

На правах рукописи

САВЧЕНКО

АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

**Некоторые патогенетические особенности
ишемического и реперфузионного
повреждения миокарда**

14.00.16 – патологическая физиология

14.00.06 – кардиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск - 2003

Работа выполнена в Красноярской государственной медицинской академии, Красноярском государственном университете.

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Салмина Алла Борисовна

доктор медицинских наук,
профессор

Шульман Владимир Абрамович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Степовая Елена Алексеевна

доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник

Вечерский Юрий Юрьевич

Ведущая организация:

Новосибирская государственная медицинская академия, г. Новосибирск

Защита состоится «__» _____ 200__ г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Россия, Томск, Московский тр., 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Россия, Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «__» _____ 200__ г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета

доктор медицинских наук, профессор

Бражникова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Ишемическое повреждение миокарда составляет основу большой группы заболеваний сердца, однако представление о патогенезе повреждения клеток как о цепи метаболических и структурных сдвигов, развивающихся в ответ на ишемию и приводящих к гибели кардиомиоцитов, не отличается завершенностью.

Известны два основных варианта клеточной гибели – запрограммированная клеточная гибель (апоптоз) и некроз. Роль апоптоза в кардиопатологии стала изучаться сравнительно недавно [Fliss H. et al., 1996; Galang N. et al., 2000; Сторожаков Г.И. и др., 2000; Kang P.M. et al., 2000; Литвицкий П.Ф., 2002]. Доминирующим представлением является то, что основной механизм гибели кардиомиоцитов в периоде острой ишемии - некроз, а развитие апоптоза возможно [Misao J. et al., 1996; Gill C. et al., 2002], но не определяет тяжести поражения миокарда. Вместе с тем, очевидно, что последствия острой ишемии миокарда, в том числе электрофизиологические нарушения, могут быть патогенетически связаны именно с развитием апоптоза кардиомиоцитов. При хронической коронарной недостаточности апоптоз можно рассматривать как своеобразную адаптационную реакцию на клеточно-тканевом уровне, направленную на элиминирование кардиомиоцитов со значительно контрактильной дисфункцией вследствие их выраженной дисрегенераторной перестройки [Maulik N. et al., 1999; Jiang L. et al., 2003].

Несмотря на доказанную роль окислительного стресса в развитии апоптоза и некроза, его особенности при ишемии и реперфузии миокарда, а также причинно-следственная связь между генерацией свободных радикалов и инициацией процессов клеточной гибели изучены недостаточно [Duranteau J. et al., 1997; Ferrari R. et al., 1998; Зенков Н.К. и др., 1999; Maulik N. et al., 2000].

Одним из мало изученных процессов в патогенезе ишемического повреждения клеток является изменение метаболизма внутриклеточных пиридиновых и флавиновых нуклеотидов, чья концентрация в условиях регионарной ишемии миокарда отражает митохондриальную активность [Jeffrey F.M. et al., 1987; Karmazyn M. et al., 1996; Литвицкий П.Ф., 2002].

Поиск «идеального» биохимического маркера ишемического повреждения клеток миокарда представляет собой одно из актуальных направлений экспериментальной и клинической кардиологии. Диагностическая значимость таких маркеров во многом определяется временем высвобождения их из клеток, тканеспецифичностью, длительностью нахождения маркера в периферическом кровотоке, патогенетической обоснованностью их использования [Panteghini M., 1998].

Существуют попытки использовать флуориметрический анализ (оценка клеточной аутофлуоресценции) для мониторинга состояния тканей в условиях гипоксии *in situ*: гепатоцитов [Obi-Tabot E.T. et al., 1993], нейронов дыхательного центра ствола головного мозга [Mironov S.L. et al., 2001], клеток почек

[Coremans J.M. et al., 2000], а также скелетной мускулатуры *in vivo* [Van-der-Laan L. et al., 1998]. Однако не изучена возможность анализа эндогенных флуорофоров (флавиновые и пиридиновые нуклеотиды), характеризующих функциональную активность и сохранность клеточных структур, а также степень митохондриальной дисфункции при окислительном стрессе [Zago E.V. et al., 2000], во внеклеточной жидкости с целью ранней идентификации метаболических нарушений в ткани, сопровождающих ишемически-реперфузионное воздействие.

Цель работы. Исследовать особенности развития двух вариантов клеточной гибели кардиомиоцитов (апоптоз, некроз) и роль окислительного стресса в ишемическом и реперфузионном поражении миокарда у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) и приобретенными пороками сердца (ППС).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить преобладающий вариант клеточной гибели кардиомиоцитов (апоптоз, некроз) в периодах острой ишемии и реперфузии у больных с ИБС и ППС.
2. Выявить патогенетические особенности апоптоза и некроза кардиомиоцитов у больных с ИБС и ППС при ишемии миокарда и в раннем реперфузионном периоде на фоне предсуществующей хронической гипоксии.
3. Исследовать динамику развития окислительного стресса в кардиомиоцитах на этапах ишемии и реперфузии миокарда.
4. Оценить состояние энергетического гомеостаза и характер повреждения кардиомиоцитов в периодах острой ишемии и реперфузии по анализу пула пиридиновых и флавиновых нуклеотидов плазмы крови.

Положения, выносимые на защиту:

1. Интенсификация процессов гибели кардиомиоцитов характерна для периода реперфузии, но не острой ишемии, при этом преобладающим вариантом клеточной гибели у больных ИБС является апоптоз, у больных с ППС – некроз.
2. Характер предсуществующей хронической гипоксии, определяющий степень выраженности кардиосклероза и гипертрофии миокарда как механизмов ремоделинга, определяет вариант развития клеточной гибели кардиомиоцитов в ишемический и реперфузионный периоды у больных с ИБС и ППС за счет реализации различных механизмов клеточной адаптации.
3. Интенсивность окислительного стресса при острой ишемии и реперфузии миокарда не отличается у больных с ИБС и ППС и максимальна в ранний реперфузионный период.
4. Анализ соотношения ФАД/НАД(Ф)Н в артериальной крови и крови коронарного синуса является дополнительным биохимическим маркером для выявления степени и характера повреждения миокарда при гипоксии и окислительном стрессе.

Научная новизна. В работе впервые систематически изучены патогенетические особенности развития двух видов клеточной гибели кардиомиоцитов: апоптоза и некроза на этапах ишемии и последующей реперфузии миокарда у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) и приобретенными пороками сердца (ППС).

1. Впервые установлено, что интенсификация процессов гибели кардиомиоцитов характерна для периода реперфузии, но не ишемии: у больных ИБС в ответ на реперфузию происходит преимущественно индукция апоптоза, а у больных с ППС – некроза кардиомиоцитов.
2. Впервые показано, что чувствительность кардиомиоцитов к индукции и прогрессии двух вариантов клеточной гибели в ишемический и реперфузионный периоды в значительной степени определяется характером предсуществующего хронического поражения и ремоделинга миокарда.
3. Впервые произведена сравнительная оценка особенностей развития окислительного стресса и изменения редокс-статуса кардиомиоцитов в динамике ишемии и реперфузии миокарда у больных с ИБС и ППС.
4. Впервые метод флуоресцентного анализа плазмы крови (соотношение уровней флуоресценции ФАД и НАД(Ф)Н) использован для мониторинга состояния кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии миокарда.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Научно-теоретическое значение работы заключается в том, что в ней исследованы механизмы адаптации миокарда у больных с ИБС и ППС к действию апоптогенных и некрозогенных факторов (острая ишемия и реперфузия).

Разработана патогенетически обоснованная схема развития ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у больных с ИБС и ППС.

Впервые теоретически обоснована и экспериментально доказана возможность использования флуоресцентного анализа плазмы крови для мониторинга состояния миокарда при ишемии и реперфузии.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на: Юбилейной международной студенческой научно-практической конференции, посвященной 60-летию Красноярской государственной медицинской академии (Красноярск, 2002); конкурсе работ имени проф. И.И. Гительсона в номинации «Лучшая теоретическая работа» (Красноярск, 2002); научной конференции молодых ученых и специалистов Российской Федерации им. академика Б.С. Гракова (Красноярск, 2003); конкурсе научных работ молодых ученых по специальности: «Кардиология» в рамках юбилейного X Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 2003); ежегодной сессии научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН (Москва, 2003); конгрессе кардиологов стран СНГ (Санкт-Петербург, 2003); Международном конгрессе «Высокие технологии XXI века» (Бенидорм, Испания, 2003); совместном заседании проблемных комиссий «Теоретические проблемы медицины» и «Терапия» КрасГМА (Красноярск, 2003).

Полученные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре биохимии с курсом медицинской химии и кафедре внутренних болезней №1 Красноярской государственной медицинской академии.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы и приложений, иллюстрирована 5 таблицами и 21 рисунком. Библиографический указатель включает 146 литературных источников, из них 44 отечественных и 102 иностранных.

Автор выражает слова благодарности кандидату физико-математических наук, доценту кафедры квантовой электроники Красноярского государственного университета Салмину Владимиру Валерьевичу за неоценимый вклад в выполнение представленной работы и возможность определения спектров флуоресценции нуклеотидов в плазме крови; профессору Макото Найто и всем сотрудникам департамента клеточной и молекулярной патологии университета г. Ниигата, Япония за возможность проведения детекции апоптоза методом «TUNEL»; врачу анестезиологу-кардиореаниматологу Фурсову Александру Анатольевичу и всем сотрудникам отделения кардиореанимации Краевого центра интенсивной кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии Краевой клинической больницы №1 г. Красноярск; профессору Самотесову Павлу Афанасьевичу и профессору Горбунову Николаю Станиславовичу, профессору Зыковой Ларисе Дмитриевне и лаборанту Сафиной Зое Григорьевне за возможность проведения патоморфологических исследований и приобретения опыта морфофункционального анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в группе 38 больных, проходивших стационарное лечение в Краевом центре интенсивной кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии Краевой клинической больницы №1 города Красноярск в период с мая 2001 года по март 2002 года. Больные были разделены на 2 группы: в 1 группу вошли 19 пациентов с клиникой хронической ишемической болезни сердца (ИБС), которым были произведены оперативные вмешательства на коронарных артериях; 2 группу составили 19 больных, которым было произведено протезирование клапана по поводу приобретенного порока сердца (ППС).

В группу больных с ИБС вошли пациенты в возрасте от 41 до 65 лет, из которых 16 мужчин и 3 женщины. При этом 16 больных страдали стенокардией напряжения и покоя, возобновляющейся на фоне адекватной лекарственной терапии, 3 больных – нестабильной стенокардией, резистентной к медикаментозному лечению; 18 больных в анамнезе перенесли острый инфаркт миокарда. По данным инструментального исследования, 18 больных имели нарушение сократительной способности миокарда левого желудочка. У всех больных отмечалась гипертрофия левого желудочка, подтвержденная данными

электрокардиографического (ЭКГ), эхокардиоскопического (ЭхоКС) и рентгенологического исследований. У 15 больных по данным ЭхоКС наблюдалась дилатация левого предсердия. Всем больным было произведено мамаро-коронарное шунтирование передней межжелудочковой ветви (МКШ ПМЖВ), 18 больным аортокоронарное шунтирование правой коронарной артерии (АКШ ПКА), 10 больным аортокоронарное шунтирование ветви тупого края (АКШ ВТК) и аортокоронарное шунтирование огибающей ветви (АКШ ОВ), соответственно, 3 больным – аортокоронарное шунтирование первой диагональной ветви (АКШ 1ДВ); при этом количество шунтов составило от 2 до 4.

В группу больных с ППС вошли пациенты в возрасте от 36 до 62 лет, из которых 5 мужчин и 14 женщин. По данным инструментального исследования у 14 больных имелась гипертрофия правого, у 12 больных – левого желудочка. У 12 больных размер левого предсердия по данным ЭхоКС исследования был более 4,6 см. У 10 больных с поражением митрального клапана в равной степени площадь кольца митрального клапана составила от 1,5см² до 1,0см² и от 0,9см² до 0,5см², соответственно, что является критической площадью, т.е. такой, при которой возникают отчетливые нарушения внутрисердечной гемодинамики [Маколкин В.И.,1986]. 14 больным было произведено протезирование митрального, а 5 больным – аортального клапана. Во всех случаях патоморфология удаленного клапана соответствовала картине ревматического процесса.

Все операции проведены в условиях искусственного кровообращения (ИК), в нормотермическом режиме и фармакохолодовой кардиopleгии (ФХКП) официальным препаратом «Консол» антеградно. Временные показатели оперативного вмешательства, включающие общее время ИК, продолжительности интраоперационной окклюзии аорты и времени восстановления сердечной деятельности достоверно не отличались между группами больных ИБС и ППС и составили 113,8±6,14 и 104,9±8,08 мин.; 73,3±5,84 и 77,8±6,39 мин.; 71,5±7,99 и 87,0±19,2 мин., соответственно.

В различные периоды оперативного вмешательства у каждого больного пункционным методом через все миокардиальные слои были взяты 3 кардиобиоптата из ушка правого предсердия в месте канюляции: 1) до проведения подключения аппарата искусственного кровообращения (здесь и далее считается исходным уровнем); 2) в условиях искусственного кровообращения при интраоперационной окклюзии аорты (здесь и далее считается острым ишемическим периодом); 3) после восстановления сердечной деятельности (здесь и далее считается реперфузионным периодом).

Восстановление сердечной деятельности происходило самостоятельно во всех случаях, регистрировалось мониторингом сердечного ритма путем появления желудочкового ритма как филогенетически более раннего с последующим восстановлением синусового ритма.

Схема исследования представлена на рис. 1:

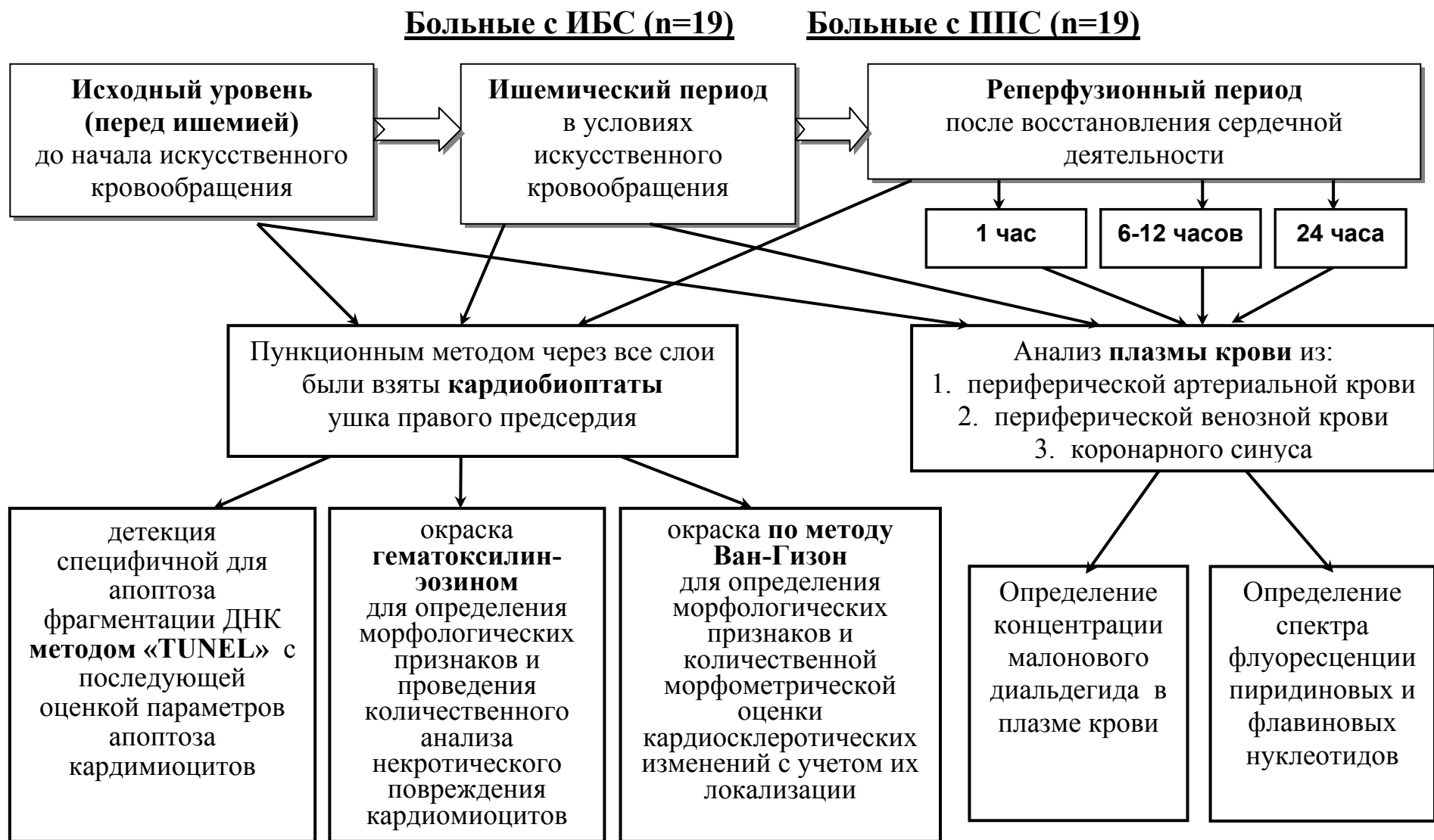


Рис. 1. Общая схема исследования (группы, количественное распределение, материал и методы исследования)

Образцы ткани миокарда фиксировали в нормальном 10% растворе формалина. После фиксации материал тщательно промывали и приготавливали гистологические срезы криостатным способом с использованием охладителя микротомы «ТЕХНОМ ОМТ 0228» в температурном режиме от -20°C до -22°C .

Детекция апоптоза осуществлялась с использованием метода TUNEL с помощью набора ApopTag Peroxidase Kit S7100 ApopTag (Manual Intergen Company, USA). Производилась оценка параметров апоптоза кардиомиоцитов в 5 различных точках гистологического среза с определением средней площади (мкм \times мкм), минимальной и максимальной площади (мкм \times мкм), общей (суммарной) площади апоптотических кардиомиоцитов (мкм \times мкм), абсолютного количества апоптотических кардиомиоцитов на заданную единицу площади ткани (площади оцениваемой фотографии) и расчетом процентного содержания апоптотических кардиомиоцитов на единицу заданной площади, выраженное в площади участков апоптоза, с использованием комплекса «Видео-Тест Морфология – 4,0».

Морфогистологический анализ ткани миокарда осуществлялся после окраски срезов гематоксилин-эозином (по стандартной методике, Автандилов Г.Г., 1994), с целью определения морфологических признаков и проведения количественного анализа некротического повреждения кардиомиоцитов; а также оценки объема мышечной массы миокарда (от общего объема ткани) с использованием окулярной сетки Г.Г. Автандилова. Микроскопическая оценка гистологических препаратов с оценкой *абсолютного количества некротических кардиомиоцитов* по характерным морфологическим признакам осуществлялась в 5 различных участках (квадратах окулярной сетки Г.Г. Автандилова) гистологического среза; и оценкой *площади зон некроза на единицу площади среза* по следующей формуле:

$$S_n = ((X_x 400 \text{ мкм}^2 \times 25(36))/2284230) \times 100\%.$$

Расчет **апоптоз-некротического индекса**, представляющего соотношение уровней апоптотических и некротических кардиомиоцитов, осуществлялся, исходя из значений, полученных при количественной оценке апоптоза и некроза в ткани.

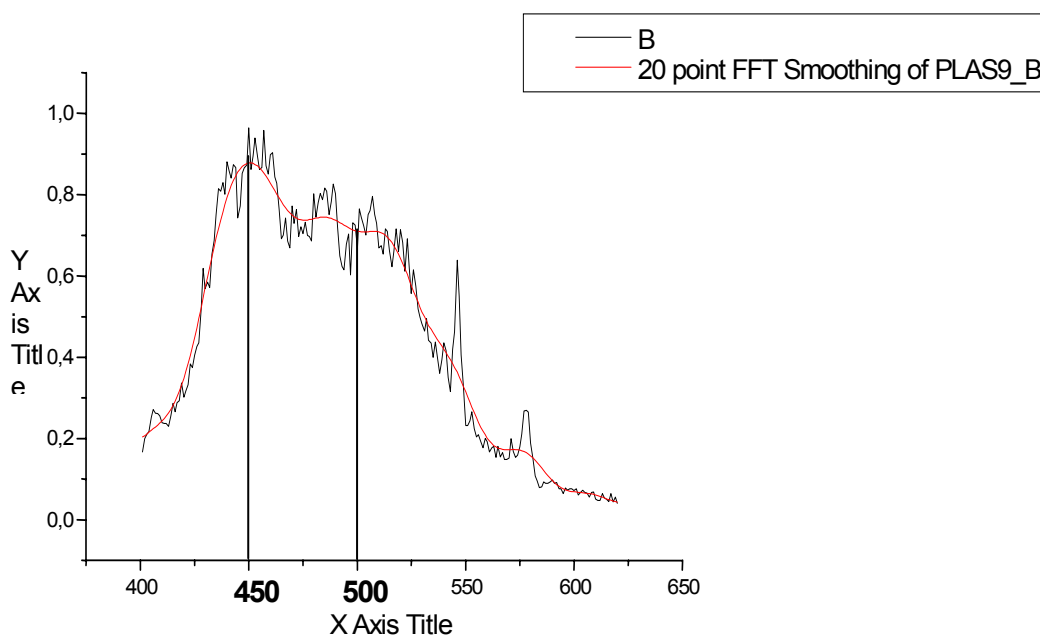
Окраска гистологических срезов пикрофуксином по Ван-Гизону (по стандартной методике, Автандилов Г.Г., 1994) осуществлялась с целью определения морфологических признаков кардиосклеротических изменений в ткани сердца. После окрашивания гистологических препаратов производилась их количественная морфометрическая оценка с использованием окулярной сетки Г.Г. Автандилова и определением *диаметра, интервала и объема* коллагеновых волокон в эпикарде, миокарде и эндокарде, соответственно.

Биохимический и флуоресцентный анализ производили в плазме крови, которую получали путем центрифугирования крови, взятой из периферических артерии, вены и коронарного синуса перед началом вводного наркоза; в момент восстановления сердечной деятельности; через 1 час, 6-12 часов, 24 часа после восстановления сердечной деятельности.

Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) в плазме крови проводили по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [в модификации Андреевой Л.И. с соавт., 1988].

Определение пиридиновых и флавиновых нуклеотидов в плазме крови производилось **методом флуоресцентного анализа**. В основе метода флуоресцентного анализа пиридиновых и флавиновых нуклеотидов лежит аутофлуоресценция восстановленных пиридиновых и окисленных флавиновых нуклеотидов. Для возбуждения флуоресценции использовался азотный лазер ($\lambda = 337$ нм). Излучение лазера заводилось в пробирку с помощью системы сдвоенных световодов, один конец которой присоединялся к лазеру, а другой - к монохроматору МСД-2. Автоматическое сканирование по спектру осуществлялось в диапазоне от 420 до 520 нм. Излучение регистрировалось фотоэлектронным умножителем ФЭУ-39, электрический сигнал с которого подавался на осциллограф и аналого-цифровой преобразователь. Данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Wave Surfer 1.0.4.

Типичный спектр люминесценции нуклеотидов представлен на рис. 2:



450 нм – максимум спектра люминесценции НАД(Ф)Н

500 нм – максимум спектра люминесценции ФАД

Рис. 2. Типичный спектр люминесценции нуклеотидов

Дальнейшая обработка результатов флуоресцентного анализа состояла в определении *параметра ξ* , являющегося количественным критерием для характеристики степени дыхательной активности митохондрий, и равного отношению интенсивностей сигналов на длинах волн 500 нм – отвечающей максимуму спектра люминесценции ФАД, и 450 нм – НАД(Ф)Н, соответственно (Карнаухов, 1976); а также *расчетом реакции метаболических систем R*, равной изменению параметра ξ , отнесенного к его исходному значению [Лисовский В.А., 1984].

Анализ результатов исследований проводили методами математической статистики с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа, *t*-критерия Стьюдента и Т-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная гибель по типу апоптоза и некроза при ишемии и реперфузии миокарда

Оценка исходного уровня площади участков апоптоза кардиомиоцитов, а также исходного уровня абсолютного количества апоптотических кардиомиоцитов не показала достоверных отличий между группами исследуемых больных с ИБС и ППС (табл. 1).

Варианты апоптотической гибели кардиомиоцитов приведены на рис.3 и рис.4:



Рис. 3. Кардиомиоциты с вариантом гибели по типу апоптоза у больного с ИБС окрашены в интенсивно-коричневый цвет, идентификация методом «TUNEL», увеличение 400.



Рис. 4. Кардиомиоциты с вариантом гибели по типу апоптоза у больного с ППС окрашены в интенсивно-коричневый цвет, идентификация методом «TUNEL», увеличение 400.

Анализ исходного уровня кардиомиоцитов с вариантом гибели по типу некроза также показал отсутствие достоверных отличий между группами больных с ИБС и ППС, соответственно (табл. 2).

Вариант некротической гибели кардиомиоцитов приведен на рис.5:

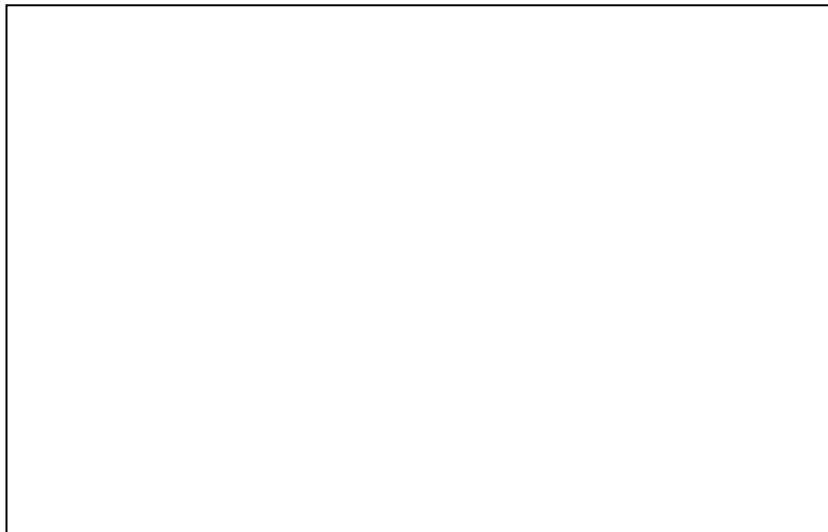


Рис.5. Миокард с участками некроза у больного ИБС

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 400.

Видны контуры безъядерных кардиомиоцитов слабо-розовой окраски.

Следовательно, хроническая гипоксия является как апоптогенным, так и некрозогенным фактором в отношении кардиомиоцитов вне зависимости от группы исследуемых больных, что находит свое отражение в присутствии апоптотических и некротических кардиомиоцитов у больных с клиникой ИБС и ППС до начала острого ишемического воздействия.

Несмотря на отсутствие различий в выраженности процессов апоптоза и некроза исходно, кардиомиоциты исследуемых групп больных продемонстрировали разную степень чувствительности к апоптоз- и некроз-индуцирующему эффекту острой ишемии и реперфузии.

Так, в период ишемии в миокарде больных ИБС абсолютное количество TUNEL⁺ кардиомиоцитов не менялось, однако в периоде реперфузии достоверно увеличивалось (табл. 1). При этом реперфузия в группе больных с ИБС вызвала уменьшение абсолютного количества некротических кардиомиоцитов (табл. 2), а, следовательно, и увеличение апоптоз-некротического индекса в 2,77 раза от исходного уровня (рис.6). Таким образом, именно реперфузия является апоптогенным фактором у больных ИБС.

В группе больных с ППС в периоде острой ишемии уровень апоптоза кардиомиоцитов не изменялся, а реперфузия сопровождалась уменьшением суммарной площади апоптотических кардиомиоцитов (табл. 1). Обращает на себя внимание динамика уровня некроза в миокарде у больных с ППС, которая изменялась двухфазно: в период ишемии наблюдалось достоверное снижение абсолютного количества некротических кардиомиоцитов, в то время как в период

реперфузии происходило увеличение количества кардиомиоцитов с морфологическими признаками некроза (табл. 2).

Таблица 1.

Содержание апоптотических кардиомиоцитов на этапах ишемического и реперфузионного воздействия в группах больных с ИБС и ППС.

	периоды					
	исходно		ишемия		реперфузия	
	площадь участков апоптоза (% от общей площади среза)	абсолютное количество апоптотических КМЦ	площадь участков апоптоза (% от общей площади среза)	абсолютное количество апоптотических КМЦ	площадь участков апоптоза (% от общей площади среза)	абсолютное количество апоптотических КМЦ
ИБС (n=19)	1,52±0,51	6,91±1,76	1,44±0,22	5,8±1,73	1,16±0,26	7,16±2,16 ^a
ППС (n=19)	2,21±0,69	5,31±1,31	1,46±0,54	5,62±1,47	0,65±0,18 ^b	5,96±0,79

Примечание: ^a p<0,05 при расчете абсолютного количества апоптотических кардиомиоцитов в период реперфузии в группе больных ИБС от периода ишемии.

^b p<0,05 при расчете площади участков апоптоза в период реперфузии в группе больных ППС от исходного уровня.

Таблица 2.

Содержание некротических кардиомиоцитов на этапах ишемического и реперфузионного воздействия в группах больных с ИБС и ППС.

	периоды					
	исходно		ишемия		реперфузия	
	площадь участков некроза (% от общей площади среза)	абсолютное количество некротических КМЦ	площадь участков некроза (% от общей площади среза)	абсолютное количество некротических КМЦ	площадь участков некроза (% от общей площади среза)	абсолютное количество некротических КМЦ
ИБС (n=19)	4,62±0,84	4,4±0,87	4,26±0,26	4,1±0,88	2,9±0,88	1,64±0,5 ^c
ППС (n=19)	4,35±1,01	2,78±0,5	2,8±0,41	1,59±0,23 ^d	3,55±1,32	2,65±0,38 ^e

Примечание: ^c p<0,05 при расчете абсолютного количества некротических кардиомиоцитов в период реперфузии в группе больных с ИБС от периода ишемии;

^c p<0,01 при расчете абсолютного количества некротических кардиомиоцитов в период реперфузии в группе больных с ИБС от исходного уровня;

^d p<0,05 при расчете абсолютного количества некротических кардиомиоцитов в период ишемии в группе больных с ППС от исходного уровня.

^e p<0,05 при расчете абсолютного количества некротических кардиомиоцитов в период реперфузии в группе больных с ППС от периода ишемии.

При этом, в группе больных с ППС отмечалась следующая динамика апоптоз-некротического индекса: увеличение в период ишемии с последующим снижением в период реперфузии (рис. 6). Следовательно, реперфузия миокарда в группе больных с ППС является некрозогенным фактором в отношении кардиомиоцитов.

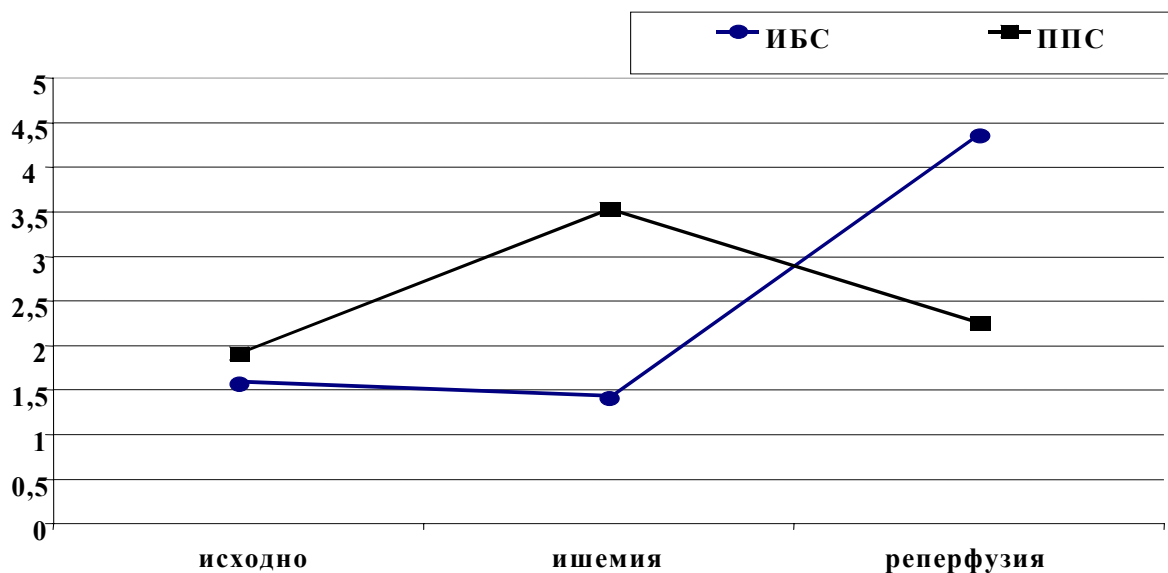


Рис. 6. Динамика апоптоз-некротического индекса у больных с ИБС и ППС на этапах ишемии и реперфузии миокарда.

Ранее было показано, что реперфузия приводит к развитию апоптоза значительно быстрее, чем собственно ишемия, при этом количество апоптотических кардиомиоцитов прогрессивно нарастает с течением времени [Maulik N. et al., 1999]. Однако, несмотря на то, что основные проявления апоптоза определяются уже в периоде реперфузии, вероятно сигнал к развитию апоптоза инициируется в течение ишемии. Так, известно, что транслокация фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина на внешнюю поверхность плазматической мембраны возникает уже в периоде ишемии, хотя фрагментация ДНК становится очевидна только в периоде реперфузии [Maulik N. et al., 1999]. С учетом этого обстоятельства, регистрируемые нами методом TUNEL процессы запрограммированной клеточной гибели отражают терминальные события в развитии апоптоза, что не исключает вероятности инициации этих процессов уже в периоде ишемии у больных ИБС.

Обнаруженные динамические изменения количества апоптотических и некротических кардиомиоцитов могут быть интерпретированы с учетом данных о механизмах элиминации погибших клеток: ранняя реперфузия способна "очищать" ткань от поврежденных клеток, активируя механизм апоптоза в прекоммитированных клетках и активируя нейтрофилы и тканевые макрофаги [Fliss H., 1996].

Альтерация и адаптация кардиомиоцитов при хронической гипоксии

Исходные уровни апоптоза и некроза кардиомиоцитов, оцененные перед началом острой интраоперационной ишемии, характеризуют события, являющиеся результатом действия на клетки хронической гипоксии у больных с ИБС и ППС. Хотя скоро исходные уровни запрограммированной и патологической клеточной гибели в миокарде этих больных достоверно не отличались, но острая ишемия и реперфузия продемонстрировали разную эффективность в плане индукции апоптоза и некроза у больных исследуемых групп, мы предположили, что одной из причин этого может быть характер протекания реакций долгосрочной адаптации кардиомиоцитов к гипоксии.

Для идентификации роли хронической гипоксии в изменении чувствительности клеток к индукции различных вариантов клеточной гибели мы исследовали кардиосклеротические изменения (рис.7), возникающие в результате хронической коронарогенной и некоронарогенной ишемии.

Исследование кардиобиоптатов, проведенное нами, с анализом диаметра, интервалов и объема коллагеновых волокон эндо-, мио- и эпикарда выявило достоверное увеличение диаметра и объема, а также уменьшение интервала коллагеновых волокон в мио- и эпикарде у больных с ИБС, в сравнении с группой больных с ППС, у которых указанные изменения преобладали в эпикарде (табл. 3).

При гистологическом исследовании кардиобиоптатов с анализом объема мышечной массы выявлено достоверное увеличение объема мышечной массы миокарда (от общего объема ткани) у больных с ИБС в 1,2 раза, что составило $58,0 \pm 4,01\%$, в сравнении с $47,6 \pm 3,09\%$ в группе больных с ППС, соответственно.



Рис. 7. Миокард с участками склероза у больного ИБС.

Окраска по Ван-Гизон, увеличение 400.

Кардиомиоциты замещены разросшейся соединительной тканью, в которой преобладают грубые коллагеновые волокна.

Показатели морфогистологического анализа коллагеновых волокон
кардиобиоптатов больных с ИБС и ППС

показатель	группа больных	ЭНДОКАРД	МИОКАРД	ЭПИКАРД
Диаметр (мкм)	ИБС (n=19)	4,56±0,66	6,5±1,39*	7,0±0,43***
	ППС (n=19)	5,75±0,53	3,75±0,42	4,25±0,38
Объем мышечной массы миокарда (% от общего объема ткани)	ИБС (n=19)	59,33±5,92*	44,6±7,2***	64,6±3,2***
	ППС (n=19)	72,0±2,0*	16,0±2,21	33,0±3,35
Интервал (мкм)	ИБС (n=19)	6,0±0,9*	5,17±1,1	4,58±0,44
	ППС (n=19)	3,5±0,41	10,5±0,73***	6,5±0,41*

Примечание: достоверность различий * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (расчет производился в каждой выбранной категории (эндо-, мио-, эпикард) между группами исследуемых больных).

Известно, что апоптоз возникает преимущественно в зонах, окружающих участки кардиосклероза и связан с процессами фиброза [Swynghedauw B., 1999], развивающегося вследствие гемодинамических нарушений [Maulik N. et al., 1999]. Следовательно, более выраженное развитие кардиосклеротических изменений в миокарде больных ИБС свидетельствует о большей интенсивности клеточной гибели под действием хронической ишемии коронарогенного генеза.

Таким образом, особенности ремоделинга миокарда у больных с ИБС, включающие преобладание кардиосклеротических изменений и более выраженные процессы гипертрофии миокарда, подтвержденные результатами клинического, инструментального и морфогистологического исследований, приводят к развитию адаптации кардиомиоцитов больных ИБС к воздействию острой гипоксии с реализацией программы апоптоза в прекоммитированном пуле кардиомиоцитов в реперфузионный период. Недостаточная выраженность гипертрофии и, следовательно, сопутствующих адаптивных процессов определяет степень повреждения кардиомиоцитов и преимущественную индукцию процессов некроза в период реперфузии миокарда у больных с ППС.

Следовательно, чувствительность кардиомиоцитов к индукции и развитию различных типов клеточной гибели в значительной степени определяется характером предсуществующего хронического поражения миокарда.

Оценка окислительного стресса на этапах ишемии и реперфузии миокарда

По данным ряда авторов, реперфузия миокарда ассоциирована с развитием окислительного стресса, перегрузкой клеток кальцием, потерей мембраной фосфолипидов. Эти же 3 фактора играют ключевую роль в развитии процессов апоптотической гибели [Maulik N. et al., 1999].

В результате проведенного нами анализа роли окислительного стресса в патогенезе реперфузионных повреждений клеток миокарда не было выявлено отличий между группами исследуемых больных. Вместе с тем, обнаружена динамика концентрации МДА (продукта перекисного окисления липидов мембран) в крови коронарного синуса. В частности, интересным представляется тот факт, что интенсивность окислительного стресса, оцениваемая по уровню МДА, имела максимум к 1 часу после восстановления сердечной деятельности ($p < 0,05$): концентрация МДА в плазме крови составила $44,08 \pm 3,76$ мкмоль/л, с последующим возвращением к исходному уровню в течение 24 часов до $30,64 \pm 5,04$ мкмоль/л.

Следовательно, в ранний реперфузионный период, соответствующий 1 часу реперфузии, наблюдается максимальная активность свободно-радикальных механизмов. Отсутствие достоверных различий по этому показателю между двумя группами больных может свидетельствовать о том, что генерация свободных радикалов в периоде реперфузии не влияет на вид клеточной гибели, которая была инициирована в ишемическом периоде.

Оценка степени и характера повреждения кардиомиоцитов с помощью флуоресцентного анализа нуклеотидов плазмы крови

Известно, что важным событием в процессе апоптотической гибели признается нарастающая митохондриальная дисфункция, приводящая к нарушению продукции АТФ в клетках, генерации значительного количества свободных радикалов, открытию мегаканалов митохондриальной проницаемости (*MPT* - *mitochondrial permeability transition*) с последующим высвобождением в цитоплазму цитохрома *c* и активацией каспаз и апоптоз-индуцирующего фактора [Bernardi P., 1999]. Митохондрии являются и основным источником свободных радикалов при окислительном стрессе в кардиомиоцитах [Cai J., 1998].

Для оценки митохондриальной активности мы использовали метод регистрации эндогенной флуоресценции флавиновых и пиридиновых нуклеотидов в плазме крови у больных с ИБС и ППС в динамике ишемического и реперфузионного периодов.

В ходе исследования нами получены данные, свидетельствующие о том, что различий между группами исследуемых больных в уровне пиридиновых и флавиновых нуклеотидов в плазме крови не наблюдается, что подтверждает неспецифичность изменений метаболизма нуклеотидов наравне со свободно-радикальными механизмами повреждения клеток в группах больных с ИБС и ППС. Таким образом, анализ этих двух параметров как показателей митохондриальной дисфункции кардиомиоцитов позволяет сделать вывод об отсутствии

патогенетически значимых различий в характере нарушения функции митохондрий в клетках миокарда больных с ИБС и ППС на фоне действия высокоинтенсивного повреждающего фактора – острой ишемии с последующей реперфузией. Одновременно это свидетельствует о существенном вкладе нарушений окислительно-восстановительного и энергетического гомеостаза в развитие повреждения кардиомиоцитов.

Нами было выявлено максимальное достоверное возрастание параметра ξ , отражающего соотношение окисленных флавиновых и восстановленных пиридиновых нуклеотидов в крови коронарного синуса в ранний реперфузионный период, соответствующий 1 часу восстановления сердечной деятельности, и отсрочено – к 6-12 часам реперфузионного периода в артериальной крови с последующим снижением (как и в случае с МДА) значения параметра ξ к 24 часам реперфузионного периода (табл. 4).

Однонаправленная динамика также наблюдалась и при анализе интенсивности реакции метаболических систем R.

Таблица 4.

Соотношение уровней флавиновых ФАД и пиридиновых НАД(Ф)Н нуклеотидов, выраженное в параметре ξ при ишемии и реперфузии миокарда

	Исходно (n=38)	Восстановление сердечной деятельности (n=38)	60 минут реперфузионн ого периода (n=38)	6-12 часов реперфузионн ого периода (n=38)	24 часа реперфузионн ого периода (n=38)
Артерия	0,553±0,037	0,613±0,034*	0,603±0,024*	0,621±0,029**	0,551±0,037
Вена	0,623±0,019	0,589±0,039	0,596±0,032	0,625±0,029	0,614±0,029
Коронар ный синус		0,609±0,033	0,659±0,026**	0,594±0,039	0,501±0,045*

Примечание: достоверность различий *p<0,05; **p<0,01 (при расчете по сравнению с исходным уровнем в артериальной крови; и по сравнению с периодом восстановления сердечной деятельности в крови коронарного синуса).

Однонаправленные изменения содержания флавиновых и пиридиновых нуклеотидов, зарегистрированные в плазме крови коронарного синуса и, в более отсроченный период, в артериальной крови, подтверждают миокардиальное происхождение нуклеотидов и возможность мониторинга степени сохранности митохондрий клеток по эндогенной флуоресценции плазмы крови.

Появление нуклеотидов в крови коронарного синуса и в артериальной крови в период реперфузии возможно вследствие некроза. При этом начальная стадия цитолиза может сопровождаться преимущественным активным высвобождением непрочных связанных с клеточными белками пиридиновых нуклеотидов, тогда как необратимое разрушение мембран вызывает выход во внеклеточное пространство флавопротеинов. Таким образом, значительное увеличение флуоресценции ФАД в первый час после восстановления сердечной деятельности, вероятно, отражает

массивную гибель клеток (некроз) в ранний реперфузионный период, сопровождающийся интенсивным окислительным стрессом.

Регистрируемое нами увеличение параметра ξ свидетельствует также и об окислении пула восстановленных пиридиновых нуклеотидов в ранний реперфузионный период и, следовательно, активации МРТ-комплекса с последующим запуском программы апоптоза.

Известно, что соотношение окисленных и восстановленных пиридиновых нуклеотидов является фактором, регулирующим активность МРТ-комплекса мембраны митохондрий [Zago E.B., 2000]. Коль скоро активация МРТ-комплекса происходит при развитии апоптоза, а его инактивация связана с восстановлением функции кардиомиоцитов в период реперфузии [Halestrap A.P., 1998], оценка параметров флуоресценции ФАД и НАД(Ф)Н в артериальной крови и крови коронарного синуса имеет значение в плане прогнозирования развития постишемических нарушений деятельности сердца.

Таким образом, патогенез реперфузионного повреждения кардиомиоцитов включает в себя развитие интенсивного окислительного стресса (что предшествует аккумуляции восстановленных пиридиновых нуклеотидов), митохондриальной дисфункции клеток и запуск программы апоптоза, при этом в ранний реперфузионный период при восстановлении сердечной деятельности происходит необратимое разрушение мембран кардиомиоцитов – некроз, вызывающий выход во внеклеточное пространство флавопротеинов, регистрируемый нами. К 24 часу реперфузионного периода, в результате снижения интенсивности окислительного стресса происходит инактивация МРТ-комплекса митохондрий, а, следовательно, и торможение процессов апоптотической гибели кардиомиоцитов.

Следовательно, исследование артериальной крови и крови коронарного синуса значимо для оценки состояния миокарда: период, непосредственно предшествующий или соответствующий гибели кардиомиоцитов, ассоциирован с возрастанием параметра ξ и интенсивности реакции метаболических систем R. При этом ни уровень МДА, ни значение параметра ξ , ни интенсивность реакции метаболических систем R не являются патогномичными показателями, т.к. они не отличаются у больных с ИБС и ППС.

На основании вышеприведенных данных нами были разработаны и предложены схемы особенностей патогенеза ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у больных с ИБС и ППС (рис. 8).

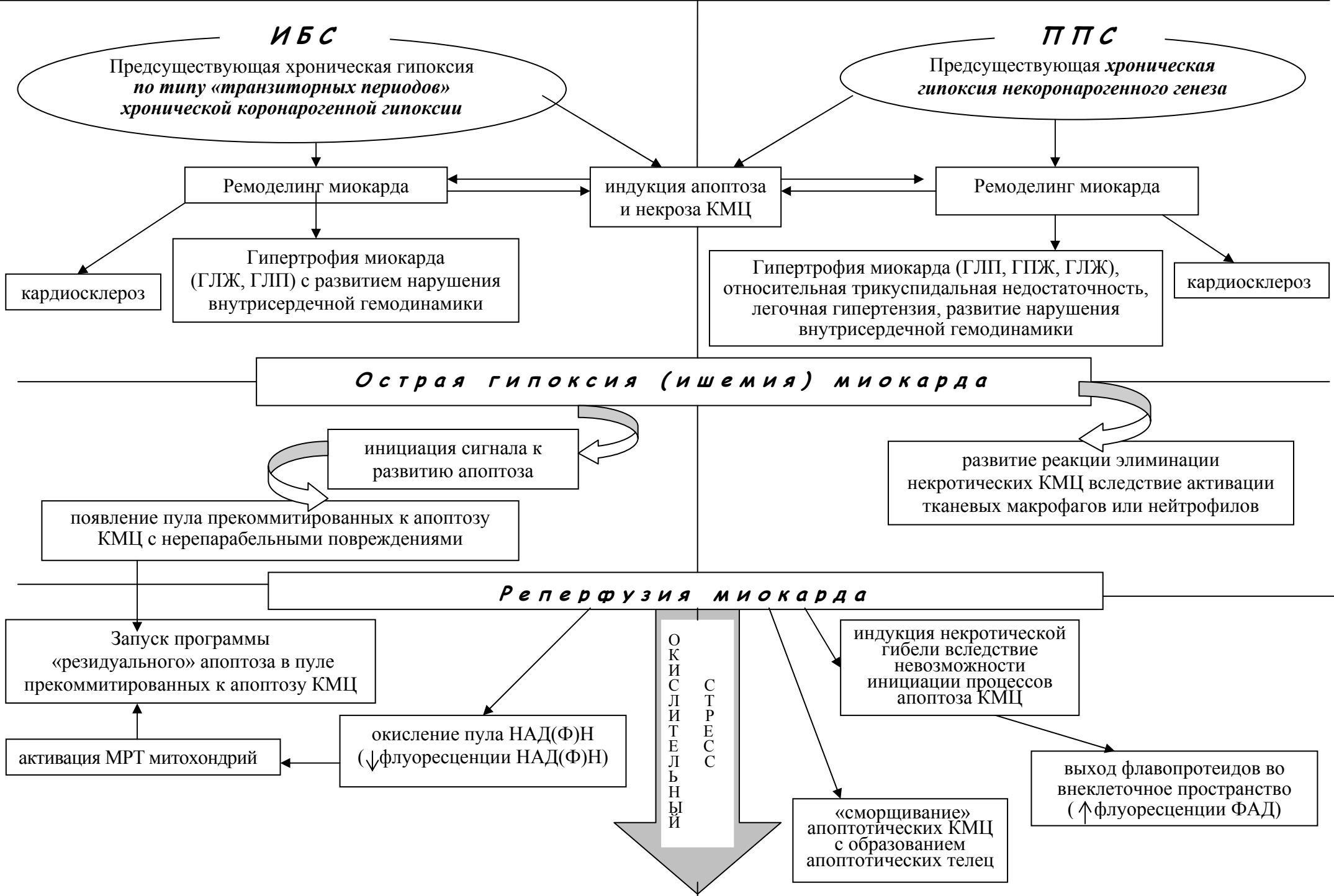


Рис. 8 Схема патогенеза ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у больных с ИБС и ППС.

ВЫВОДЫ:

1. Интенсификация процессов гибели кардиомиоцитов характерна для периода реперфузии, но не острой ишемии. В результате реперфузионного воздействия преобладающим вариантом клеточной гибели кардиомиоцитов у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) является апоптоз, у больных с приобретенными пороками сердца (ППС) – некроз.
2. Предсуществующая хроническая гипоксия приводит к ремоделингу миокарда, степень выраженности которого определяет чувствительность кардиомиоцитов к индукции того или иного варианта клеточной гибели при острой ишемии и реперфузии миокарда.
3. Степень выраженности окислительного стресса при острой ишемии и реперфузии миокарда не имеет существенных отличий у больных с ИБС и ППС. Окислительный стресс проявляет максимальную интенсивность к 1 часу реперфузионного периода, с последующим ее снижением в течение 24 часов.
4. Изменения спектра флуоресценции флавиновых и пиридиновых нуклеотидов при острой ишемии и реперфузии миокарда регистрируются в плазме крови коронарного синуса и артериальной, но не венозной крови, в одинаковой степени у больных с ИБС и ППС. При этом, увеличение соотношения флуоресценции окисленных флавиновых и восстановленных пиридиновых нуклеотидов характерно для 1 часа периода реперфузии, с последующим снижением этого параметра к 24 часу, что позволяет использовать его в качестве дополнительного маркера для мониторинга состояния миокарда.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Михуткина С.В. Pathogenesis of plasma membrane blebbing induced by chemical and physical agents / Михуткина С.В., Ставитцкая Е.Ю., Савченко А.С. // 9-ый Симпозиум Японо-Российского фонда медицинского обмена: Итог. сб. – Канадзава, Япония, 2001. – С. 213.
2. Фурсов А.А. Особенности патогенеза интраоперационной ишемии миокарда при операциях на сердце / Фурсов А.А., Салмина А.Б., Савченко А.С. // 60 лет на службе охраны здоровья. – Красноярск, 2002. – С. 161-167.
3. Савченко А.С. Окислительный стресс и апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда / Савченко А.С. // Актуальные вопросы медицины и новые технологии – 2003: Сб. научных работ, посв. акад. Б.С. Гракову. – Красноярск, 2003. – С. 219-225.
4. Фурсов А.А. Новые аспекты оценки эффективности кардиоплегических растворов / Фурсов А.А., Салмина А.Б., Савченко А.С. и др.// Ежегодная сессия научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева: Бюлл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2003. – Т.4. – №6. – С. 119.
5. Салмина А.Б. Механизмы экстернализации фосфатидилсерина и блеббинга при апоптозе, индуцированном действием мембранотоксических ксенобиотиков /

Салмина А.Б., Михуткина С.В., Савченко А.С. // X Российско-Японский международный медицинский симпозиум «Якутия - 2003»: Тез. докл. – Якутск, 2003. – С. 146-147.

6. Салмина А.Б. Оценка редокс-статуса кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии у кардиохирургических больных / Салмина А.Б., Фурсов А.А., Савченко А.С. // Конгресс кардиологов стран СНГ: Тез. докл. конгресса. – СПб., 2003. – С. 254.
7. Фурсов А.А. Развитие запрограммированной клеточной гибели кардиомиоцитов в динамике ишемии и реперфузии при кардиохирургическом вмешательстве / Фурсов А.А., Акулов В.Ю., Савченко А.С. // Конгресс кардиологов стран СНГ: Тез. докл. конгресса. – СПб., 2003. – С. 297.
8. Савченко А.С. Особенности патогенеза запрограммированной клеточной гибели кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии миокарда / Савченко А.С., Фурсов А.А., Горбунов Н.С. // Сибирское мед. обозрение. – 2003, №2-3. – С. 7-13.
9. Фурсов А.А. Влияние кардиоплегического раствора «Консол» на развитие апоптоза кардиомиоцитов при кардиохирургическом вмешательстве / Фурсов А.А., Салмина А.Б., Савченко А.С. // Высокие технологии XXI века: Тез. докл. междунар. конгресса – Бенидорм, Испания, 2003. – С.30.
10. Салмина А.Б. Динамика редокс-статуса кардиомиоцитов у кардиохирургических больных при защите миокарда кардиоплегическим раствором «Консол» / Салмина А.Б., Фурсов А.А., Савченко А.С. // Высокие технологии XXI века: Тез. докл. междунар. конгресса – Бенидорм, Испания, 2003. – С.29.

Список сокращений:

АКШ 1ДВ – аортокоронарное шунтирование первой диагональной ветви

АКШ ВТК – аортокоронарное шунтирование ветви тупого края

АКШ ОВ – аортокоронарное шунтирование огибающей ветви

АКШ ПКА – аортокоронарное шунтирование правой коронарной артерии

ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка

ГЛП – гипертрофия левого предсердия

ГПЖ – гипертрофия правого желудочка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИК – искусственное кровообращение

КМЦ – кардиомиоцит

МДА – малоновый диальдегид

МКШ ПМЖВ – мамаро-коронарное шунтирование передней межжелудочковой ветви

НАД(Ф) – никотинамидадениндинуклеотид (фосфат)

НАД(Ф)Н – никотинамидадениндинуклеотид (фосфат) восстановленный

ППС – приобретенные пороки сердца

ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФХКП – фармакохолодовая кардиоплегия

ЭКГ – электрокардиография

ЭхоКС – эхокардиоскопия

МРТ (*mitochondrial permeability transition*) – канал митохондриальной проницаемости (комплекс, сформированный в участке контакта между внутренней и наружной митохондриальными мембранами)

Для заметок: