



УДК 616.127-089:612.13

Изменения уровня свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови при перевязке левой коронарной артерии сердца в эксперименте

Н. П. Судаков^{1,3,5}, Т. П. Попкова³, А. И. Катышев², О. А. Гольдберг¹,
Б. Г. Пушкарев¹, С. Б. Никифоров¹, И. В. Клименков^{4,5},
С. А. Лепехова^{1,6}, К. А. Апарцин^{1,6}, Ю. М. Константинов^{2,5}

¹Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, Иркутск

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

³Областная клиническая больница, Иркутск

⁴Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

⁵Иркутский государственный университет, Иркутск

⁶Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск

E-mail: npsudakov@rambler.ru

Аннотация. Изучена динамика уровня свободно циркулирующей мтДНК крови после перевязки левой коронарной артерии в эксперименте. Установлено снижение данного показателя через 24 ч после наложения лигатуры. Через 48 и 72 ч уровень свободно-циркулирующей мтДНК крови увеличился до значений контроля. В целом зарегистрированные в эксперименте изменения данного показателя при острой ишемии миокарда заслуживают изучения лежащих в их основе механизмов, что позволит определить его диагностический потенциал.

Ключевые слова: ишемия миокарда, уровень мтДНК, биомаркеры цитолиза кардиомиоцитов, ПЩР в реальном времени.

Введение

Существующий на сегодняшний день набор маркеров повреждения сердечной мышцы не всегда бывает достаточным для выбора тактики лечения инфаркта миокарда. Это определяет актуальность поиска новых биомаркеров повреждений кардиомиоцитов [2; 7]. Перспективным маркером цитолитических процессов является уровень свободно циркулирующей митохондриальной ДНК (мтДНК) крови, используемый для прогноза развития осложнений и смертности при злокачественных опухолях и септических процессах [4–6; 8]. Ранее нами показано возрастание свободно циркулирующей мтДНК крови у крыс на 3-и сутки экспериментальной мелкоочаговой острой ишемии миокарда, индуцируемой подкожными инъекциями адреналина [9]. Целью настоящей работы явилось изучение динамики уровня свободно циркулирующей мтДНК крови при экспериментальной крупноочаго-

вой острой ишемии миокарда, моделируемой перевязкой проксимальной трети левой нисходящей ветви коронарной артерии.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных животных использовали самцов кроликов породы «шиншилла». Животные были подразделены на две группы: № 1 «контроль» ($n = 6$, ложная операция: вскрытие грудной клетки без перевязки коронарной артерии), № 2 «экспериментальная острая ишемия миокарда» ($n = 6$, перевязка верхней трети левой коронарной артерии).

Для проведения операции использовали следующее анестезиологическое пособие: *Sol. Atropine sulfate* 0,1 % – 0,05 ml; *Sol. Droperidoli* 0,25 % – 0,2 ml; *Sol. Analgini* 50 % – 0,5 ml; *Sol. Dimedroli* 1 % – 0,2 ml. Доступ к левой коронарной артерии осуществляли с помощью срединной торакотомии.

На биохимическом анализаторе Beckman Synhron CX4 PRO (Beckman Coulter, США) оценивали активность ферментов-биомаркеров цитолиза в сыворотке крови: общей креатинфосфокиназы (КФК), креатинфосфокиназы МВ (КФК-МВ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспаратаминотрансферазы (АСТ). Количественный анализ мтДНК плазмы крови, свободной от тромбоцитов, осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием реакционной смеси, содержащей SYBR Green (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, США). Амплифицировали фрагмент гена 16S рРНК (прямой праймер: 5'-GTGTAGCCGCTATTAAAGGTTTCG-3'; обратный праймер: 5'-GGCTCTGCCACSTTAACTAGCT-3') [5].

Морфологические изменения миокарда оценивали световой микроскопией гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Все манипуляции с экспериментальными животными осуществлялись согласно правилам проведения работ с использованием животных в эксперименте (Минздрав СССР, приказ от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и «Правилами проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» (утверждены Минздравом РФ и введены в действие с 01.01.1999). Межгрупповые различия оценивали критерием Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

Установлено, что через 24 ч после лигирования коронарной артерии в крови на фоне повышенной активности маркеров цитолиза наблюдалось 6-кратное снижение уровня свободно циркулирующей мтДНК плазмы (рис.). Нельзя исключить, что снижение содержания мтДНК обусловлено гидролитическим действием нуклеаз, высвобождаемых в этих условиях из поврежденных кардиомиоцитов [3]. В период от 48 до 72 ч экспериментальной ишемии миокарда активность КФК, ЛДГ и АСТ постепенно снижалась до значений, соответствующих контролю. В то же время величина активности КФК-МВ в эти сроки оставалась высокой в сравнении с контролем. Че-

рез 72 ч после лигирования левой ветви коронарной артерии в миокарде животных регистрировали очаги некроза мышечных волокон с перифокальными зонами воспаления. Определялись дегенеративные изменения кардиомиоцитов с характерной утратой поперечной исчерченности и потерей саркоплазмы. На фоне наблюдаемых структурно-функциональных нарушений в миокарде содержание свободно циркулирующей мтДНК в крови через 48 и 72 ч после перевязки левой коронарной артерии повышалось до уровня контроля. Это согласуется с ранее полученными нами результатами на индуцируемой адреналином модели мелкоочаговой ишемии миокарда у крыс, за исключением отсутствия возрастания данного показателя в сравнении с контролем через 72 ч эксперимента [1; 9].

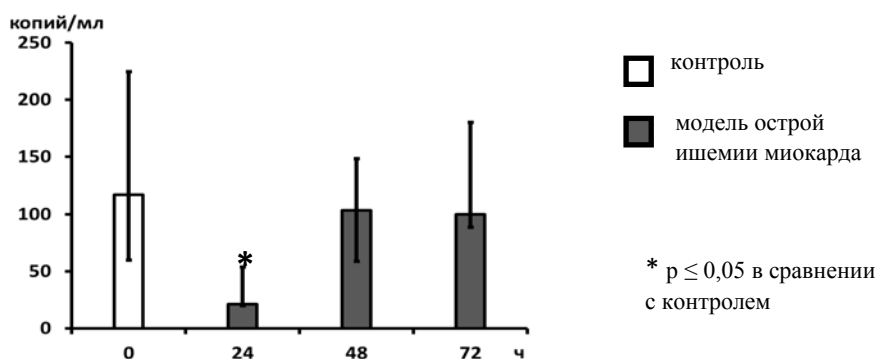


Рис. Динамика уровня свободно циркулирующей мтДНК при экспериментальной крупноочаговой ишемии миокарда у лабораторных животных

Заключение

Зарегистрированный в эксперименте феномен снижения уровня мтДНК через 24 ч моделирования острой ишемии миокарда заслуживает изучения лежащих в его основе механизмов, что позволит определить его диагностический потенциал. В настоящее время нами проводятся более детальные исследования динамики мтДНК крови при моделировании острой ишемии миокарда, что необходимо с точки зрения оценки информативности применения данного молекулярно-биологического параметра при диагностике и прогнозировании течения острых ишемических повреждений миокарда.

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

Список литературы

1. Уровень свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови при дислипотеидемии и адреналиновом миокардите (экспериментальное исследование) / Н. П. Судаков [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 136–142.

2. Biomarkers in acute coronary syndrome and percutaneous coronary intervention / J. Searle [et al.] // *Minerva Cardioangiol.* – 2011. – Vol. 59. – P. 203–223.
3. Fetisova T. V. Certain nitrogen-containing components of the heart, of the coronary-sinus blood and of the aorta in experimental myocardial infarct / T. V. Fetisova // *Kardiologiya.* – 1976. – Vol. 16, N 6. – P. 89–93.
4. 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.
5. 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.
6. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments / M. Patrushev [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61. – P. 3100–3103.
7. 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.
8. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. / R. W. Chiu [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – P. 719–726.
9. The level of blood plasma mitochondrial DNA upon acute myocardium damage in experiment / N. P. Sudakov [et al.] // *Biopolymers and Cell.* – 2012. – Vol. 28, N 4. – P. 321–324.

Changes in Free Circulating Mitochondrial DNA Levels in Blood after the Left Coronary Artery in Experiment

N. P. Sudakov^{1,3,5}, T. P. Popkova³, A. I. Katyshev², O. A. Goldberg¹, B. G. Pushkarev¹, S. B. Nikiforov¹, I. V. Klimenkov^{4,5}, S. A. Lepekhova^{1,6}, K. A. Apartsin^{1,6}, Yu. M. Konstantinov^{2,5}

¹*Scientific Center for Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk*

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

³*Regional Clinical Hospital, Irkutsk*

⁴*Linnological Institute SB RAS, Irkutsk*

⁵*Irkutsk State University, Irkutsk*

⁶*Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk*

Abstract. The dynamics of free circulating mtDNA levels in blood after ligation of the left coronary artery in experiment were studied. This parameter was shown to decrease 24 hours after ligation. After 48 and 72 hours, the levels of free circulating mtDNA in blood increased to reach control values. On the whole, the changes in mtDNA levels in blood revealed in this experiments during acute ischemia deserve studying of the mechanisms underlying the changes that will evaluate its potential use for diagnostic.

Keywords: myocardial ischemia, mtDNA levels, biomarkers of cardiac hystiocyte cytolysis, real time PCR.

Судаков Николай Петрович
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник; доцент
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
тел.: (3952) 46–52–70
Иркутская областная клиническая больница
664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100
тел.: (3952) 46–95–66,
факс (3952) 46–95–66
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24–18–70
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Попкова Татьяна Павловна
биолог
Иркутская областная клиническая больница
664049, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100
тел.: (3952) 46–95–66
факс (3952) 46–95–66
e-mail: ptanp@mail.ru

Катышев Александр Иванович
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–49–03
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Гольдберг Олег Аронович
кандидат медицинских наук
ведущий научный сотрудник
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
тел.: (3952) 46–52–70
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Пушкарев Борис Георгиевич
доктор медицинских наук, профессор
старший научный сотрудник
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
тел.: (3952) 46–52–70
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Sudakov Nikolay Petrovich
Candidate of Sciences (Biology), Senior
Research Scientist; Associate Professor
Research Center for Reconstructive and
Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 46–52–70
Regional Clinical Hospital
100, Yubileiny, Irkutsk, 664079,
tel.: (3952) 46–95–66,
fax: (3952) 46–95–66
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–18–70
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Popkova Tat'yana Pavlovna
Biologist
Regional Clinical Hospital
100, m-n Yubileinyi, Irkutsk, 664049
tel.: (3952) 46–95–66
fax: (3952) 46–95–66
e-mail: ptanp@mail.ru

Katyshev Aleksandr Igorevich
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–49–03
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Gol'dberg Oleg Aronovich
Candidate of Sciences (Medicine)
Leading Research Scientist
Scientific Center for Reconstructive
and Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 46–52–70
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Pushkarev Boris Georgievich
Doctor of Sciences (Medicine)
Professor, Senior Research Scientist
Scientific Center for Reconstructive and
Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 46–52–70
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Никифоров Сергей Борисович
доктор медицинских наук
ведущий научный сотрудник
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
тел.: (3952) 46–52–70
e-mail: telomere@mail.ru

Nikiforov Sergei Borisovich
Doctor of Sciences (Medicine)
Leading Research Scientist
Scientific Center for Reconstructive
and Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 46–52–70
e-mail: telomere@mail.ru

Клименков Игорь Викторович
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник; доцент
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–32–80
факс (3952) 42–54–05
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24–18–70
e-mail: iklimen@mail.ru

Klimenkov Igor Viktorovich
Candidate of Sciences (Biology), Senior
Research Scientist; Associate Professor
Institute of Limnology SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–32–80
fax: (3952) 42–54–05
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel. (3952) 24–18–70
e-mail: iklimen@mail.ru

Лепахова Светлана Александровна
доктор биологических наук
заведующая отделом
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
тел.: (3952) 46–52–70
Иркутский научный центр СО РАН
664033, г. Иркутск ул. Лермонтова, 134
e-mail: lepekhova_sa@mail.ru

Lepekhova Svetlana Aleksandrovna
Doctor of Sciences (Biology)
Head of Department
Scientific Center for Reconstructive
and Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 46–52–70
Irkutsk Scientific Center SB RAS
134, Lermontov st., Irkutsk, 664033
e-mail: lepekhova_sa@mail.ru

Апарцин Константин Анатольевич
доктор медицинских наук
заместитель директора по науке
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
тел.: (3952) 40–78–25
Иркутский научный центр СО РАН
664033, г. Иркутск ул. Лермонтова, 134
e-mail: dr.apartsin@yahoo.com

Apartsin Konstantin Anatolyevich
Doctor of Sciences (Medicine)
Deputy Director
Scientific Center for Reconstructive
and Restorative Surgery SB RAMS
1 Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 40–78–25
Irkutsk Scientific Center SB RAS
134, Lermontov st. Irkutsk, 664033
e-mail: dr.apartsin@yahoo.com

Константинов Юрий Михайлович
доктор биологических наук, профессор
заведующий лабораторией
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-49-03
факс: (3952) 51-07-54
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Konstantinov Yuriy Mikhailovich
Doctor of Sciences (Biology)
Professor, Head of Laboratory
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS,
132 Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-49-03
fax: (3952) 51-07-54
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru