УДК 616.127-005-089.811-092.4:615.27-073.584:615.033]-092.9:599.323.45

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ МИОКАРДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫРАЖЕННОСТИ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРFUЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Е. А. СЕРГЕЕВА¹, С. С. КРУТИЦКИЙ¹, Е. А. ВЕЛИКАНОВА¹, А. В. ЦЕПОКИНА¹,
А. А. КУЗЬМИНА¹, О. В. ГРУЗДЕВА¹, Л. В. АНТОНОВА¹, Е. В. ГРИГОРЬЕВ^{1,2}

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». Кемерово, Россия*

² *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава РФ. Кемерово, Россия*

Цель. Определить диагностическую значимость метода лазерно-индуцированной флуоресценции в отношении выраженности ишемических и реперфузионных повреждений изолированного сердца в условиях кардиоплегического ареста.

Материалы и методы. Изолированные сердца крыс-самцов линии Wistar перфузировали методом Лангендорфа. Опытная группа сердец (n=7) – в реперфузионный период интракоронарно вводили препарат «Неотон». Контрольная группа (n=7) – без фармакологического воздействия. Проводили непрерывный мониторинг сердец при помощи прибора «ЛАКК-М»: зарегистрированы динамики флуоресценции НАДН, пиридоксина, флавинов. Также фиксировали физиологические показатели сердец. Изучали полученный перфузат на предмет транслокации в коронарное русло классических и высокоспецифических маркеров повреждения миокарда, применяя ИФА-исследования.

Результаты. Наибольшие значения коэффициентов корреляции получены в опытной группе между Kf НАДН и данными по БСЖК, тропонину I, общей концентрации органических перекисей: $r=0,76$, $r=0,63$, $r=-0,83$ соответственно. Неотон предупредил дефицит энергии, что способствовало увеличению сдвига НАД/НАДН в правую сторону и снижению уровня продуктов оксидативного стресса.

Оптическая биопсия является достаточно перспективным методом диагностики ишемических и реперфузионных повреждений.

Ключевые слова: изолированное сердце, кардиоплегический арест, ишемия и реперфузия, экзогенный фосфокреатин, лазерно-индуцированная флуоресценция.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF OPTICAL MYOCARDIAL BIOPSY TO ASSESS THE SEVERITY OF ISCHEMIC AND REPERFUSION INJURY

E. A. SERGEEVA¹, S. S. KRUTITSKIY¹, E. A. VELIKANOVA¹, A. V. TSEPOKINA¹,
A. A. KUZMINA¹, O. V. GRUZDEVA¹, L. V. ANTONOVA¹, E. V. GRIGORIEV^{1,2}

¹ *Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. Kemerovo, Russia*

² *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kemerovo State Medical Academy Ministries of Health of the Russian Federation. Kemerovo, Russia*

Purpose. To determine whether laser induced fluorescence is significant for the diagnostics of ischemic and reperfusion injury of isolated heart in a cardioplegic arrest conditions.

Materials and methods. Isolated hearts (n=14) of Wistar rats (♂) were perfused by Langendorff method. The experimental and control groups included hearts with or without intracoronary injection of Neoton in reperfusion period, respectively. Continuous monitoring of the hearts was performed using the LAKK-M device. We recorded the dynamics of fluorescence of NADH, pyridoxine and flavins. We also fixed physiological indices of the hearts. By using ELISA, we studied the perfusate for release of both classic and highly specific markers of myocardial damage in coronary arteries.

Results. The highest correlation coefficients were obtained between Kf of NADH and Heart-FABP, Troponin I, and the total concentration of peroxides: $r=0.76$, $r=0.63$, $r=-0.83$ respectively. Neoton prevented energy shortage that contributed to the increase in shift of NAD/NADH to the right and reduction of oxidative stress.

Conclusions. The optical biopsy is a promising method for diagnostics of ischemic and reperfusion injury.

Key words: isolated heart, cardioplegic arrest, ischemia and reperfusion, postconditioning, exogenous phosphocreatine, laser induced fluorescence.

Введение

Данные ВОЗ сообщают, что в структуре заболеваемости, инвалидизации и смертности населения развитых стран мира лидируют болезни системы кровообращения. Из их числа наиболее распространенной патологией является ишемическая болезнь сердца (ИБС) [1–4]. Разнообразие классических и новейших медикаментозных схем лечения уступает по эффективности оперативному лечению – аортокоронарному шунтированию (АКШ), которое остается на данный момент золотым стандартом [5]. Несмотря на постоянное усовершенствование оперативных методов лечения, вмешательство в большинстве случаев будет сопровождаться искусственным кровообращением (ИК) [6]. Наиболее ожидаемым ответом на гипоксию в условиях кардиopleгического ареста и ИК является «оглушение» миокарда (станнинг) [7]. Данное состояние как следствие реперфузионного синдрома является обратимым при проведении своевременных защитных мероприятий, направленных на восстановление функционирования миокарда. Современный мониторинг состояния сердечной мышцы при оперативных вмешательствах представлен следующими методами: определением маркеров повреждения миокарда из системного и коронарного кровотока, рН-метрией, термометрией миокарда, электрокардиограммой и другими. Но они имеют ряд общих недостатков: изолированность точек анализа, длительность получения результатов и, как следствие, недостаточная информативность, приводящая к пагубным последствиям (станнинг или инфаркт). В свою очередь, методы оптической биопсии способны выступить в качестве перспективной основы кардиомониторинга, обладая следующими преимуществами: высокой чувствительностью и специфичностью в оценке активности и баланса ферментов дыхательного цикла, незамедлительным отображением результатов как в виде графиков, так и в виде цифровой таблицы, что в совокупности позволяет отслеживать гипоксические изменения миокарда, провести адекватные восстановительные/защитные мероприятия и проверить их эффективность в режиме online [8–10].

Цель исследования

Определить диагностическую значимость метода лазерно-индуцированной флуоресценции в отношении выраженности ишемического и реперфузионного повреждения изолированного сердца в условиях кардиopleгического ареста.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 300 ± 50 г. Содержание, кормление, уход и выведение с последующей утилизацией лабораторных животных проводили в соответствии с правилами Европейской конвенции (Страсбург, 1986). Препарат изолированного сердца (*ex vivo*) был приготовлен по одному из классических подходов – методике Langendorff с использованием перфузионного раствора Кребса – Хензеляйта.

Протокол перфузии изолированных сердец на фоне введения препарата: 20 мин – перфузия; 8 мин – гипоперфузия (20 мл/ч) охлажденным (4°C) кардиopleгическим раствором («Кустодиол», Др. Франц Келер Хеми ГмбХ, Германия); 240 мин – глобальная кардиopleгическая ишемия; 30 мин – реперфузия с интракоронарным введением препарата экзогенного фосфокреатина («Неотон», Альфа Вассерман, Италия), рассчитанного на массу сердца животного, в начальные 8 мин реперфузии.

Группы сравнения: опытная группа сердец «Неотон» ($n=7$), перфузируемая по вышеописанному протоколу. Контрольная группа ($n=7$) исключала фармакологическое воздействие.

Регистрация динамики флуоресценции (коэффициентов флуоресценции (Kf)) одного из основных участников окислительного метаболизма – восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАДН); пиридоксина и флавинов осуществлена на комплексе многофункциональной лазерной диагностики «ЛАКК-М» (НПП «Лазма», Россия).

Оценена динамика скорости коронарного потока (СКП, мл/мин), а также частота сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.), при помощи введенного в его полость латексного баллончика, который соединен с датчиком давления, встроенного в аппарат для физиологических исследований MP36 компании Biopac Systems, Inc (California, USA).

Активность ферментов креатинфосфокиназы миокардиальной фракции (КФК-МБ, Ед/л), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, Ед/л), аспаратаминотрансферазы (АСТ, Ед/л) оценена методом ферментативной кинетики на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30i фирмы Thermo Fisher Scientific (Финляндия). Концентрация белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК, нг/мл), установлена методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора фирмы Hycult biotech (США). Концентрация высокоспецифичного маркера повреждения миокарда тропонина I определена коммерческим набором

для ИФА Rat Cardiac Troponin I (сTn- I) (ELISA kit, Cusabio, КНР). Выраженность оксидативного стресса установлена по количественному определению перекиси спектрометрическим методом с использованием ИФА набора OXYSTAT ASSAY (Австрия).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 10.0. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни для несвязных пар. Уровень статистической значимости учитывался при $p < 0,05$. Данные представлены в виде графиков по медиане и квартильному размаху.

Результаты

На рисунке 1 продемонстрирована динамика транслокации внутриклеточных ферментов (АСТ, ЛДГ, КФК-МБ).

Рис. 1. Динамика транслокации внутриклеточных ферментов

Анализ полученных данных позволил выявить следующее: незначительное увеличение активности ЛДГ на всем периоде реперфузии, возможно, характеризует переход аэробного пути метаболизма на анаэробный; недостоверное повышение ферментативной активности КФК-МБ к 10 мин реперфузии, предположительно, объясняется донацией фосфокреатина за счет введения препарата или же возможным транзиторным повреждением мембраны кардиомиоцитов. Что касается ферментативной активности АСТ, то она после 10-й минуты снизилась, отразив процессы структурной стабилизации кардиомиоцитов.

Уровень концентрации БСЖК и тропонина I в группе «Неотон» по сравнению с группой контроля оставался постоянным после 10-й минуты реперфузии, что говорит о меньшем количестве погибших или структурно поврежденных кардиомиоцитов (рис. 2). Также в опытной группе уровень концентрации тропонина I на 10-й мин недостоверно, но ниже, чем в контрольной точке, вероятно, это связано с более низким напряжением стенок миокарда, возникающим в результате перегрузки объемом, и сопротивлением в реперфузионный период [11].

Рис. 2. Динамика транслокации высокоспецифичных маркеров повреждения миокарда

Неотон обеспечивает быстрый синтез АТФ без участия дыхательной цепи [12], предупреждая

энергетический дефицит и, как следствие, поддерживая редокс-статус клетки. На 10-й мин реперфузионного периода общая концентрация органических перекисей в контрольной группе выше исходных значений. Одновременно в опытной группе данный показатель ниже как исходного, так и контрольного уровней, что указывает на менее выраженный оксидативный стресс в данной временной точке эксперимента, обеспеченный холодовой пlegией и введением препарата. Поскольку кардиомиоциты не подверглись явному энергетическому дефициту, не произошло повышения интенсивности окислительной деструкции белков и липидов, приводящей к нарушению клеточной мембраны [13], тем самым к росту транслокации маркеров повреждения миокарда в коронарное русло в период реперфузии. Но дальнейший растущий характер прямой графика (рис. 3) показал постепенное накопление продуктов оксидативного стресса, который не достиг уровня исходных значений. Установленный процесс, скорее всего, связан с быстрым истощением экзогенного фосфокреатина.

Изменение кривой графика СКП в группе «Неотон» практически продублировало таковое в группе контроля. Это позволяет заключить, что рассматриваемый препарат не обладает эффектами вазопрессора или вазодилататора. ДРЛЖ значительно увеличилось за счет поступления дополнительной энергии. Последняя позволила миокарду увеличить силу сердечных сокращений при одновременном значимом снижении ЧСС, следуя сохранению закона Франка – Старлинга. В совокупности данные процессы увеличили адаптацию изолированного сердца к реперфузии: к 30-й минуте сократительная активность опытных сердец возвратилась к исходному уровню (рис. 4).

Экспериментальные периоды перфузии и реперфузии мониторировались прибором «ЛАКК-М». В итоге были получены данные о биохимическом статусе миокарда в виде графика поглощения и отражения энергии, испускаемой лазером через УФ-светофильтр (рис. 5).

По данным графика автоматически рассчитывались Kf НАДН, пиридоксина и флавинов. В группе «Неотон» степень и скорость накачки (поглощения энергии) выше, чем в группе контроля (рис. 5а). На фоне введения препарата большее количество НАД⁺ восстановилось до НАДН по сравнению с данными контрольной группы. Также более высокие пики поглощения излучения имели пиридоксин и флавины в сравнении с контролем, что, возможно, сопряжено с ростом активности метаболических процессов в миофибриллах и повышением

Рис. 3. Изменение перекисного статуса кардиомиоцитов

Рис. 4. Изменение параметров: СКП и сократительной активности миокарда;

* $p < 0,05$, относительно значений контрольной группы

сократительной функции изолированных сердец опытной группы в период реперфузии. В таблице продемонстрированы коэффициенты корреляции по полученным данным для группы «Неотон».

Рис. 5. Типичные спектры поглощения и отражения излучения: а – контрольная группа; б – «Неотон»

Таблица

Коэффициенты корреляции между Kf и высокоспецифичными маркерами повреждения, уровнем общей концентрации органических перекисей			
Сравниваемые показатели	Точка эксперимента		
	Исходная точка	10 мин реперфузии	30 мин реперфузии
НАДН / БСЖК	-0,62	0,16	0,76
НАДН / тропонин I	0,03	0,63	-0,23
НАДН / общ. конц. перекисей	0,3	-0,83	-0,07
Пиридоксин / БСЖК	0,69	-0,09	0,41
Пиридоксин / тропонин I	0,22	-0,48	-0,79
Пиридоксин / общ. конц. перекисей	0,47	0,08	0,30
Флавины / БСЖК	0,77	-0,09	0,28
Флавины / тропонин I	0,005	-0,60	0,28
Флавины / общ. конц. перекисей	0,43	0,20	0,20

Распределение потока пирувата, координация цикла трикарбоновых кислот и изменение потока электронов в дыхательной цепи осуществля-

ются через сдвиг НАД/НАДН состояния. В ходе настоящего исследования получена сильная обратная корреляционная связь ($r=-0,83$) в группе с интракоронарным введением экзогенного фосфокреатина между Kf НАДН и уровнем общей концентрации органических перекисей на 10 мин реперфузии: в отсутствие дефицита энергии с увеличением сдвига НАД/НАДН в правую сторону уровень продуктов оксидативного стресса снизился. Нами показана возможность использования НАДН как эффективной мишени для метода лазерно-индуцированной флуоресценции, которую возможно принять за основной показатель, отражающий жизнеспособность кардиомиоцитов, и представить оптическую биопсию миокарда достаточно перспективным диагностическим направлением в развитии кардиомониторинга.

Выводы

1. Метод лазерно-индуцированной флуоресценции может непрямым методом определить выраженность ведущего механизма ишемии и реперфузии миокарда: корреляция Kf НАДН с общей концентрацией органических перекисей косвенно показывает уровень повреждений в митохондриях.
2. Оптическая биопсия является перспективным методом диагностики ишемических и реперфузионных повреждений миокарда, что подтверждается сильной корреляционной связью между коэффициентом флуоресценции НАДН и продуктами оксидативного стресса.

Средства на проведение исследования были получены по программе «УМНИК» из Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Исследование выполнено в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шальнова С. А., Деев А. Д. Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение (по данным клинико-эпидемиологических исследований). Территориальный архив. 2011; 1: 7–12.
- Shalnova S. A., Deev A. D. Ishemicheskaya bolezнь serdtsa v Rossii: rasprostranennost i lechenie (po dannym kliniko-epidemiologicheskikh issledovaniy). Territorialnyy arkhiv. 2011; 1: 7–12.
2. Оганов Р. Г., Масленникова Г. Я. Демографические тенденции в Российской Федерации: вклад болезней системы кровообращения. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2012; 11 (1): 5–10.

Oganov R. G., Maslennikova G. Ya. Demographic trends in the Russian Federation: the impact of cardiovascular disease. Cardiovascular Therapy and Prevention, 2012; 11 (1): 5–10. [In Russ.].

3. Kristensen S. D., Laut K. G., Fajadet J., Kaifoszova Z., Kala P., Di Mario C. et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction 2010/2011: current status in 37 ESC countries. European Heart Journal. 2014; 35(29): 1957–1970. DOI: 10.1093.

4. Бокерия Л. А., Гудкова Р. Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2014. Болезни и аномалии системы кровообращения. М., 2015.

Bokeriya L. A., Gudkova R. G. Serdechno-sosudistaya khirurgiya – 2014. Bolezni i anomalii sistemy krovoobrashcheniya. Moscow, 2015.

5. Ардашев В. Н. Возможности объективизации результатов реабилитации больных ИБС после операции аортокоронарного шунтирования. Клиническая медицина. 1998; 10: 23–26.

Ardashev V. N. Vozmozhnosti obektivizatsii rezultatov reabilitatsii bolnykh IBS posle operatsii aortokoronarnogo shuntirovaniya. Klinicheskaya meditsina. 1998; 10: 23–26.

6. Аверина Т. Б. Искусственное кровообращение. Анналы хирургии. 2013; 2: 5–12.

Averina T. B. Iskusstvennoe krovoobrashchenie. Annaly khirurgii. 2013; 2: 5–12.

7. Сайфутдинов Р. Г., Мухаметшина Г. А., Галлямов Н. В. Новые ишемические синдромы: ишемическое preconditionирование, стэннинг и гибернация. Практическая медицина. 2006; 16: 12–14.

Sayfutdinov R. G., Mukhametshina G. A., Gallyamov N. V. Novye ishemicheskie sindromy: ishemicheskoe preconditionirovanie, stanning i gibernatsiya. Prakticheskaya meditsina. 2006; 16: 12–14.

8. Popov A. Y., Salmin V. V., Fursov A. A. et al. Automated laser spectrofluorimeter for monitoring of myocardial metabolism. Proceedings of SPIE. 2006; 6284. DOI: 10.1117/12.714171.

9. Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М., 2010.

Tuchin V. V. Lazery i volokonnaya optika v biomeditsinskikh issledovaniyakh. Moscow, 2010.

10. Козинцев В. И., Белов М. Л., Городничев В. А., Федотов Ю. В. Основы количественного лазерного анализа. М., 2006.

Kozintsev V. I. Belov M. L. Gorodnichev V. A., Fedotov Yu. V. Osnovy kolichestvennogo lazernogo analiza. Moscow, 2006.

11. Сайфутдинов Р. Г. Современное состояние вопроса о биохимических маркерах миокарда. Практическая медицина. 2003; 2: 4–5.

Sayfutdinov R. G. Sovremennoe sostoyanie voprosa o biokhimicheskikh markerakh miokarda. Prakticheskaya meditsina. 2003; 2: 4–5.

12. Азова М. М., Благодяров М. Л., Фролов В. А. Влияние энергетического дефицита и окислительного стресса на апоптоз кардиомиоцитов и гипертрофию миокарда у спонтанно гипертензивных крыс. Кубанский научный медицинский вестник. 2012; 4 (133): 158–161.

Azova M. M., Blagonravov M. L., Frolov V. A. The effect of energy deficiency and oxidative stress on cardiomyocyte apoptosis and myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik. 2012; 4 (133): 158–161. [In Russ.].

13. Богданов М. В., Воронцова Н. Л., Матвеева В. Г., Головкин А. С., Ларионов М. В., Григорьев Е. В. Динамика показателей окислительного стресса и эндогенной интоксикации в венечном синусе и периферической крови у пациентов с ИБС во время аортокоронарного шунтирования. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013; 4: 65–70. DOI: 10.17802/2306-1278-2013-4-65-70.

Bogdanov M. V., Vorontsova N. L., Matveeva V. G., Golovkin A. S., Larionov M. V., Grigoriev E. V. Dynamics of oxidative stress and endointoxication in coronary sinus and peripheral blood from patients coronary artery disease undergoing coronary artery bypass grafting. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2013; 4: 65–70. [In Russ.]. DOI: 10.17802/2306-1278-2013-4-65-70.

Статья поступила 04.02.2016

Для корреспонденции:

Сергеева Евгения Андреевна
Адрес: 650002, Кемерово,
Сосновый бульвар, 6
Тел.: 8 (3842) 64-42-38
E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

For correspondence:

Sergeeva Evgeniya
Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,
650002, Russian Federation
Tel.: +7 (3842) 64-42-38
E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru