



УДК 57.086.83+616-089.843]:616.153.922+616-005.1-08-092.4

Уровень свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови при дислиппротеидемии и адреналиновом миокардите (экспериментальное исследование)

Н. П. Судаков^{1,3,4}, Т. П. Попкова³, А. И. Катышев², О. А. Гольдберг¹,
М. А. Новикова¹, С. Д. Ежикеева³, М. Н. Тен³, С. Б. Никифоров¹,
Б. Г. Пушкарев¹, И. В. Клименков^{4,5}, С. А. Лепехова¹, Ю. М. Константинов^{2,4}

¹Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН, Иркутск

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

³Иркутская областная клиническая больница, Иркутск

⁴Иркутский государственный университет, Иркутск

⁵Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

E-mail: npsudakov@rambler.ru

Аннотация. Изучался уровень свободно циркулирующей мтДНК плазмы крови при дислиппротеидемии и адреналиновом миокардите у экспериментальных животных. При дислиппротеидемии (135 сут.) на фоне возрастания коэффициента атерогенности и активности аланинаминотрансферазы различия в уровне мтДНК у животных контрольной и экспериментальной групп не наблюдались. У животных с адреналиновым миокардитом, характеризуемым возрастанием активности маркеров повреждения кардиомиоцитов и развитием очагов воспаления в миокарде, регистрировали 4-кратное повышение уровня мтДНК. Оценка установленного эффекта перспективна при создании технологии диагностики и прогнозирования инфаркта миокарда.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, адреналиновый миокардит, атеросклероз, дислиппротеидемия.

Введение

Эффективность профилактики и терапии сердечно-сосудистых заболеваний во многом предопределяется развитием технологий их ранней диагностики, что позволяет сделать лечение более специализированным и персонализированным [4]. Сегодня известен спектр внутриклеточных ферментов, повышение активности которых в сыворотке крови свидетельствует об активации процессов цитолиза в тканях. Данные биомаркеры обладают различной степенью кардиоспецифичности и индивидуальной динамикой, тем не менее, их использование в клинической лабораторной диагностике показателей не всегда позволяет принять однозначное решение при оценке состояния пациента и выборе тактики лечения [8]. Таким образом, поиск и патогенетическое обоснование новых биомаркеров внутриклеточных нарушений миокарда имеет высокую степень актуальности [4]. Перспективным неспецифическим маркером цитолитических процессов является уровень и фракционный состав митохондриальной ДНК (мтДНК) плазмы крови. Показано, что уровень свободной и клеточной

мтДНК крови при различных патологических процессах (злокачественные опухоли, бактериальный менингит) является критерием прогноза развития осложнений и смертности [5; 6; 9]. Данные о динамике этого показателя в отечественной и зарубежной научной литературе отсутствуют. Несмотря на отсутствие тканеспецифичности, научный и практический интерес представляет возможность использования данного показателя в комплексе с кардиоспецифичными биомаркерами цитолиза в диагностике и прогнозе течения острых и хронических сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение уровня мтДНК плазмы крови как возможного маркера повреждений кардиомиоцитов при экспериментальной дислиппротеидемии и адреналиновом миокардите.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных животных использовали крыс линии «Вистар», изучались следующие группы: контроль (n = 6, подкожное введение физиологического раствора), экспериментальный миокардит (n = 6, подкожное

введение 0,2 мг адреналинхлорида на 100 г массы животного), экспериментальная дислипотеидемия ($n = 6$, 1 г холестерина и 0,2 г метилтиоурацила на 1 кг веса животного) [1; 2].

Стабилизированную цитратом натрия кровь экспериментальных животных использовали для получения плазмы, свободной от тромбоцитов [9]. Из плазмы крови выделяли ДНК с помощью набора реагентов «ДНК-проба» (ДНК-технология, Россия). Количественный анализ мтДНК осуществляли методом *real-time PCR*, используя амплификаторы *iCycler IQ4* (Bio-Rad, США) и *DTlite* (ДНК-технология, Россия). Амплифицировали фрагмент 16S рРНК (прямой праймер: 5'-TGCAGAAGСТАТТААТGGTTCG-3', обратный - 5'-TTGGCTCTGCCACCСТААТА-3') [6]. Для проведения *real-time PCR* использовали реакционную смесь, содержащую SYBR Green (Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix – Fermentas, Латвия). Все манипуляции с экспериментальными животными осуществлялись согласно правилам проведения экспериментальных работ (приказ Министерства здравоохранения СССР №755 от 12.08.1977 г.). Результаты исследований анализировали методами непараметрической статистики: рассчитывали медиану, квартильный размах, уровень межгрупповых различий оценивали с помощью критериев Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Показано, что на 135-е сутки развития дислипотеидемии в крови экспериментальных животных сформировались нарушения баланса липопротеинов, объективно характеризуемые 13,6-кратным увеличением коэффициента атерогенности в сравнении с группой контроля, $p < 0,05$ (рис. 1). Показано статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение активности аланинаминотрансферазы крови, свидетельствующее об активизации цитолитических процессов в печени животных с экспериментальной дислипотеидемией. В печени и миокарде при дислипотеидемии наблюдается развитие липидной инфильтрации. На фоне структурно-функциональных нарушений печени показано формирование в митохондриях данного органа дегенеративных изменений, характеризующихся набуханием, деструкцией, сжатием и вакуолизацией митохондрий. С использованием метода атомно-силовой микроскопии показано развитие структурных изменений поверхности мембран митохондрий [3]. Несмотря на выражен-

ные структурно-функциональные нарушения печени, уровень мтДНК плазмы крови на данном сроке экспериментальной дислипотеидемии практически не отличался от данных контроля.

Через 4 ч после введения адреналина в крови экспериментальных животных статистически значимо возростала активность ферментов – биомаркеров цитолиза: креатинфосфокиназы-МВ, аспаратаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, что свидетельствовало о развитии повреждений кардиомиоцитов (рис. 2). На 3-и сутки эксперимента миокард животных, получавших инъекции адреналина, характеризовался инфильтрацией макрофагов, наличием множественных очагов лизиса мышечных волокон. На 3-и сутки наблюдения уровень свободной мтДНК плазмы экспериментальных животных составил $1,26 \times 10^7$ копий/мл, что в 4 раза выше контроля ($3,04 \times 10^6$ копий/мл), $p = 0,16$. Полученные данные свидетельствуют, что при адреналиновом миокардите в миокарде возрастает активность процессов, способствующих выходу мтДНК в плазму крови.

Полученные данные свидетельствуют, что, несмотря на выраженные структурно-функциональные изменения печени и увеличение активности аланинаминотрансферазы, при экспериментальной дислипотеидемии не происходит возрастания активности процессов высвобождения мтДНК в кровь экспериментальных животных. Увеличение уровня свободно циркулирующей мтДНК крови наблюдается при повреждении миокарда после инъекции адреналина. Таким образом, повышение концентрации мтДНК плазмы крови в характерно для острых повреждений тканей. Потенциальным механизмом данного процесса может быть как высвобождение мтДНК из клеток с нарушенной целостностью мембран, так и активный выброс мтДНК клетками, под воздействием стрессовых условий [7]. Не исключена возможность высвобождения мтДНК полиморфноядерными фагоцитами в составе так называемых «внеклеточных капканов» – *extracellular traps* при активации процессов воспаления в поврежденном миокарде [10]. Отсутствие возрастания уровня мтДНК при дислипотеидемии, несмотря на повышение маркеров повреждения ткани печени, даёт возможность мониторинга острых повреждений миокарда на фоне сформированной дислипотеидемии.

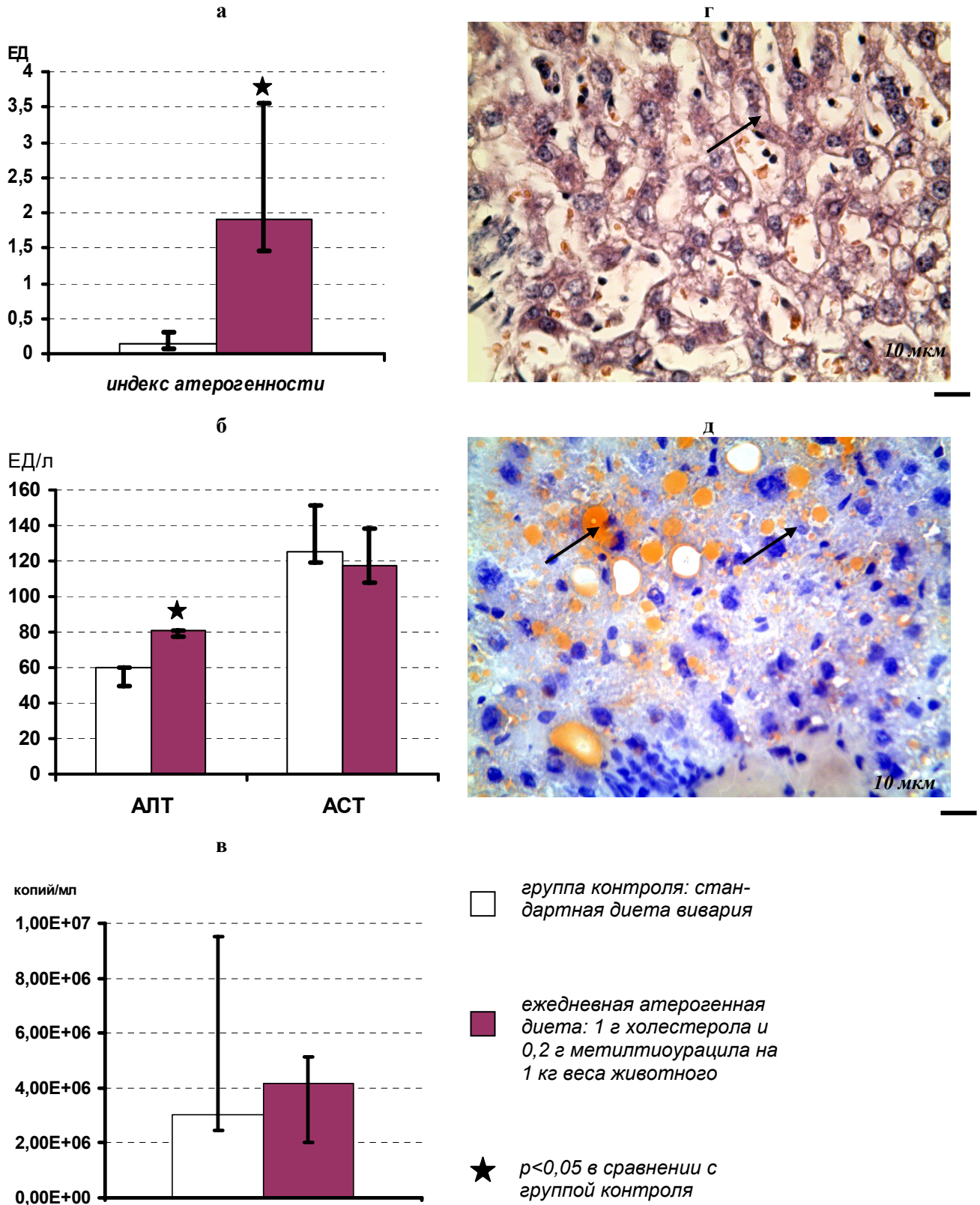


Рис. 1. Изменения уровня мтДНК при экспериментальной дислиппротеидемии (135 сут). а) индекс атерогенности; б) активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) крови; в) уровень свободно циркулирующей мтДНК крови; г) вакуолизация гепатоцитов, окраска гематоксилин-эозином; д) развитие липидной инфильтрации клеток печени, окраска суданом III

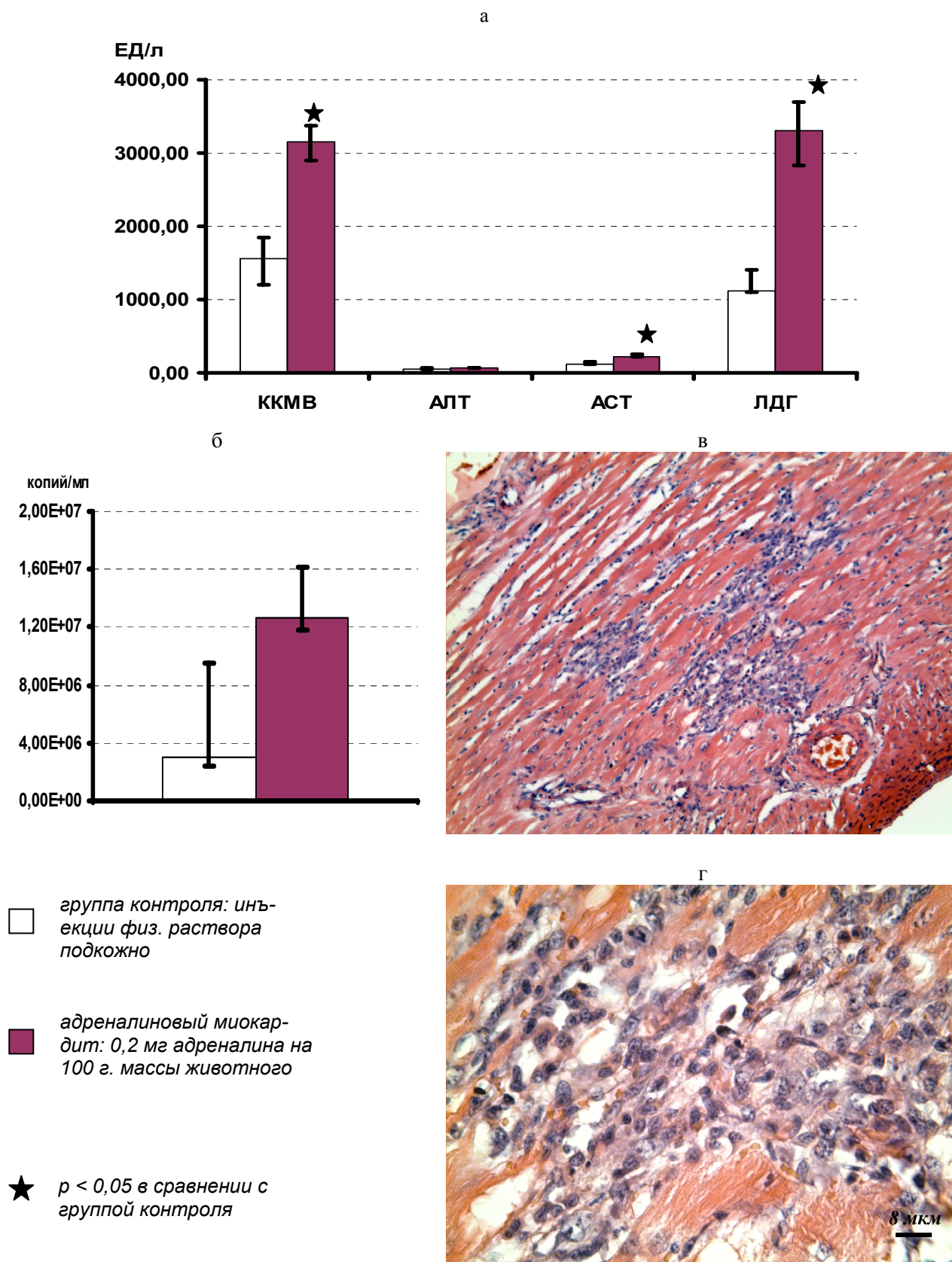


Рис. 2. Изменения уровня мтДНК при адреналиновом миокардите. а) активность креатинкиназы-МВ (ККМВ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) крови (4 ч); б) уровень свободно циркулирующей мтДНК крови (3 сут); в) развитие очагов воспаления в миокарде (3 сут), окраска гематоксилин-эозином; г) деструкция мышечных волокон и инфильтрация макрофагами миокарда (3 сут), окраска гематоксилин-эозином

Это определяет перспективу детальных исследований динамики данного показателя при адреналиновом повреждении миокарда, что в дальнейшем будет способствовать развитию новых технологий диагностики и прогнозирования острых повреждений миокарда.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект ФНМ-16).

Литература

1. Анестиади В. Х. Морфогенез атеросклероза / В. Х. Анестиади, В. А. Нагорнев. – Кишинев, 1982. – 323 с.
2. Непомнящих Л. М. Альтернативная недостаточность мышечных клеток сердца при метаболических и ишемических повреждениях / Л. М. Непомнящих. – М., 1998. – 56 с.
3. Структурно-функциональные нарушения митохондрий печени при атеросклерозе в эксперименте / Н. П. Судаков [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 15–19.
4. Biomarkers in acute coronary syndrome and percutaneous coronary intervention / J. Searle [et al.] // *Minerva Cardioangiol.* – 2011. – Vol. 59. – P. 203–223.
5. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors / R. R. Zachariah [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 112. – P. 843–850.
6. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy / J. Ellinger [et al.] // *BJU Int.* – 2008. – Vol. 102. – P. 628–632.
7. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments / M. Patrushev [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61. – P. 3100–3103.
8. Ricci F. Isolated creatine kinase-MB rise with normal cardiac troponins: a strange occurrence with difficult interpretation / F. Ricci, R. De Caterina // *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown).* – 2011. – Vol. 12. – P. 736–740.
9. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma / R.W. Chiu [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – P. 719–726.
10. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps / S. Yousefi [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16. – P. 1438–1444.

Level of free mtDNA circulating in blood under dislipoproteinaemia and adrenaline myocarditis (experimental study)

N. P. Sudakov^{1,3,4}, T. P. Popkova³, A. I. Katishev², O. A. Gol'dberg¹, M. A. Novikova¹, S. D. Ezhikeeva³, M. N. Ten³, S. B. Nikiforov¹, B. G. Pushkarev¹, I. V. Klimenkov^{4,5}, S. A. Lepekhova¹, Yu. M. Konstantinov^{2,4}.

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

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

³ Irkutsk Regional Hospital, Irkutsk

⁴ Irkutsk State University, Irkutsk

⁵ Limnological Institute, SB RAS, Irkutsk

Abstract. The aim of the study is to investigate the level of free circulating plasma mtDNA under experimental dislipoproteinaemia and adrenaline myocarditis. It was shown that under experimental dislipoproteinaemia (135 days) upon an increase in atherogenic coefficient and alanine aminotransferase, no difference was observed in the level of mtDNA between the control and experimental groups. In the animals having suffered adrenaline myocarditis characterized by an increase in the activity of cardiomyocyte damage biomarkers and the formation of inflammation in myocardium, a four-fold increase was recorded in the level of mtDNA as compared with the controls. Therefore, a rise in the level of plasma mtDNA is typical for acute cell damage that opens prospects of using the parameter in the development of diagnostic techniques and myocardium infarct prediction.

Keywords: mitochondrial DNA, adrenaline myocarditis, atherosclerosis, dislipoproteinaemia

Судаков Николай Петрович
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1.
кандидат биологических наук
научный сотрудник отделения экспериментальной
хирургии с виварием
E-mail: npsudakov@rambler.ru

Sudakov Nikolay Petrovich
Scientific Center of reconstructive and restorative
surgery of Eastern-Siberian Department of SB RAMS
1 Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
Ph. D. in Biology, research scientist,
Branch of Experimental Surgery
E-mail: npsudakov@rambler.ru

Попкова Татьяна Павловна
 ГУЗ Иркутская ордена «Знак Почета» областная
 клиническая больница.
 664079, Иркутск, м-н Юбилейный, 100.
 биолог лаборатории молекулярной диагностики
 центра лабораторных исследований

Popkova Tat'yana Pavlovna
 Regional Clinical Hospital
 100, Yubileiny, Irkutsk, 664079
 Biologist at the Laboratory of Molecular Diagnostics,
 Center for Laboratory Research

Катышев Александр Иванович
 Сибирский институт физиологии и биохимии рас-
 тений СО РАН.
 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132.
 кандидат биологических наук
 старший научный сотрудник лаборатории
 генетической инженерии растений

Katishev Aleksandr Ivanovich
 Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
 SB RAS
 132 Lermontova St., Irkutsk, 664033
 Ph. D. in Biology, senior research scientist, Laboratory
 of Plant Genetic Engineering

Гольдберг Олег Аронович
 Научный центр Реконструктивной и восстано-
 вительной хирургии СО РАМН.
 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
 кандидат медицинских наук, старший научный
 сотрудник отдела патоморфологии

Gol'dberg Oleg Aronovich
 Research Center for Reconstructive and Restorative
 Surgery SB, RAMS
 1 Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
 Ph.D. of Medicine, senior research scientist,
 Department of Pathomorphology

Новикова Маргарита Анатольевна
 Научный центр Реконструктивной
 и восстановительной хирургии СО РАМН.
 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
 младший научный сотрудник лаборатории биохимии

Novikova Margarita Anatol'evna
 Research Center for Reconstructive and Restorative
 Surgery SB, RAMS
 1 Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
 junior research scientist, Laboratory of Biochemistry

Ежикеева Светлана Дмитриевна
 ГУЗ Иркутская ордена «Знак Почета» областная
 клиническая больница.
 664079, Иркутск, м-н Юбилейный, 100
 врач КДЛ лаборатории биохимии центра
 лабораторных исследований

Ezhikeeva Svetlana Dmitrievna
 Regional Clinical Hospital
 100 Yubileinii, Irkutsk, 664079
 doctor, Laboratory of Biochemistry, Center for
 Laboratory Research

Тен Мария Николаевна
 ГУЗ Иркутская ордена «Знак Почета» областная
 клиническая больница.
 664079, Иркутск, м-н Юбилейный, 100
 врач КДЛ лаборатории биохимии центра лабора-
 торных исследований

Ten Mariya Nikolaevna
 Regional Clinical Hospital
 100 Yubileiny, Irkutsk, 664079
 doctor, Laboratory of Biochemistry, Center for
 Laboratory Research

Никифоров Сергей Борисович
 Научный центр Реконструктивной и восстано-
 вительной хирургии СО РАМН.
 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
 доктор медицинских наук,
 старший научный сотрудник отдела
 экспериментальной хирургии с виварием
 E-mail: telomer@mail.ru

Nikiforov Sergei Borisovich
 Research Center for Reconstructive and Restorative
 Surgery SB RAMS
 1 Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
 D.Sc. in Medicine, senior research scientist,
 Experimental Surgery Department with Vivarium
 E-mail: telomer@mail.ru

Пушкарев Борис Георгиевич
 Научный центр Реконструктивной и восстано-
 вительной хирургии СО РАМН.
 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
 доктор медицинских наук,
 старший научный сотрудник отдела эксперимен-
 тальной хирургии с виварием

Pushkarev Boris Georgievich
 Research Center for Reconstructive and Restorative
 Surgery SB RAMS
 1 Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
 D.Sc. in Medicine, senior research scientist, prof.,
 Experimental Surgery Department with Vivarium

Клименков Игорь Викторович
Лимнологический институт СО РАН.
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел.: (3952)42-32-80, факс (3952)42-54-05
E-mail: iklimen@mail.ru

Лепехова Светлана Александровна
Научный центр Реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН.
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
доктор биологических наук,
зав. отделом экспериментальной хирургии с вивари-
ем
Константинов Юрий Михайлович
Сибирский институт физиологии и биохимии рас-
тений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132 доктор био-
логических наук, профессор, зав.
лабораторией генетической инженерии растений
тел. (3952)42-49-03; факс: (3952)51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Klimenkov Igor' Victorovich
Limnological Institute, SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutk, 664003.
Ph. D. in Biology, senior research scientist

phone: (3952)42-32-80, факс (3952)42-54-05
E-mail: iklimen@mail.ru

Lepekhova Svetlana Eleksandrovna
Research Center for Reconstructive and Restorative
Surgery SB RAMS
1 Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
D.Sc. of Biology, Head of the Experimental Surgery
Department with Vivarium

Konstantinov Yuri Mikhailovich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D.Sc. in Biology, Prof., Head of Laboratory
of Plant Genetic Engineering

phone: (3952)42-49-03, fax: (3952)51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru