

Н.П. Судаков ^{1, 3, 4, 5}, Т.П. Попкова ³, А.И. Катыхшев ², О.А. Гольдберг ¹, М.А. Новикова ¹,
С.Б. Никифоров ¹, Б.Г. Пушкарев ¹, И.В. Клименков ^{4, 5}, С.А. Лепехова ^{1, 6}, К.А. Апарцин ^{1, 6},
С.Д. Ежикеева ³, М.Н. Тен ³, Ю.М. Константинов ^{2, 5}

ОСТРАЯ ИШЕМИЯ МИОКАРДА: ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК КРОВИ ПРИ ПЕРЕВЯЗКЕ ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ ЛЕВОЙ НИСХОДЯЩЕЙ ВЕТВИ КОРОНАРНОЙ АРТЕРИИ

¹ ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)

² ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН (Иркутск)

³ ГУЗ «Иркутская областная ордена «Знак Почета» клиническая больница» (Иркутск)

⁴ ФГБУН Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)

⁵ ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» (Иркутск)

⁶ ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (Иркутск)

Цель исследования: анализ динамики уровня свободно циркулирующей мтДНК крови при перевязке верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии. Нами показано, что концентрация свободно циркулирующей мтДНК крови через 24 часа после наложения лигатуры проявила тенденцию к снижению, а через 48 и 72 часа увеличилась и достигла значений, близких к контролю. Полученные данные определяют необходимость дальнейших исследований динамики данного показателя на более отдаленных сроках моделирования ишемии миокарда, что будет способствовать объективной оценке его значения для диагностики и прогнозирования острых повреждений миокарда.

Ключевые слова: перевязка левой коронарной артерии, ишемия миокарда, уровень мтДНК, биомаркеры цитолиза кардиомиоцитов, ПЦР в реальном времени

ACUTE MYOCARDIAL ISCHEMIA: CHANGES OF FREE CIRCULATING MTDNA LEVEL IN BLOOD AFTER OCCLUSION OF THE UPPER ONE-THIRD LEFT DESCENDING BRANCH OF THE CORONARY ARTERY

N.P. Sudakov ^{1, 3, 4, 5}, T.P. Popkova ³, A.I. Katyshev ², O.A. Goldberg ¹, M.A. Novikova ¹,
S.B. Nikiforov ¹, B.G. Pushkarev ¹, I.V. Klimenkov ^{4, 5}, S.A. Lepekhova ^{1, 6}, K.A. Apartsin ^{1, 6},
S.D. Ezhikeeva ³, M.N. Ten ³, Yu.M. Konstantinov ^{2, 5}

¹ Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

³ Irkutsk Regional Clinical Hospital, Irkutsk

⁴ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

⁵ Irkutsk State University, Irkutsk

⁶ Irkutsk Scientific Center SB RAMS, Irkutsk

The aim of the present study is to analyze the dynamics of free circulating mtDNA level in blood after occlusion of the upper one-third left descending branch of the coronary artery. We showed that the concentration of free circulating mtDNA of blood tends to decrease 24 hours after ligation; it increased and reached values close to control samples 48 and 72 hours after ligation. These data define the need in further investigation of the dynamics of this parameter during later periods of myocardial infarction modeling that will contribute to objective evaluation of its significance for acute myocardial damage diagnostics and prognosis.

Key words: occlusion of the left coronary artery, myocardial ischemia, mtDNA level, biomarkers of cardiomyocyte cytolysis, real time PCR

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность профилактики и лечения острых ишемических повреждений миокарда во многом предопределяется возможностями технологий их диагностического скрининга и мониторинга [10]. К сожалению, использование для этих целей существующего спектра биомаркеров цитолиза не всегда позволяет однозначно оценить состояние пациента и выбрать тактику лечения инфаркта миокарда [9]. Это определяет актуальность поиска новых биомаркеров повреждений кардиомиоцитов [10]. Перспективным неспецифическим маркером цитолитических процессов является уровень свободно циркулирующей

митохондриальной ДНК (мтДНК) плазмы крови. Установлено, что данный показатель является критерием прогноза развития осложнений и смертности при различных патологических процессах (злокачественные опухоли, бактериальный менингит) [5, 6, 8, 13]. Несмотря на отсутствие тканеспецифичности, высокую актуальность представляет изучение возможности использования данного показателя в комплексе с кардиоспецифичными биомаркерами цитолиза в диагностике и прогнозе течения острых ишемических повреждений сердца. В рамках данного направления нами показано, что на 3-и сутки после подкожного введения адреналина у крыс линии «Вистар» проис-

ходит возрастание свободно циркулирующей мтДНК крови [4, 11]. Необходимость объективной оценки возможностей данного показателя в диагностике инфаркта миокарда определила актуальность дальнейшего изучения динамики свободно циркулирующей мтДНК крови на различных моделях острого ишемического повреждения миокарда. В этой связи целью настоящего исследования явилось изучение уровня мтДНК плазмы при перевязке верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальных животных использовали кроликов породы Шиншилла, изучались следующие группы: № 1 – контроль ($n = 6$; ложная операция: вскрытие грудной клетки без перевязки коронарной артерии); № 2 – эксперимент ($n = 6$; перевязка верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии). Экспериментальный инфаркт миокарда подтверждали данными ЭКГ (электрокардиограф «ЭЛКАР», Россия). Взятие крови у животных осуществляли на 1-е, 2-е и 3-и сутки наблюдения. Эвтаназию с целью получения материала для морфологических исследований проводили на 3-и сутки. Активность биомаркеров цитолиза в сыворотке

крови (общей креатинфосфокиназы (КФК), креатинфосфокиназы МВ (КФК-МВ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ)) оценивали на биохимическом анализаторе Beckman synhron 4 (Beckman coulter, США). Из плазмы крови, свободной от тромбоцитов [5], выделяли ДНК с помощью набора реагентов «проба НК» (ДНК-технология, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Количественный анализ мтДНК осуществляли методом real-time PCR, используя амплификаторы iCycler IQ4 (Bio-Rad, США) и Dtlite (ДНК-технология, Россия). Амплифицировали фрагмент гена 16S рРНК (прямой праймер: 5'-GTGTAGCCGCTATTAAAGGTTTCG-3'; обратный праймер: 5'-GGCTCTGCCACCTTAACTAGCT-3') [6]. Для ПЦР в реальном времени использовали реакционную смесь, содержащую SYBR Green (Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix – Thermo Fisher Scientific Inc., США). Морфологические изменения миокарда оценивали световой микроскопией гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Все манипуляции с экспериментальными животными осуществлялись, согласно положениям Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Межгрупповые различия оценивали критериями Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса.

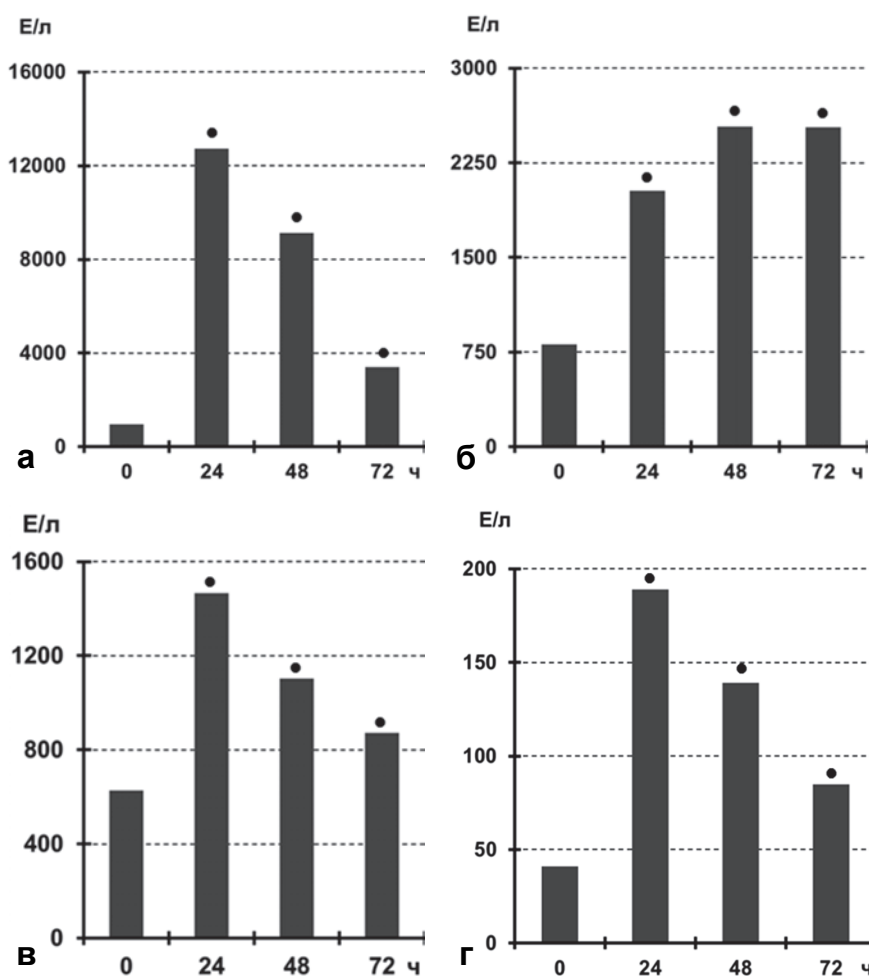


Рис. 1. Динамика активности ферментов – маркеров цитолиза – в крови при перевязке верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии: **а** – активность креатинкиназы; **б** – активность креатинкиназы фракции МВ; **в** – активность лактатдегидрогеназы; **г** – активность аспартатаминотрансферазы; • – $p \leq 0,05$, в сравнении с группой контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что сразу же после лигирования верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии на ЭКГ появлялись единичные экстрасистолы по типу тригеминии, что свидетельствует о нарастании в миокарде ишемии и развитии выраженных электролитных расстройств. Возникал зубец Парди к 30-й минуте ишемии. На 60-й минуте экспериментальной ишемии миокарда продолжались отдельные желудочковые экстрасистолы. Далее ЭКГ регистрировала идиовентрикулярный ритм с возникновением асистолии.

Через 24 часа после лигирования коронарной артерии в крови экспериментальных животных наблюдали значимое возрастание общей активности креатинфосфокиназы (рис. 1). В период от 48 до 72 часов активность КФК постепенно снизилась, а КФК-МВ увеличилось, по сравнению с контролем. Активность лактатдегидрогеназы на 1–2-е сутки незначительно повысилась. На 3-и сутки значения активности ЛДГ практически полностью совпадали с контролем. Активность АСТ была высокой на всем протяжении эксперимента. Полученные данные объективно свидетельствуют о развитии деструктивных повреждений кардиомиоцитов, индуцированных крупноочаговой ишемией миокарда.

На 3-и сутки после лигирования левой ветви коронарной артерии в сердечной мышце животных наблюдались очаги некроза мышечных волокон с перифокальными зонами воспаления. Выявлялись дегенеративные изменения кардиомиоцитов, характеризующиеся утратой поперечной исчерченности, потерей саркоплазмы.

После лигирования коронарной артерии в промежутке через 24 часа на фоне возрастания активности наблюдалась выраженная тенденция к значительному снижению уровня свободно циркулирующей мтДНК плазмы (рис. 2). Через 48–72 часа после наложения лигатуры на фоне выраженных структурно-функциональных нарушений в миокарде содержание мтДНК плазмы крови увеличилось и практически не отличалось от данных контроля, что в целом согласуется с ранее полученными нами данными [4, 11].

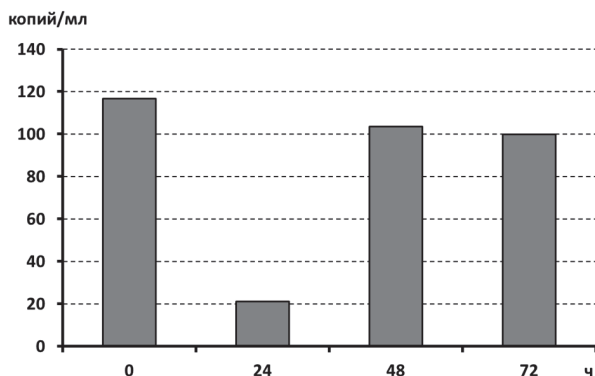


Рис. 2. Динамика уровня свободно циркулирующей мтДНК крови перевязке верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о том, что особенности динамики уровня мтДНК плазмы крови в течение 3 суток после экспериментальной лигирования верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии в целом проявляют сходство с закономерностями, ранее выявленными нами на модели мелкоочаговой ишемии миокарда, индуцированной инъекциями адреналина: с 1-х суток наблюдается тенденция к снижению данного показателя с последующим возрастанием данного показателя на 3-и сутки эксперимента [11]. Интерес представляют механизмы, определяющие характер выявленных изменений уровня мтДНК плазмы крови экспериментальных животных. Принимая во внимание ключевую роль митохондриальной дисфункции в развитии ишемических повреждений миокарда в эксперименте и клинике [1], можно предположить, что развитие структурно-функциональных нарушений митохондрий не является причиной возрастания концентрации мтДНК плазмы крови. Это также подтверждается данными, полученными на модели дислипидемии у крыс линии «Вистар»: установлено отсутствие значимых изменений уровня мтДНК на 1-е, 3-и, 5-е сутки эксперимента, несмотря на возрастание активности АЛТ и АСТ, а также формирование в клетках печени выраженных структурно-функциональных нарушений митохондрий [2, 3, 4]. Таким образом, уровень свободно циркулирующей мтДНК крови при экспериментальной ишемии миокарда не имеет положительной взаимосвязи с митохондриальной дисфункцией и процессами цитолиза, наблюдающимися в уже первые часы эксперимента. Одним из возможных объяснений полученных результатов является высвобождение из поврежденных кардиомиоцитов нуклеаз, разрушающих мтДНК и, таким образом, препятствующих возрастанию данного показателя [7]. Наблюдаемое повышение уровня мтДНК на 3-и сутки эксперимента до значений контрольной группы, по всей видимости, связано с возможным уменьшением выхода нуклеаз из поврежденных участков миокарда. При анализе данных, полученных на модели мелкоочаговой ишемии миокарда, нами сделано предположение, что повышение концентрации мтДНК плазмы на 3-и сутки связано с высвобождением мтДНК полиморфноядерными фагоцитами в составе так называемых «внеклеточных капканов» – extracellular traps [12] при активации процессов воспаления в поврежденном миокарде. Данный процесс может иметь место и в настоящем эксперименте. Безусловно, охарактеризованные временные интервалы крупноочаговой ишемии миокарда, индуцируемой перевязкой верхней трети левой нисходящей ветви коронарной артерии, не являются достаточными для получения объективной картины возможных изменений уровня мтДНК крови и оценки его диагностического потенциала. Это предопределяет необходимость исследований динамики данного показателя на более отдаленных сроках моделирования ишемии миокарда, что может способствовать развитию новых технологий мониторинга и прогнозирования острых повреждений миокарда.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект ФНМ-15-2012).

ЛИТЕРАТУРА

1. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М. и др. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 5. – С. 332–336.
2. Судаков Н.П., Новикова М.А., Никифоров С.Б. и др. Структурно-функциональные нарушения митохондрий печени при атеросклерозе в эксперименте // Известия ИГУ, серия «Биология. Экология». – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 15–19.
3. Судаков Н.П., Новикова М.А., Липко С.В. Ультра- и наноструктурные нарушения митохондрий клеток печени при экспериментальной дислипопроотеидемии // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 5. – С. 197–201.
4. Судаков Н.П., Попкова Т.П., Катыхев А.И. и др. Уровень свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови при дислипопроотеидемии и адреналиновом миокардите (экспериментальное исследование) // Известия ИГУ, серия «Биология. Экология». – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 136–142.
5. Chiu R.W., Chan L.Y., Lam N.Y. et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma // Clin. Chem. – 2003. – Vol. 49. – P. 719–726.
6. Ellinger J., Müller S.C., Wernert N. et al. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a

predictor of biochemical recurrence after prostatectomy // BJU Int. – 2008. – Vol. 102. – P. 628–632.

7. Fetisova T.V. Certain nitrogen-containing components of the heart, of the coronary-sinus blood and of the aorta in experimental myocardial infarct // Kardiologiya. – 1976. – Vol. 16, N 6. – P. 89–93.

8. Patrushev M., Kasymov V., Patrusheva V. et al. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments // Cell Mol. Life Sci. – 2004. – Vol. 61. – P. 3100–3103.

9. Ricci F., De Caterina R. Isolated creatine kinase-MB rise with normal cardiac troponins: a strange occurrence with difficult interpretation // J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown). – 2011. – Vol. 12. – P. 736–740.

10. Searle J., Danne O., Müller C. et al. Biomarkers in acute coronary syndrome and percutaneous coronary intervention // Minerva Cardioangiol. – 2011. – Vol. 59. – P. 203–223.

11. Sudakov N.P., Popkova N.P., Novikova M.A. et al. The level of blood plasma mitochondrial DNA upon acute myocardium damage in experiment // Biopolym. Cell. – 2012. – Vol. 28, N 4. – P. 321–324

12. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // Cell Death Differ. – 2009. – Vol. 16. – P. 1438–1444.

13. Zachariah R.R., Schmid S., Buerki N. et al. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors // Obstet. Gynecol. – 2008. – Vol. 112. – P. 843–850.

Сведения об авторах

Судаков Николай Петрович – кандидат биологических наук, доцент, научный сотрудник. ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: npsudakov@rambler.ru)

Попкова Татьяна Павловна – биолог лаборатории молекулярной диагностики центра лабораторных исследований ГУЗ «Иркутская областная ордена «Знак Почета» клиническая больница»

Катыхев Александр Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132)

Гольдберг Олег Аронович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Новикова Маргарита Анатольевна – младший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Никифоров Сергей Борисович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Пушкарев Борис Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Клименков Игорь Викторович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН Лимнологический институт СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел.: 8 (3952) 42-32-80)

Лепехова Светлана Александровна – доктор биологических наук, заведующая научным отделом экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Апарцин Константин Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Ежикеева Светлана Дмитриевна – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биохимии центра лабораторных исследований ГУЗ «Иркутская областная ордена «Знак Почета» клиническая больница»

Тен Мария Николаевна – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биохимии центра лабораторных исследований ГУЗ «Иркутская областная ордена «Знак Почета» клиническая больница»

Константинов Юрий Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетической инженерии растений ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН