

ГЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ МИОКАРДА ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА, ЕЕ ДИНАМИКА ПРИ ЛЕЧЕНИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ

УДК 616.127-005.8-002.1-036.88-085-08
Поступила 12.05.2014 г.



С.С. Белоусов, д.м.н., профессор кафедры скорой и неотложной медицинской помощи¹;
А.Н. Кузнецов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой факультетской и поликлинической терапии¹;
Н.В. Ерошевская, ассистент кафедры факультетской и поликлинической терапии¹;
Д.В. Новиков, к.б.н., ведущий научный сотрудник НИИ молекулярной иммунологии²;
В.В. Новиков, д.б.н., профессор, зав. кафедрой молекулярной иммунологии, директор НИИ молекулярной иммунологии²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Цель исследования — изучение генной регуляции апоптоза при остром инфаркте миокарда и в процессе лечения, оценка влияния левокарнитина (Элькара) на экспрессию генов Fas-зависимого пути апоптоза.

Материалы и методы. Обследовано 28 больных Q-инфарктом миокарда, включенных в исследование в первые сутки от начала заболевания и наблюдавшихся в процессе лечения, из которых сформировали две группы. 1-я группа (n=10) состояла из больных, находившихся на принятом в настоящее время стандартном лечении (антиагреганты, ингибиторы АПФ, антиангинальные — по показаниям). 2-я группа (n=18) — больные, получающие стандартное лечение, к которому с первого дня добавлялся Элькар (левокарнитин) внутривенно в физиологическом растворе 5% глюкозы в дозе 3,0 г дважды в сутки в течение трех дней. В течение последующих 7 дней больной получал Элькар перорально по 4,0 г в сутки. 3-я группа (n=18) — контрольная, состояла из здоровых лиц.

Всем больным проводилось общеклиническое обследование, ЭКГ, эхокардиография, генетическое исследование: определялась экспрессия мРНК генов *tFas* и *sFas* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, трижды у каждого больного — при поступлении, через неделю лечения и в конце второй недели лечения.

Результаты. Выявлено, что экспрессия генов апоптоза у больных Q-инфарктом повышена по сравнению с нормой и что это повышение длится и за пределами острого периода инфаркта. Установление данного факта позволяет объяснить причину пролонгирования апоптоза сохраняемой активностью генов, индуцирующих апоптогенез. Применение левокарнитина способствует нормализации повышенного уровня экспрессии генов и таким путем оказывает кардиопротективное действие, важное при лечении острого инфаркта, особенно в острый период.

Ключевые слова: апоптоз при инфаркте миокарда; гены апоптоза; левокарнитин.

English

Gene Control of Programmed Myocardial Cell Death in Acute Myocardial Infarction, Its Dynamics in Treatment and Prospects for Therapy

S.S. Belousov, D.Med.Sc., Professor, the Department of Emergency Medical Care¹;
A.N. Kuznetsov, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Departmental and Polyclinic Therapy¹;
N.V. Eroshvskaya, Tutor, the Department of Departmental and Polyclinic Therapy¹;
D.V. Novikov, PhD, Leading Research Worker, Scientific Research Institute of Molecular Immunology²;
V.V. Novikov, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Molecular Immunology, Director of Scientific Research Institute of Molecular Immunology²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

Для контактов: Белоусов Сергей Сергеевич, e-mail: belousov30@mail.ru

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Prospekt Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

The aim of the investigation was to study gene regulation of apoptosis in acute myocardial infarction and during the treatment, and assess the effect of levocarnitine (Elcar) on gene expression of Fas-dependent apoptosis.

Materials and Methods. We examined 28 patients with Q-myocardial infarction included in the study within the first 24 h of the disease and followed up during the treatment course. The patients were divided into two groups: group 1 (n=10) consisted of patients with standard treatment (anti-aggregants, ACE inhibitors, and anti-anginal agents — if indicated); group 2 (n=18) — those patients, who received standard treatment with Elcar (levocarnitine) intravenously, in 5% glucose normal saline, at the dose of 3.0 g a day for three days. For the following 7 days the patients were given Elcar per os, 4.0 g a day. A control group (group 3) (n=18) consisted of healthy subjects.

All patients underwent general examination, ECG, echocardiography, genetic research: we determined mRNA gene expression of mFas and sFas using real-time polymerase chain reaction thrice in each patient — on admission, after 1 week treatment, and at the end of the second week of treatment.

Results. Apoptotic gene expression in patients with Q-infarction was found to be increased compared to the norm, the increase lasting for a longer period than acute myocardial infarction itself. This fact enables to explain the cause of prolonged apoptosis by the sustained activity of apoptosis-inducing genes. The use of levocarnitine promotes the normalization of an increased level of gene expression, and has a cardioprotective effect that is important in acute myocardial infarction treatment.

Key words: apoptosis in myocardial infarction; apoptosis genes; levocarnitine.

К числу важных достижений современной биологической науки и медицины относится открытие механизмов апоптоза клеток и изучение роли генных нарушений в онтогенезе, патогенезе сердечно-сосудистых и других заболеваний.

Установлено, что при остром инфаркте миокарда программированная гибель миокарда сопутствует гибели клеток от некроза в центральной зоне инфаркта и наблюдается в значительно большем размере (в разы) в периинфарктной зоне [1–3]. Апоптоз продолжается также и в постинфарктном периоде на протяжении нескольких недель и даже месяцев, вызывая расширение зоны погибшего миокарда и ремоделирование желудочка, развитие сердечной недостаточности, повышая риск аритмогенеза и других осложнений постинфарктного периода. Процесс программированной гибели клеток протекает под контролем генетической системы — от первого, начального, периода инициации до финальной стадии, стадии деградации. Как установлено, в этот процесс вовлечено свыше 25 генов, которые могут действовать на апоптогенез по-разному. Конечный результат зависит от нарушения баланса между про- и антиапоптозными влияниями этих генов. Именно поэтому необходимо знать состояние генной активности. Имеются разные патогенетические виды апоптоза, например Fas-зависимый вид начала и течения апоптоза. Есть вид, связанный с нарушениями митохондриальной генетической системы, а также другие виды: цитокиновый, пероксидативный и т.д.

Очевидно, что регуляция программированной гибели клеток органов и тканей будет требовать разных лечебных мероприятий. Решение этой важной задачи невозможно без кооперативных исследований клиницистов-кардиологов, генетиков, иммунологов. Это позволит: 1) провести поиск возможных путей генетической регуляции индуцированного апоптоза у больных инфарктом миокарда; 2) оценить эффективность парциальных и комбинированных методов регуляции генетического аппарата клеток.

Цель исследования — изучение генной регуляции апоптоза при остром инфаркте миокарда и в процессе лечения, оценка влияния левокарнитина (Элькара) на экспрессию генов Fas-зависимого пути апоптоза.

В процессе работы решались следующие задачи: 1) количественная характеристика активности генов основного (рецепторного) пути апоптоза при остром инфаркте миокарда (так называемого Fas-зависимого пути апоптоза) на различных этапах развития болезни; 2) исследование динамики в процессе лечения двух форм гена Fas: мембраносвязанной формы mFas (CD95, FasR) и растворимой формы sFas (FasL, CD178); 3) количественная оценка влияния на экспрессию генов Fas препарата левокарнитин (Элькар), способного, по некоторым данным, оказывать тормозящее действие на процесс апоптоза. Этот препарат обладает антиоксидантным действием, повышает толерантность миокарда к дефициту кислорода (гипоксии), улучшает сократительную функцию сердца [4–10].

Материалы и методы. Активность генов апоптоза исследовали путем определения в крови после лизиса клеточных и ядерных мембран содержания мРНК исследуемых генов, которое зависит от общего количества генов и их эффективности. Уровень мРНК в крови определяли путем амплификации (накопления) ее количества в ходе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью специального устройства DT Lite 4 («ДНК-Технология», Россия) и рассчитывали с учетом фотофлуоресцентной реакции праймеров, специфичных для исследуемых мРНК. Учитывали число циклов, необходимое для амплификации праймера до того количества, которое давало реакцию флуоресценции. Этот момент носит наименование *C_p* — точка пересечения (англ. *crossing point*) и позволяет провести расчет количества амплификата. Для этого применяются специальные формулы, предложенные биотехнологами. Наибольшую популярность имеет метод расчета, разработанный генетиками Германии и Англии, известный под назва-

нием REST (relative expression softlove tool) — компьютерная программа расчета относительной экспрессии нуклеопротеинов [11, 12].

Группа экспертов, проверявшая этот метод расчета экспрессии генов, отметила точность, воспроизводимость данных этой программы и ее пригодность для расчетов межгрупповых и индивидуальных соотношений [3].

Все операции по исследованию экспрессии генов апоптоза проводились в лаборатории НИИ молекулярной иммунологии Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.

При определении экспрессии генов указанная программа использует относительную величину R, выводимую из формулы $R = E^{(\Delta Cp \text{ target gene} - Cp \text{ ref gene})}$.

В этой формуле E (эффективность) выражает величину, на которую увеличивается концентрация мРНК в течение одного цикла; Cp — количество циклов до начала кривой флюоресценции; ref gene — ген сравнения (контроля); a target gene — целевой ген; Δ — разница между средним значением Cp в группе обследуемых и средним значением референтного гена.

Найденная величина R отображает, насколько искомым (таргетный) ген активнее по показателю экспрессии в сравнении с покоящимся геном. Численное значение R является безразмерной величиной. Считается, что определение абсолютного значения уровня гена в крови не имеет преимуществ перед информативностью относительной экспрессии. Все данные приводятся в сравнении с уровнем гена «домашнего хозяйства» (убиквитина/референтного гена), считающегося наиболее стабильным и принимаемым за точку отсчета в так называемых нормализованных результатах. Изучение экспрессии проведено путем сравнения усредненных данных экспрессии мРНК (mFas и sFas форм гена Fas) в группах больных и группах здоровых. При анализе динамики генов использовалось сравнение исходных и достигнутых данных. Статистические данные признавались достоверными при величине $p < 0,05$. Получаемые данные являются «нормализованными», т.е. соотношенными с уровнем гена «домашнего хозяйства».

На протяжении времени госпитализации больные получали лечение установленного стандарта — ингибиторами ангиотензина, антиангинальными и антиагрегантными средствами. Поводили ЭКГ- и эхоКГ-исследования в динамике и биохимические исследования (С-реактивный белок, КФК-МВ, тропонин-I, липиды крови и др.).

Всего обследовано 28 больных инфарктом миокар-

да, из которых 16 мужчин и 12 женщин. Средний возраст мужчин — 62 года, женщин — 68 лет.

Тяжесть состояния оценивали при поступлении по показателю TIMI, среднегрупповые значения которого в группе мужчин были равны 4, в группе женщин — 4,2. Передний инфаркт миокарда установлен у 16 больных, нижний — у 9, циркулярный — у 3.

Также были обследованы 18 здоровых лиц (доноров и сотрудников лечебных учреждений) с целью формирования группы сравнения (контроля).

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и одобрено Этическим комитетом НижГМА. От каждого пациента получено информированное согласие.

Исследование динамики экспрессии генов Fas выполнено у 10 больных инфарктом миокарда, которые прошли десятидневный курс лечения левокарнитином (Элькар, ф. «Пик-Фарма», Россия), препаратом, у которого предполагается ингибирующее апоптоз действие.

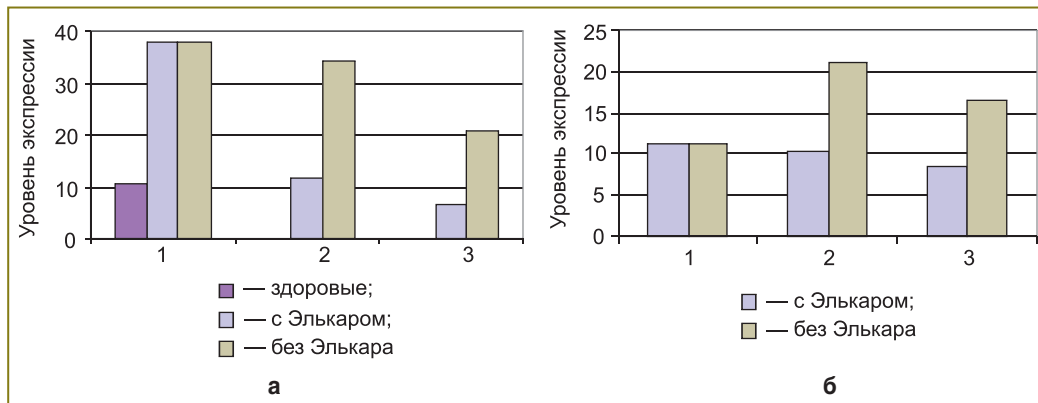
Всего проанализировано 156 анализов от здоровых и больных людей.

Результаты и обсуждение. Уровень экспрессии мРНК гена mFas здоровых людей, нормализованный по уровню референтного гена, равен 4,2. Экспрессия этого гена в группе больных крупноочаговым инфарктом оказалась в первый день равной 9,56, т.е. в 2 раза выше. Экспрессия мРНК sFas была равной 4,5 в группе здоровых и 8,87 — в группе больных. Функциональную активность генов Fas у больных в процессе лечения демонстрируют данные повторных исследований экспрессии мРНК Fas, проведенных через 1 и 2 нед, что согласно консенсусным методическим разработкам АНА (Американской кардиологической ассоциации и коллегии университетских кардиологов), Европейской кардиологической ассоциации и Российского общества кардиологов, соответствует первому — острому и второму — подострому периодам инфаркта миокарда (см. таблицу и рисунок).

В таблице приведены значения R — относительной величины экспрессии генов (мРНК генов mFas и sFas) у больных острым инфарктом миокарда на протяжении острого и раннего постинфарктного периода и у здоровых людей, чьи данные приняты за норму. Также в таблице и рисунке приведены результаты мониторинга экспрессии генов под влиянием стандартного лечения больных в остром и раннем подостром периодах

Динамика экспрессии генов апоптоза при лечении инфаркта миокарда (величина R)

Исследуемые группы	mFas			sFas		
	до лечения	через 1 нед	через 2 нед	до лечения	через 1 нед	через 2 нед
Основная группа — больные, не получавшие Элькар (n=18)	38	34,05	20,82	11,39	21,25	16,56
Больные, получавшие Элькар (n=10)	38	10,33	8,46	11,39	10,33	8,46
Контрольная группа (n=18)		10,41			15,24	



Экспрессия гена mFas (а) и sFas (б) у здоровых и больных острым инфарктом миокарда на фоне лечения Элькаром и без него: 1 — при поступлении; 2 — через 1 нед; 3 — через 2 нед

(1-я и 2-я недели) и на фоне комплексного лечения с включением левокарнитина (Элькара).

Показанная связь между длительностью экспрессии генов апоптоза mFas и sFas отмечена впервые и обосновывает необходимость проведения ингибции апоптоза в целях протекции миокарда с помощью генной терапии инфаркта миокарда.

В связи с «кризисом» генно-инженерных методов в клинических условиях [13–16] фармакологическая регуляция генной активности (экспрессии) может быть альтернативой генно-инженерному методу, а применение левокарнитина, тормозящего митохондриальные нарушения, — важным дополнением к известным фармакологическим агентам защиты миокарда при инфаркте.

Заключение. Активация (экспрессия) генов, участвующих в развитии и поддержании Fas-зависимого пути апоптоза у больных крупноочаговым острым инфарктом миокарда, повышена по сравнению с нормой (уровнем экспрессии у здоровых людей). Повышенная экспрессия генов апоптоза сохраняется не только в фазе острейшего и острого (развивающегося) инфаркта, но и в ранней постинфарктной фазе, что может служить причиной длительности апоптоза у этих больных.

Препарат левокарнитин (Элькар), примененный в ранний период инфаркта миокарда, ингибирует апоптоз, снижая экспрессию генов апоптоза Fas-пути и оказывая цитопротективное действие.

Финансирование исследования. Работа проведена на личные средства авторов.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Anversa P., Cheng W., Liu Y., et al. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1998; 93(Suppl 3): 8–12.
2. Anversa P., Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ Res* 1998; 82(11): 1231–1233.
3. Bennett M. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 2002; 87(5): 480–487.
4. Ferrari R., Merli E., Cicchitelli G., et al. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on

cardiovascular diseases: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033: 79–91, <http://doi.org/10.1196/annals.1320.007>.

5. Di Cesare Mannelli L., Ghelardini C., Calvani M., et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2007; 26(4): 820–827.
6. Копелевич В.М. Чудо карнитина. М: Генезис; 2003.

7. L-carnitine and its role in medicine from function to therapy. Edited by Ferrari R., DiMauro S., Sherwood G. New York: Academic Press; 1992.

8. Iliceto S., Scrutinio D., Bruzzi P., et al. Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-carnitine ecocardiografia digitalizzata infarto miocardico (CEDIM) trial. *JACC* 1995; 26(2): 380–387.

9. Tarantini G., Scrutinio D., Bruzzi P., et al. Метаболическая терапия L-карнитином при переднем остром инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST. Рандомизированное клиническое исследование. *Российский кардиологический журнал* 2011; 4(90): 1–10.

10. Аронов Д.М. Реалии и перспективы применения L-карнитина в кардиологии. *Российский кардиологический журнал* 2013; 5(103): 73–80.

11. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45, <http://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.

12. Pfaffl M.W. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: Bustin S.A. (editor). *A-Z of quantitative PCR*. USA; 2004; p. 87–112.

13. Gene therapy — developments and future perspectives. Edited by Kang Ch. InTech; 2011, <http://doi.org/10.5772/748>.

14. Evance J.P., Meslin E.M., Marteau T.M., Caulfield T. Deflating the genomic bubble. *Science* 2011; 331(6019): 861–862, <http://doi.org/10.1126/science.1198039>.

15. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Утешев Д.Б. и др. Состояние и перспективы развития генотерапии в России. *Вестник Росздравнадзора* 2004; 4: 56–60.

16. Панфилова Е.В., Ткачук Ф.В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. *Кардиологический вестник* 2007; 2: 5–15.

References

1. Anversa P., Cheng W., Liu Y., et al. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1998; 93(Suppl 3): 8–12.

2. Anversa P., Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ Res* 1998; 82(11): 1231–1233.
3. Bennett M. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 2002; 87(5): 480–487.
4. Ferrari R., Merli E., Cicchitelli G., et al. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033: 79–91, <http://doi.org/10.1196/annals.1320.007>.
5. Di Cesare Mannelli L., Ghelardini C., Calvani M., et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2007; 26(4): 820–827.
6. Kopelevich V.M. *Chudo karnitina* [Miracle of carnitine]. Moscow: Genezis; 2003.
7. *L-carnitine and its role in medicine from function to therapy*. Edited by Ferrari R., DiMauro S., Sherwood G. New York: Academic Press; 1992.
8. Iliceto S., Scrutinio D., Bruzzi P., et al. Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-carnitine ecocardiografia digitalizzata infarto miocardico (CEDIM) trial. *JACC* 1995; 26(2): 380–387.
9. Tarantini G., Scrutinio D., Bruzzi P., et al. L-carnitine metabolic therapy in acute anterior myocardial infarction with ST segment elevation. Randomized clinical study. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal* 2011; 4(90): 1–10.
10. Aronov D.M. L-carnitine in cardiology: reality and perspectives. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal* 2013; 5(103): 73–80.
11. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45, <http://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
12. Pfaffl M.W. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: Bustin S.A. (editor). *A-Z of quantitative PCR*. USA; 2004; p. 87–112.
13. *Gene therapy — developments and future perspectives*. Edited by Kang Ch. InTech; 2011, <http://doi.org/10.5772/748>.
14. Evance J.P., Meslin E.M., Marteau T.M., Caulfield T. Deflating the genomic bubble. *Science* 2011; 331(6019): 861–862, <http://doi.org/10.1126/science.1198039>.
15. Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Uteshev D.B., et al. Gene therapy in Russia: the state and prospects for development. *Vestnik Roszdravnadzora* 2004; 4: 56–60.
16. Parfenova E.V., Tkachuk V.A. Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects. *Kardiologicheskiy vestnik* 2007; 2: 5–15.