

Н.П. Судаков^{1, 2, 3}, И.В. Клименков^{3, 4}, А.И. Катышев⁵, С.Б. Никифоров¹, О.А. Гольдберг¹,
Б.Г. Пушкарёв¹, С.А. Лепехова^{1, 2}, К.А. Апарцин^{1, 2}, Ю.М. Константинов^{3, 5}

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ИНФАРКТЕ МИОКАРДА: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

¹ ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия

² ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск, Россия

³ ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

⁴ ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

⁵ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

Изучены возможности лазерной конфокальной микроскопии в анализе объема липидных частиц и количества функционально-активных митохондрий и продукции активных форм кислорода в клетках печени для ранней диагностики цитохимических нарушений при дислипотеидемии. Оценен потенциал анализа уровня мтДНК плазмы крови на ранних сроках развития дислипотеидемии и при экспериментальном инфаркте миокарда. Полученные данные будут служить основой для создания технологий диагностического мониторинга выраженности атеросклероза и инфаркта миокарда.

Ключевые слова: дислипотеидемия, атеросклероз, инфаркт миокарда, митохондрии, активные формы кислорода, липидные частицы, митохондриальная ДНК, молекулярные паттерны риска

MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AT ATHEROSCLEROSIS AND MYOCARDIAL INFARCTION: MOLECULAR AND CYTOCHEMICAL CELL-MARKERS

N.P. Sudakov^{1, 2, 3}, I.V. Klimenkov^{3, 4}, A.I. Katyshev⁵, S.B. Nikiforov¹, O.A. Goldberg¹,
B.G. Pushkaryov¹, S.A. Lepekhova^{1, 2}, K.A. Apartsin^{1, 2}, Y.M. Konstantinov^{3, 5}

¹ Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia

² Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk, Russia

³ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

⁴ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

⁵ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

We studied capabilities of confocal laser scanning microscopy in the analysis of lipid droplets volume and of quantity of functional mitochondria and reactive oxygen species production in liver cells for early diagnosis of cytochemical disturbances at dyslipoproteinemia (16 days of experiment). The results showed the increase of lipid droplets volume in hepatocytes, decrease of functional mitochondria and increase of reactive oxygen species production. We evaluated the potential of real-time PCR method in the analysis of mitochondrial DNA of blood plasma at early stages of dyslipoproteinemia and in experimental infarction.

On the background of registered blood lipid metabolism disorders and structural and functional changes in liver cells, we determined the tendency to three-time increase in concentration of circulating cell-free mtDNA on the 16th day of dyslipoproteinemia as compared to the control data. We used a model of myocardial infarction to show statistically significant increase in the level of circulating cell-free blood mtDNA from 48 hours after adrenaline injection and we found that this level maintained up to 144 hours after adrenaline injection. Obtained data can serve as a basis for creation of technologies for diagnostic monitoring of atherosclerosis and myocardial infarction severity.

Key words: dyslipoproteinemia, atherosclerosis, myocardial infarction, mitochondria, reactive oxygen species, lipid droplets, mitochondrial DNA, danger associated molecular patterns

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день инфаркт миокарда (одно из осложнений дислипотеидемии и атеросклероза коронарных сосудов) является основной причиной смертности населения индустриально развитых стран. Совершенствование технологий диагностики данных заболеваний во многом предопределяет эффективность методов их профилактики и лечения [6]. Важным фактором развития дислипотеидемии является избыточное накопление в клетках печени липидных капель, способных повреждать органеллы, в первую очередь митохондрии [5]. Известна ключевая роль дисфункции митохондрий кардиомиоцитов в развитии повреждений миокарда после воздействия ишемии/реперфузии [2]. Тем не менее, в настоящее время не выявлены биомаркеры, связывающие состояние митохондрий и процессы гибели клетки

при инфаркте миокарда и атеросклерозе. Одним из перспективных показателей разрушения, стрессирования клеток и, возможно, состояния митохондрий является свободно циркулирующая митохондриальная ДНК (мтДНК) крови [1, 4, 7], которую относят к «молекулярным паттернам риска» (danger associated molecular patterns, DAMPs) [8]. Таким образом, высокую актуальность для разработки диагностических и лечебных технологий представляет изучение данных цитологических и молекулярных показателей на ранних сроках развития дислипотеидемии, а также в динамике острого ишемического повреждения миокарда, что явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дислипотеидемию вызывали атерогенной диетой (350 мг холестерина на 1 кг веса животного

ежедневно) в течение 16 суток у кроликов породы Шиншилла. Животные были подразделены на две группы (для каждой группы $n = 10$): «модель дислипидемии» и «группа контроля» (стандартная диета вивария).

Инфаркт миокарда моделировали у крыс-самцов линии Вистар подкожными инъекциями адреналина (0,2 мг на 100 г массы животного). Крыс, получивших инъекции адреналина, выводили из эксперимента с целью взятия крови через 24 ($n = 6$), 48 ($n = 6$), 72 ($n = 6$), 120 ($n = 6$) и 144 часа ($n = 6$) наблюдения. Крысам группы контроля ($n = 6$) подкожно вводили физиологический раствор.

Манипуляции с животными проводились с соблюдением положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) и Директивы Европейского сообщества 86/609 ЕЕС о гуманном отношении к экспериментальным животным (1986 г.).

На биохимическом анализаторе Beckman Synhron 4 (Beckman Coulter, США) оценивали активность в сыворотке крови ферментов-биомаркеров цитолиза: общей креатинфосфокиназы (КФК), креатинфосфокиназы МВ (КФК-МВ), – и анализировали липидный спектр с использованием наборов реагентов «Human Diagnostics GmbH» (Германия). Митохондриальную ДНК выделяли из плазмы крови, очищенной от тромбоцитов [3]. Количественный анализ свободно циркулирующей мтДНК осуществляли методом ПЦР в реальном времени (амплификатор «DT lite», ДНК-технология, Россия) с использованием реакционной смеси, содержащей SYBR Green (Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix – Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплифицировали фрагмент гена 16S рРНК размером 230 п.н. (крысы – прямой праймер: 5'-TGCAGAAGCTATTAATGGTTCG-3', обратный праймер: 5'-TTGGCTCTGCCACCTAATA-3'; кролики – прямой праймер: 5'-GTGTAGCCGCTATTAAAGGTTTCG-3', обратный праймер: 5'-GGCTCTGCCACCTTAAGTAGCT-3') [4]. Фрагменты ткани печени фиксировали в 2%-м параформальдегиде. Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США), липидные капли – Nile red (Sigma-Aldrich, USA), функционально активные митохондрии – Mitotracker orange (Life Technologies, USA), активные формы кислорода (АФК) – CellRox Deep red reagent (Life Technologies, USA). Состояние липидных частиц и митохондрий в клетках печени оценивали с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрический анализ полученных данных проводили в программной среде Imaris Bitplane 7.2.3. Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 10, используя непараметрические методы. Межгрупповые различия оценивали по критериям Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при моделировании дислипидемии на 16-е сутки в крови экспериментальных животных коэффициент атерогенности увеличивается, в сравнении с контролем, в 6 раз ($p \leq 0,05$). Это отражает ослабление способности печени сдерживать

развитие нарушений обмена липидов крови. Анализ ткани печени с помощью лазерной конфокальной микроскопии показал, что на 16-е сутки атерогенной диеты в гепатоцитах общего объема липидных капель, в сравнении с контролем, возрастает в 3 раза ($p \leq 0,05$). При этом количество функционально активных митохондрий в клетках печени снижается в 2 раза ($p \leq 0,05$), а степень продукции активных форм кислорода возрастает в 1,5 раза ($p \leq 0,05$). Интересно отметить, что на фоне зарегистрированных нарушений метаболизма липидов крови и структурно-функциональных изменений в клетках печени наблюдается тенденция к трехкратному, в сравнении с контролем, возрастанию концентрации свободно циркулирующей мтДНК в крови ($p = 0,6$). Это характеризует перспективу данного показателя в качестве одного из ранних биомаркеров развития нарушений в клетках-мишенях при дислипидемии и атеросклерозе.

На модели инфаркта миокарда показано, что через 24 часа после введения адреналина в крови у экспериментальных животных возрастает активность КФК и КФК-МВ. Это объективно свидетельствует о развитии литических процессов в кардиомиоцитах на данном сроке наблюдения. При этом уровень свободно циркулирующей мтДНК крови возрастает в 1,5 раза, в сравнении с контролем. Через 48 часов активность КФК, КФК-МВ проявляет тенденцию к снижению, оставаясь, тем не менее, выше значений контроля. Уровень свободно циркулирующей мтДНК в крови возрастает в 2 раза, что является наибольшим значением в динамике данного показателя. Через 72 часа после введения адреналина активность креатинфосфокиназ снижается до показателей контроля. На фоне описанных выше изменений уровень свободной мтДНК плазмы на данном сроке наблюдения увеличен в 1,5 раза, в сравнении с группой контроля. В целом повышенный уровень свободно циркулирующей мтДНК крови сохраняется до 144 часов и возвращается к данным контрольной группы к 168 часам после инъекции адреналина. Таким образом, пик возрастания уровня свободно циркулирующей мтДНК крови после подкожных инъекций адреналина формируется на сутки позднее увеличения активности проанализированных нами кардиомаркеров. Наибольшее значение концентрации мтДНК крови достигается уже на фоне снижения активности данных ферментов.

Таким образом, полученные нами данные характеризуют высокий диагностический потенциал цитохимического анализа объема липидных частиц и количества функционально активных митохондрий, определяемых методом сканирования образцов ткани на лазерном конфокальном микроскопе для исследований биоптата печени с целью ранней диагностики внутриклеточных нарушений при формировании липидной инфильтрации данного органа. Высокий интерес представляет использование данных методических подходов для изучения механизмов обратимости ранних этапов развития жировой инфильтрации печени при дислипидемии, что будет способствовать созданию технологий ле-

чения для профилактики и лечения атеросклероза на начальных сроках его развития. Данные анализа уровня свободно циркулирующей мтДНК на ранних сроках развития дислипотеидемии и при экспериментальном инфаркте миокарда определяют необходимость изучения взаимосвязи динамики данного показателя с тяжестью течения заболевания и эффективностью его лечения. Полученные результаты будут в дальнейшем служить основой трансляционных исследований, направленных на создание технологий диагностического мониторинга дислипотеидемии, атеросклероза и острых ишемических повреждений миокарда.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Судаков Н.П., Попкова Т.П., Катыхев А.И., Гольдберг О.А., Новикова М.А., Ежикеева С.Д., Тен М.Н., Никифоров С.Б., Пушкарев Б.Г., Клименков И.В., Лепехова С.А., Константинов Ю.М. Уровень свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови при дислипотеидемии и адреналиновом миокардите (экспериментальное исследование) // Известия Иркутского Государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 136–142.

Sudakov NP, Popkova TP, Katyshev AI, Goldberg OA, Novikova MA, Ezhikeyeva SD, Ten MN, Nikiforov SB, Pushkaryov BG, Klimenkov IV, Lepekhova SA, Konstantinov YM (2011). Level of free-cell blood mitochondrial DNA in dyslipoproteinemia and adrenaline-caused myocarditis (experimental study) [Uroven' svobodno tsirkuliruyushchey mitokhondrial'noy DNK krovi pri dislipoproteidemii i adrenalinovom miokardite (eksperimental'noe issledovanie)]. Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Biologiya. Ekologiya", 4 (4), 136-142.

2. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М., Якубов Л.А., Новикова Н.А., Карамышева А.Н. Механизмы участия митохондрий в развитии пато-

логических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 5. – С. 332–336.

Sudakov NP, Nikiforov SB, Konstantinov YM, Yakubov LA, Novikova NA, Karamysheva AN (2006). Mechanisms of mitochondria participation in pathological processes associated with ischemia and reperfusion [Mekhanizmy uchastiya mitokhondriy v razvitii patologicheskikh protsessov, soprovozhdayushchikhsya ishemiey i reperfuziey], Bulletin' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra, (5), 332-336.

3. Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, Lo YM (2003). Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin. Chem.*, (49), 719-726.

4. Ellinger J, Müller SC, Wernert N, von Ruecker A, Bastian PJ (2008). Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy. *BJU Int.*, (102), 628-632.

5. Herms A, Bosch M, Ariotti N, Reddy BJ, Fajardo A, Fernández-Vidal A, Alvarez-Guaita A, Fernández-Rojo MA, Rentero C, Tebar F, Enrich C, Geli MI, Parton RG, Gross SP, Pol A (2013). Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr. Biol.*, (23), 1489-1496.

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

7. Sudakov NP, Popkova TP, Novikova MA, Katyshev AI, Nikiforov SB, Pushkarev BG, Goldberg AO, Klimenkov IV, Lepekhova SA, Ezhikeyeva SD, Ten MN, Osipov VG, Konstantinov YM (2012). The level of blood plasma mitochondrial DNA upon acute myocardium damage in experiment. *Biopolymers and Cell*, 28 (4), 321-324.

8. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, (464), 104-107.

Сведения об авторах Information about the authors

Судаков Николай Петрович – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», старший научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБНУ Иркутский научный центр СО РАМН, доцент ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-39; e-mail: npsudakov@rambler.ru)

Sudakov Nikolay Petrovich – Candidate of Biological Sciences, Docent, Senior Research Officer of the Scientific Department of Experimental Medicine with Vivarium of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Senior Research Officer of the Department of Biomedical Researches and Technologies of Irkutsk Scientific Center SB RAS, Associate Professor of Irkutsk State University (664003, Irkutsk, Bortsov Revolutsii str., 1; tel.: +7 (3952) 29-03-39; e-mail: npsudakov@rambler.ru)

Клименков Игорь Викторович – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник отдела ультраструктуры клетки ФГБНУ Лимнологический институт СО РАМН, доцент ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; e-mail: iklimen@mail.ru)

Klimenkov Igor Viktorovich – Candidate of Biological Sciences, Docent, Senior Research Officer of the Department of Cell Ultrastructure of Limnological Institute SB RAS, Associate Professor of Irkutsk State University (664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3; e-mail: iklimen@mail.ru)

Катыхев Александр Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАМН (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132; тел.: 8 (3952) 42-67-21)

Katyshev Aleksandr Ivanovich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Genetic Engineering of Plants of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (664033, Irkutsk, Lermontov str., 132; tel.: +7 (3952) 42-67-21)

Никифоров Сергей Борисович – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (e-mail: telomer@mail.ru)

Nikiforov Sergey Borisovich – Doctor of Medical Sciences, Leading Research Officer of the Scientific Department of Experimental Medicine with Vivarium of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (e-mail: telomer@mail.ru)

Гольдберг Олег Аронович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии тканей и функциональной морфологии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Goldberg Oleg Aronovich – Candidate of Medical Sciences, Leading Research Officer of the Laboratory of Tissue Pathophysiology and Functional Morphology of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology

Пушкарев Борис Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Pushkaryov Boris Georgievich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Senior Research Officer of the Scientific Department of Experimental Medicine with Vivarium of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology

Лепехова Светлана Александровна – доктор биологических наук, заведующая научным отделом экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБНУ Иркутский научный центр СО РАН (e-mail: lepekhova_sa@mail.ru)

Lepekhova Svetlana Aleksandrovna – Doctor of Biological Sciences, Head of the Scientific Department of Experimental Medicine with Vivarium of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Chief Research Officer of the Department of Biomedical Researches and Technologies of Irkutsk Scientific Center SB RAS (e-mail: lepekhova_sa@mail.ru)

Апарцин Константин Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории реконструктивной хирургии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», заведующий отделом медико-биологических исследований и технологий ФГБНУ Иркутский научный центр СО РАН (e-mail: dr.apartsin@yahoo.com)

Apartsin Konstantin Anatolyevich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Research Officer of the Laboratory of Reconstructive Surgery of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Head of the Department of Biomedical Researches and Technologies of Irkutsk Scientific Center SB RAS (e-mail: dr.apartsin@yahoo.com)

Константинов Юрий Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетической инженерии растений ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, профессор ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет (e-mail: yukon@sifibr.irk.ru)

Konstantinov Yuri Mikhaylovich – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Genetic Engineering of Plants of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Professor of Irkutsk State University (e-mail: yukon@sifibr.irk.ru)