реваскуляризация миокарда	0 (0%)	1 (1,1%)	11 (12,2%)
ОНМК	1 (1,3%)	1 (1,1%)	5 (5,5%)
ИМ	0 (0%)	2 (2,2%)	16 (17,8%)
Сердечно-сосудистая смерть	0 (0%)	0 (0%)	5 (5,5%)

Было проведено сравнение длины теломеров пациентов, у которых были зафиксированы сердечно-сосудистые события в течение 5 лет после измерения длины теломеров с длиной теломеров опрошенных лиц, не перенесших сердечно-сосудистого события. Длина теломеров у лиц, перенесших какие-либо сердечно-сосудистые события, была короче до развития события ($57,6 \pm 1,2$), чем у опрошенных, у которых не было сердечно-сосудистых событий в течение 5 лет ($66,1 \pm 1,4$) ($p < 0,001$).

Однако достоверные различия длины теломеров наблюдались только у пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, инфаркт миокарда, и лиц, сердечно-сосудистая смерть у которых наступила в течение пяти лет после обследования (рис.6). Таким образом, можно полагать, что длина теломеров является предиктором возникновения сердечных фатальных событий у больных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

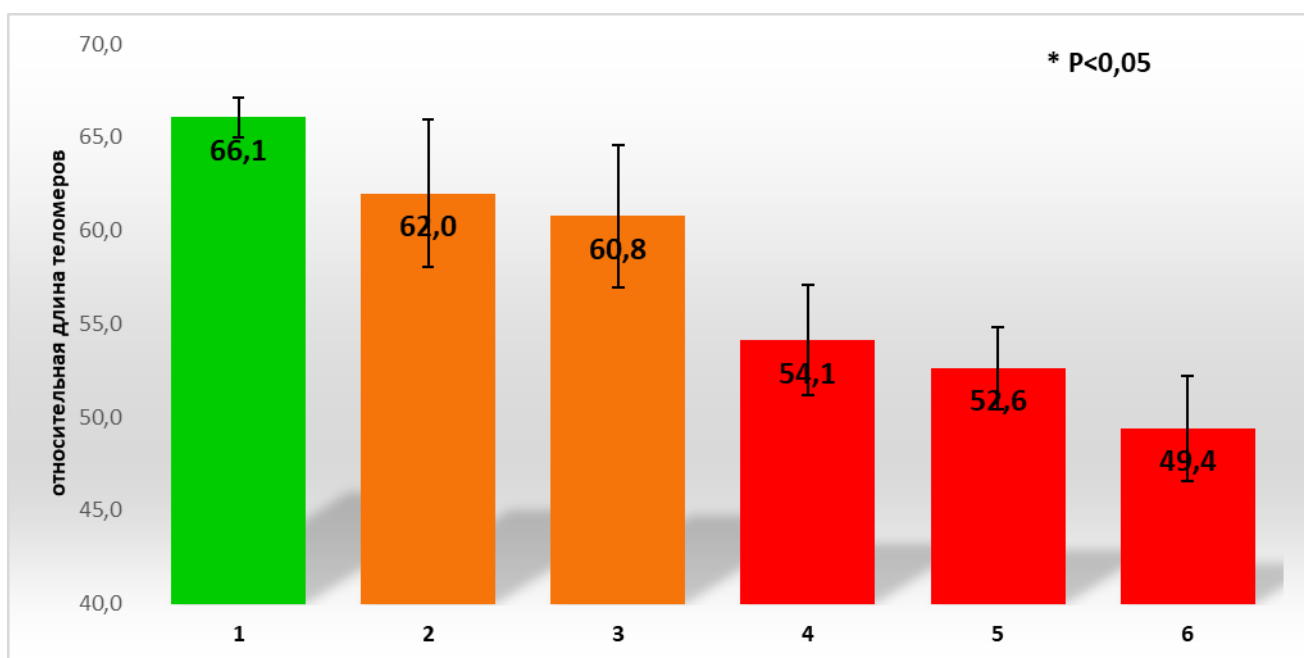
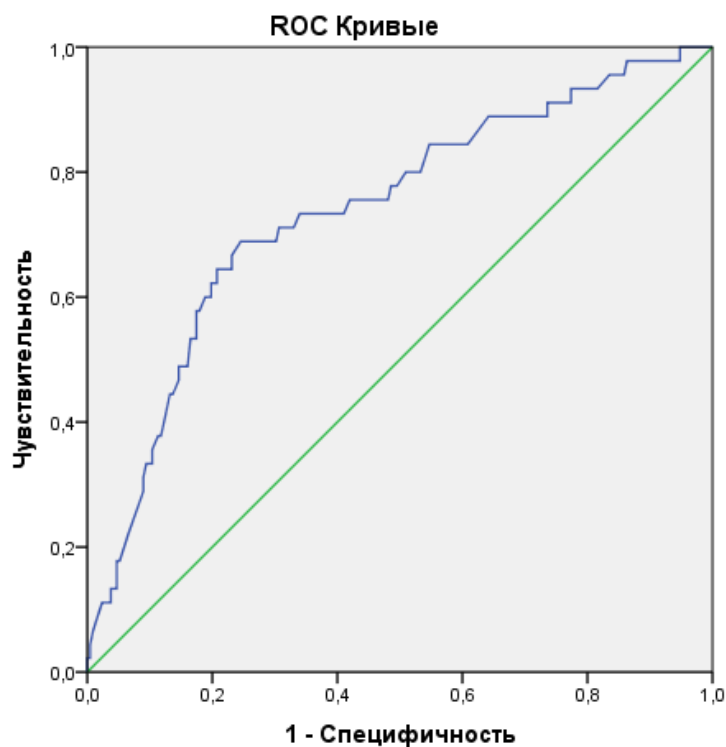


Рисунок 6. Средние значения длины теломерных повторов хромосом в группе опрошенных с различными сердечно-сосудистыми событиями, возникшими в течение 5 лет после обследования и без событий. (1 – нет событий, 2 – стенокардия, 3 – реvascularизация миокарда, 4 – острое нарушение мозгового кровообращения, 5 – инфаркт миокарда, 6 – сердечно-сосудистая смерть).

Для выявления диагностической значимости метода оценки длины теломерной ДНК как генетического биомаркера тяжести сердечно-сосудистых событий был проведен метод построения ROC-кривой (рис.8). Площадь под кривой составила 0,73 (95% доверительный интервал), т.е. в 73 % случаев короткая длина теломеров сопровождается развитием в течение

пяти лет сердечно-сосудистых осложнений. Чувствительность данного метода составила 68,9%, специфичность - 70,3% ($P=0,0005$).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 7. ROC кривая для прогностической значимости длины теломеров в развитии сердечно-сосудистых осложнений.

Данные проведенного ROC-анализа свидетельствуют о высокой связи длины теломерной ДНК с предрасположенностью к сердечно-сосудистым осложнениям.

Влияние экстремальных климатических условий на изменение длины теломерных повторов хромосом у добровольцев

В отдельном исследовании изучалось влияние волн летней жары на содержание МДА в плазме крови и длину теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови.

Динамическое изменение параметров окислительного стресса и длины теломеров у добровольцев за период пребывания в медико-техническом комплексе

пациент	1-е сутки исследования		30-е сутки исследования	
	ОДТ	МДА	ОДТ	МДА
1	84,3	1,36	69,4	1,88
2	80,4	1,67	66,6	2,41
3	88,9	2,61	77,2	2,09
4	68,9	1,88	62,5	2,61
5	85,6	1,88	75,4	2,2
6	72,7	1,88	60,6	2,09

Через 30 дней пребывания в медико-техническом комплексе у испытуемых были выявлены проявления окислительного стресса, что видно по увеличению вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов в плазме крови - малонового диальдегида примерно на 60% и одновременно у них наблюдалось снижение длины теломеров на 17%. У здоровых добровольцев при волнах летней жары наблюдалась та же тенденция изменений, которая наблюдалась у пациентов с различным риском сердечно-сосудистых осложнений. Действительно, биохимические параметры при волнах летней жары могут свидетельствовать об изменениях, которые могут способствовать развитию сердечно-сосудистых осложнений (табл.3, рис.8).

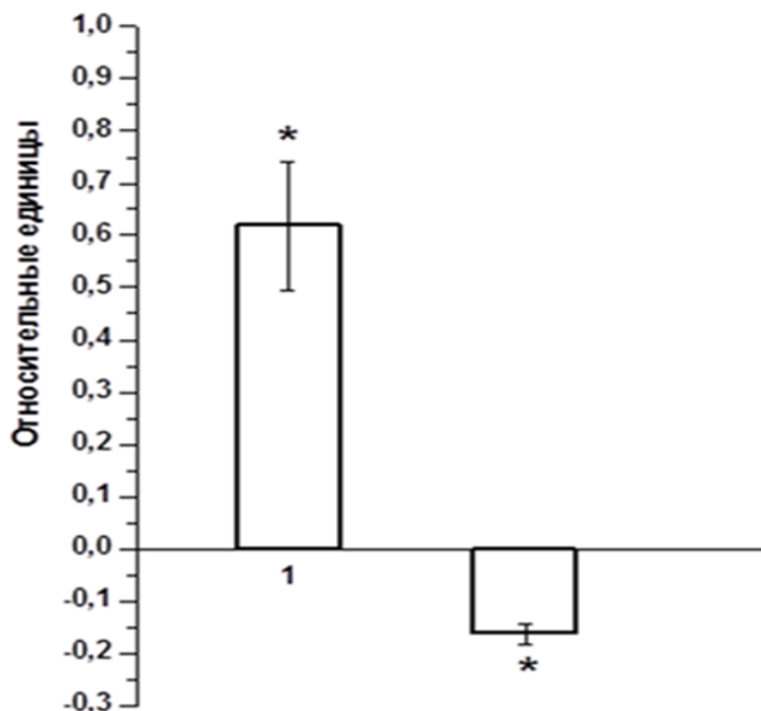


Рисунок 8. Относительные изменения уровня МДА и длины теломеров в крови испытуемых, подвергшихся действию гипертермии в течение 30 дней. 1- содержание малонового диальдегида в плазме крови; 2- относительная длина теломеров в лейкоцитах крови.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что волны летней жары могут способствовать интенсификации окислительного стресса и, вследствие окислительной деструкции ДНК, уменьшению длины теломеров. Эти данные могут быть объяснением молекулярного механизма увеличения сердечно-сосудистых инцидентов у больных ИБС и атеросклерозом при волнах летней жары.

Выводы

1. Установлены пределы длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови практически здоровых жителей г.Москвы для различных возрастных групп (20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, 60 и старше).

2. Выявлена отрицательная корреляция ($R=-0,43$) между длиной теломеров в лейкоцитах крови и уровнем окЛНП в плазме крови пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.
3. Обнаружено уменьшение длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови при увеличении риска развития сердечно-сосудистых заболеваний или наличие клинических проявлений ИБС.
4. Установлены критические значения длины теломеров в лейкоцитах крови, при которых риск развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний достоверно возрастает.
5. Обнаружено достоверное уменьшение длины теломеров в лейкоцитах крови практически здоровых добровольцев при моделировании экстремальных климатических условий (волны летней жары).

Практические рекомендации

Больным сердечно-сосудистыми заболеваниями целесообразно проводить измерение длины теломеров, поскольку снижение длины теломеров более чем на 40% от нормального значения соответствующего возраста может свидетельствовать об опасности сердечно-сосудистых осложнений, что необходимо учитывать при проведении терапии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Дорощук, Н.А. Изменение длины теломер хромосом при воздействии климатических условий, имитирующих жару в Москве летом 2010 год / Н.А. Дорощук, А.Д. Дорощук, О.В.Родненков, М.К. Осяева, З.Б.Хасанова, Ю.Д. Хесуани, А.Ю. Постнов, И.Е.Чазова //Кардиологический Вестник. – 2013. – Т. VIII (XX), №2. – С. 32-35.
2. Ланкин, В.З. Окислительный стресс как фактор риска осложнения сердечно-сосудистых заболеваний и преждевременного старения при действии неблагоприятных климатических условий / В.З Ланкин, А.Ю.

Постнов, О.В. Родненков, Г.Г. Коновалова, Н.А. Дорошук, А.К. Тихазе, М.К. Осяева, А.Д. Дорошук, Ю.Д. Хесуани, И.Е. Чазова // Кардиологический вестник. – 2013. – Т. VIII (XX), № 1. – С. 22-25.

3. Дорошук, Н.А. Прямое повреждающее воздействие на ДНК человека неблагоприятных экологических и климатических факторов / Н.А. Дорошук, А.Ю. Постнов, А.Д. Дорошук, З.Б. Хасанова, Н.В. Коновалова, Ю.Д. Хесуани, М.К. Осяева, О.В. Родненков, И.Е. Чазова // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86, № 12. – С. 72-77.

4. Дорошук, Н.А. Влияние окислительного стресса на длину теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови лиц с различным риском сердечно-сосудистой смерти и больных ИБС / Н.А. Дорошук, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин, Т.К. Медникова, А.Ю. Постнов, В.В. Кухарчук // Кардиологический вестник. – 2017. – Т. XII, №1. – С. 32-36.

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ЛНП –липопротеины низкой плотности

МДА – малоновый диальдегид

окЛНП – окисленные липопротеины низкой плотности

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭКГ – электрокардиограмма