

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

*Н.П. Судаков^{1,2,3}, Т.П. Попкова¹, Е.С. Клименко⁴, И.В. Клименков³, С.Б. Никифоров¹,
О.А. Гольдберг¹, Б.Г. Пушкарев¹, С.Д. Ежикеева⁵, М.Н. Тен⁵, Ю.М. Константинов^{2,4}*

¹ФГБНУ Научный центр хирургии и травматологии,
Иркутск, e-mail: npsudakov@rambler.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: npsudakov@rambler.ru

³ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, e-mail: iklimen@mail.ru

⁴ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

⁵ГБУЗ Иркутская орден «Знак Почета» областная клиническая больница,
Иркутск, e-mail: npsudakov@rambler.ru

Цель работы: оценить диагностическую перспективу цитохимического и молекулярного анализа митохондриальной дисфункции на ранних сроках развития дислипидемии, а также в динамике острого ишемического повреждения миокарда.

Дислипидемии моделировали атерогенной диетой на кроликах породы "Шинишила". Животные были разделены на две группы (для каждой группы n = 10): экспериментальная дислипидемия (ежедневная атерогенная диета: 350 мг холестерина на 1 кг веса животного) и группа контроля (стандартная диета вивария). Срок эксперимента составил 14 суток.

Инфаркт миокарда моделировали на самцах крыс линии «Вистар» подкожными инъекциями адреналина (0,2 мг на 100 г. массы животного). Крыс, получивших инъекции адреналина, выводили из эксперимента с целью взятия крови и аутопсии через 24 (n = 6), 48 (n = 6) и 72 часа (n = 6) наблюдения. Животным группы контроля (n=6) подкожно вводили физиологический раствор.

Активность ферментов-биомаркеров цитолиза в сыворотке крови: общей креатинфосфокиназы (КФК), креатинфосфокиназы МВ (КФК-МВ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), липидный спектр (концентрацию триацилглицеридов, общего холестерина, холестерина ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП) анализировали с использованием наборов реагентов «Human Diagnostics GmbH» (Германия) на биохимическом анализаторе Beckman synhron 4 (Beckman coulter, США). Количественный анализ свободно-циркулирующей митохондриальной ДНК осуществляли методом ПЦР в реальном времени. Митохондриальную ДНК выделяли из плазмы крови после удаления из нее тромбоцитов (Chiu R.W. et al, 2003). Анализ уровня мтДНК в пробах проводили на амплификаторе «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 (крысы – прямой праймер: 5'- TGCAGAAGCTATTAATGGTTCG-3', обратный праймер: 5'-TTGGCTCTGCCACCСТААТА-3'; кролики – прямой праймер: 5'-GTGTAGCCGCTATTAAGGTTTCG-3', обратный праймер: 5'-GGCTCTGCCACCСТААСТАAGCT-3') длиной 230 п.н. (Ellinger J. et al, 2008; Sudakov N.P. et al, 2012). Анализ состояния липидных частиц и митохондрий в клетках печени осуществляли с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Германия). Фрагменты ткани печени фиксировали 2 % параформальдегидом. Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США), липидные капли – Nile red (Sigma-Aldrich, USA), функционально-активные митохондрии – Mitotracker orange (Life Technologies, USA). В программной среде Imaris Bitplane 7.2.3. оценивали объем липидных капель,

количество функционально-активных митохондрий в $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ткани печени. Морфологические изменения миокарда и печени анализировали световой микроскопией гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением положений Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (2000 г.) и Директивы Европейского сообщества 86/609 ЕЕС о гуманном отношении к экспериментальным животным (1986 г.). Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 10, используя непараметрические методы. Межгрупповые различия оценивали по критериям Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса.

На модели дислипидемии показано, что на 14 сутки наблюдения у экспериментальных животных уровень общего холестерина крови возрастает в 14 раз ($p \leq 0,05$), при этом дисбаланс его атерогенной (ЛПНП и ЛПОНП) и антиатерогенной (ЛПВП) фракций увеличивается в сравнении с контролем в 6 раз ($p \leq 0,05$). Это отражает ослабление способности печени сдерживать развитие нарушений обмена липидов крови. При этом активность АСТ и АЛТ сохраняется на уровне контроля в течении данного срока наблюдения, что свидетельствует об отсутствии выраженных повреждений клеток печени. Тем не менее, трехмерное сканирование ткани печени с помощью лазерной конфокальной микроскопии показало, что на этом сроке наблюдения уже развиваются структурно-функциональные нарушения в гепатоцитах. Установлено, что на 14 сутки атерогенной диеты в гепатоцитах регистрируется статистически значимое ($p \leq 0,05$) трехкратное возрастание общего объема липидных капель в сравнении с контролем. Анализ функционально-активных митохондрий на 14 сутки выявил двукратное снижение их количества в клетках печени животных экспериментальной группы ($p \leq 0,05$). Таким образом, анализ препаратов печени, окрашенных флюорисцентными красителями Nile red и Mitotracker orange с помощью лазерной конфокальной микроскопии позволяет уже в течении первых недель экспериментальной дислипидемии выявить возрастание объема липидных капель, способствующее снижению количества функционально-активных митохондрий в клетках печени, что служит основой для прогрессирования нарушений липидного обмена в данном органе. Интересно отметить, что на фоне зарегистрированных нарушений метаболизма липидов крови и структурно-функциональных изменений в клетках печени наблюдается тенденция к трехкратному возрастанию концентрации свободно циркулирующей мтДНК в крови в сравнении с контролем ($p = 0,6$). Это характеризует перспективу данного показателя в качестве одного из ранних нетканеспецифичных биомаркеров развития нарушений в клетках-мишенях при дислипидемии и атеросклерозе и предопределяет необходимость изучения его динамики на более поздних сроках экспериментальной дислипидемии.

При моделировании инфаркта миокарда установлено, что через 24 часа после введения адреналина в крови экспериментальных животных наблюдается значимое возрастание активности КФК, КФК-МВ, ЛДГ и АСТ. Это объективно свидетельствует о развитии литических процессов в кардиомиоцитах на данном сроке наблюдения. Уровень свободно циркулирующей мтДНК крови при этом возрастает в 1,5 раза в сравнении с контролем. Через 48 часов активность КФК, КФК-МВ и ЛДГ проявляет тенденцию к снижению, оставаясь, тем не менее, выше значений контроля. Активность АСТ при этом уже находится на уровне контроля. Уровень свободно циркулирующей мтДНК в крови экспериментальных животных статистически значимо возрастает в 2 раза ($p \leq 0,05$). Через 72 часа после введения адреналина, активность всех исследуемых маркеров цитолиза снижается до показателей контроля. Гистологические исследования миокарда экспериментальных животных на этом сроке наблюдения показали формирование в сердечной мышце множественных очагов лизиса мышечных волокон, с признаками воспаления. Об этом объективно свидетельствует инфильтрация данных очагов макрофагами и полиморфноядерными фагоцитами. На фоне описанных выше измене-

ний, уровень свободной мтДНК плазмы экспериментальных животных на данном сроке наблюдения увеличен в 1,5 раза в сравнении с группой контроля ($p \leq 0,05$). Таким образом, пик возрастания уровня свободно циркулирующей мтДНК крови после подкожных инъекций адреналина формируется на сутки позднее увеличения активности известных кардиомаркеров. Наибольшее значение концентрации мтДНК крови достигается уже на этапе снижения активности данных ферментов и развитии воспалительного процесса в зонах некроза миокарда. Для объективного понимания информационного потенциала данного показателя для клинической кардиологии необходимо выявление и изучение процессов, определяющих его изменения.

Таким образом, полученные нами данные характеризуют высокий диагностический потенциал цитохимического анализа объема липидных частиц и количества функционально-активных митохондрий, определяемых методом трехмерного сканирования образцов ткани с помощью лазерной конфокальной микроскопии для исследований биоптата печени с целью ранней диагностики внутриклеточных нарушений при формировании липидной инфильтрации данного органа. Данные анализа уровня свободно циркулирующей мтДНК на ранних сроках развития дислипидемии, а также в динамике острого ишемического повреждения миокарда определяют необходимость детального изучения динамики данного показателя и механизмов изменения его уровня при атеросклерозе и острых ишемических повреждениях миокарда.

В целом, полученные результаты будут создавать основу для создания технологий диагностического мониторинга развития дислипидемии, атеросклероза, а также острых ишемических повреждений миокарда и требует дальнейших исследований.

Литература

Chiu R.W., Chan L.Y., Lam N.Y. et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma // *Clin. Chem.* – 2003. – V. 49. – P. 719–726.

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. – V. 102. – P. 628–632.

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