

**В.Ф. Сагач, В.Б. Максименко, А.В. Дмитрієва,
Ю.О. Бубнова, А.Ю. Богуславський, Г.В. Книшов**

Ранній маркер пошкодження міокарда при ішемії–реперфузії серця у собак і при операціях зі штучним кровообігом у людей

Клинико-експериментальное исследование было проведено у 11 пациентов в ходе операций с использованием искусственного кровообращения и кровяной кардиоплегии, и на 9 наркотизованных собаках с проведением моделирования ишемии–реперфузии миокарда. Одновременно с регистрацией показателей работы сердца и гемодинамики спектрофотометрически определяли митохондриальный фактор в венозной крови из правого предсердия. В крови выявлено значительное повышение оптической плотности поглощения. Во время операций с искусственным кровообращением, в период реперфузии уровень митохондриального фактора также увеличивался почти втрое в сравнении с контролем. Его максимальное значение коррелировало с частотой и тяжестью послеоперационных нарушений сердечного ритма, степенью выраженности гипоксии миокарда, а также с биохимическими показателями повреждения ткани. Таким образом, в экспериментальных и в клинических условиях ишемия миокарда сопровождалась активацией митохондриальной поры, что приводило к реперфузионным повреждениям миокарда и высвобождению митохондриального фактора. Методика его определения дает возможность предлагать митохондриальный фактор в качестве раннего маркера ишемических повреждений, а также открывания митохондриальной поры in vivo.

ВСТУП

Раннє виявлення ішемічних пошкоджень міокарда – це важлива прогностична ознака, яка забезпечує своєчасність та ефективність відновлювальних заходів. Тривалий час у діагностиці ішемічних пошкоджень міокарда широко використовувалося визначення у крові рівня активності таких ферментів, як креатинфосфокіназа (КФК), лактатдегідрогеназа (ЛДГ), а також аспаратамінотрансфераза (АСТ). Для більш точної діагностики пошкодження міокарда нині використовують визначення вмісту міокардіальної фракції КФК – мв-фракції КФК, міоглобіну, тропоніну Т та І [6]. Накопичені за останні роки дані в галузі фізіології, біохімії та біофізики вказують на

виключну роль мітохондрій у розвитку реперфузійних і токсичних уражень серцево-судинної системи [7, 8]. Ключовою ланкою в механізмі розвитку таких пошкоджень може бути утворення та відкриття митохондріальних пор (МП) транзиторної проникності, які впливають на метаболізм клітини та є визначальними у розвитку апоптозу або некрозу тканин [9, 10, 11]. За розробленою у відділі фізіології кровообігу методикою спектрофотометричного визначення відкриття МП з вивільнення у відтікаючий від ішемізованої тканини сольовий розчин митохондріального фактора проводились експерименти на ізольованому серці, міокардіальній трабекулі та судинних смужках, в яких було показано, що кількість цього фактора тісно корелює зі ступенем

© В.Ф. Сагач, В.Б. Максименко, А.В. Дмитрієва, Ю.О. Бубнова, А.Ю. Богуславський, Г.В. Книшов

пошкодження ішемізованої тканини. Було запропоновано використовувати мітохондріальний фактор як маркер такого пошкодження [1, 2, 4, 5]. Виходячи з цього, метою нашої роботи стало визначення фактора, який вивільнюється з мітохондрій протягом періоду ішемії та реперфузії міокарда у людини. Клінічне дослідження було проведено в Інституті серцево-судинної хірургії ім. М.М.Амосова АМН України під час операцій з протезування клапанів серця з використанням штучного кровообігу. Експериментальну частину дослідження проводили в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця на собаках.

МЕТОДИКА

В експериментах на 9 наркотизованих собаках під хлоралозо-уретановим наркозом (0,05 та 0,5 г/кг, внутрішньовенно) з премедикацією кетаміном (5 мг/кг, внутрішньом'язово) було проведено моделювання ішемії–реперфузії міокарда з катетеризацією коронарних артерій без розтину грудної клітки та їх аутоперфузією кров'ю з підключичної артерії. Тривалість ішемії міокарда в басейні однієї з гілочок лівої коронарної артерії становила 1 год, час реперфузії також 1 год. Під час досліду реєстрували наступні показники: артеріальний тиск, коронарний кровотік за допомогою електромагнітного флоуметра, тиск у лівому шлуночку ($P_{\text{лш}}$), його першу похідну (dP/dt), тиск у легеневій артерії за допомогою тензодатчика, а також розраховували показники скорочувальної активності міокарда (dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , індекс Верагута [12], індекс розслаблення [3]), коронарний опір, опір легеневих судин і діастолічну жорсткість міокарда лівого шлуночка [8]. Паралельно з реєстрацією показників роботи серця та гемодинаміки спектрофотометрично визначали вміст мітохондріального фактора у пробах венозної крові, яка була зібрана з правого передсердя через катетер у яремній вені. Оптичну густину поглинання вимі-

рювали за допомогою спектрофотометра СФ-46 в ультрафіолетовому діапазоні спектра при довжині хвилі 230–260 нм. Для контролю використовували проби крові, які були взяті до початку ішемізації міокарда. Дослідження проводили згідно з вимогами Європейської конвенції з захисту хребетних тварин (Страсбург, 1985).

Клінічне обстеження з визначення мітохондріального фактора було проведено у 11 пацієнтів під час операцій з використанням штучного кровообігу та кров'яної кардіоплегії. Методика проведення дослідження відповідала Гельсинській декларації 1975 р. та її перегляду 1983 р. Вік хворих був від 31 до 63 років. Тривалість операції становила 4 год ($40 \text{ хв} \pm 21 \text{ хв}$), штучний кровообіг підтримували 2 год ($30 \text{ хв} \pm 8 \text{ хв}$), тривалість кардіоплегії 1 год ($46 \text{ хв} \pm 9 \text{ хв}$). Проби змішаної венозної крові з правого передсердя брали на різних етапах штучного кровообігу: кардіоплегії та реперфузії. Як контроль використовували проби крові, зібрані перед зупинкою серця та підключенням апарата штучного кровообігу (АШК). Для оцінки роботи серця пацієнтам проводили електрокардіографічне, ехокардіографічне дослідження в до- і післяопераційний період, а також визначали в крові вміст ферментів, що звичайно використовуються в клініці для визначення пошкодження міокарда: КФК, мвКФК, ЛДГ, АСТ.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідах на собаках показано, що оклюзія однієї з гілочок лівої коронарної артерії та наступна реперфузія призводили до суттєвого зниження коронарного кровотоку та скорочувальної активності міокарда (рис. 1). $P_{\text{лш}}$ знижувався зі $123,7 \pm 10$ до 105 мм рт.ст. $\pm 9,8$ мм рт.ст. ($P < 0,05$) наприкінці ішемії та залишався нижчим від контролю протягом реперфузії. dP/dt_{max} і dP/dt_{min} протягом реперфузії знизилися на $34 \pm$

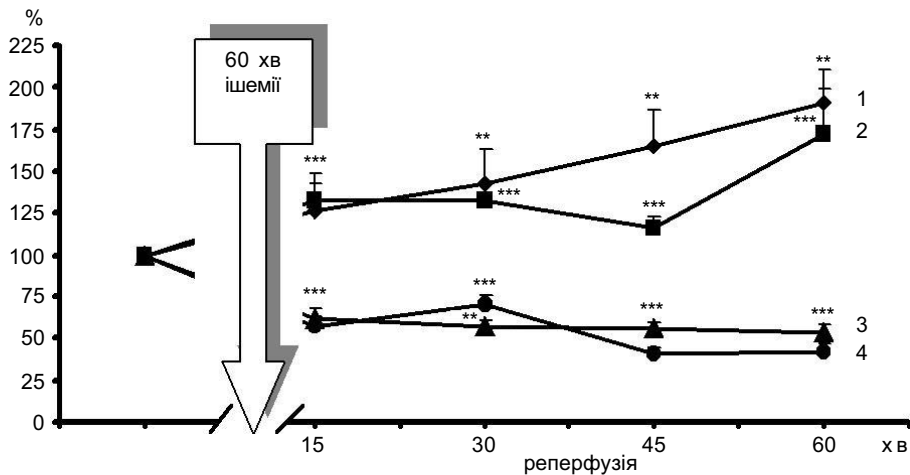


Рис. 1. Зміни коронарного кровообігу та скоротливості міокарда при реперфузії ішемізованого серця собаки: 1 – жорсткість міокарда, 2 – коронарний опір, 3 – індекс скоротливості (індекс Верагута), 4 – коронарний кровоток. Тут і на рис. 2–4 * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ відносно контролю

3,1 і 48,4 % \pm 4,6 % відносно вихідних значень. Індекс Верагута знижувався з 57,1 \pm 5,4 до 30,6 $\text{с}^{-1} \pm 2,9 \text{с}^{-1}$ ($P < 0,01$), а індекс розслаблення – з 25,0 $\pm 1,9$ до 18,4 ум. од. $\pm 1,9$ ум. од. ($P < 0,05$). Протягом реперфузійного періоду було виявлено значне підвищення діастолічної жорсткості міокарда з 0,23 $\pm 0,03$ до 0,44 мм рт. ст./мл $\pm 0,05$ мм рт.ст./мл ($P < 0,05$) і подальше зниження

коронарного кровотоку з 68,4 $\pm 6,2$ до 28,7 мл/хв $\pm 3,5$ мл/хв ($P < 0,001$; рис. 2). Таким чином, характер і глибина змін скорочувальної активності міокарда та коронарного кровотоку, а також інших показників роботи серця свідчили про значне пошкодження міокарда, яке було зумовлене ішемією–реперфузією. Ступінь пригнічення скорочувальної активності міокарда в наших

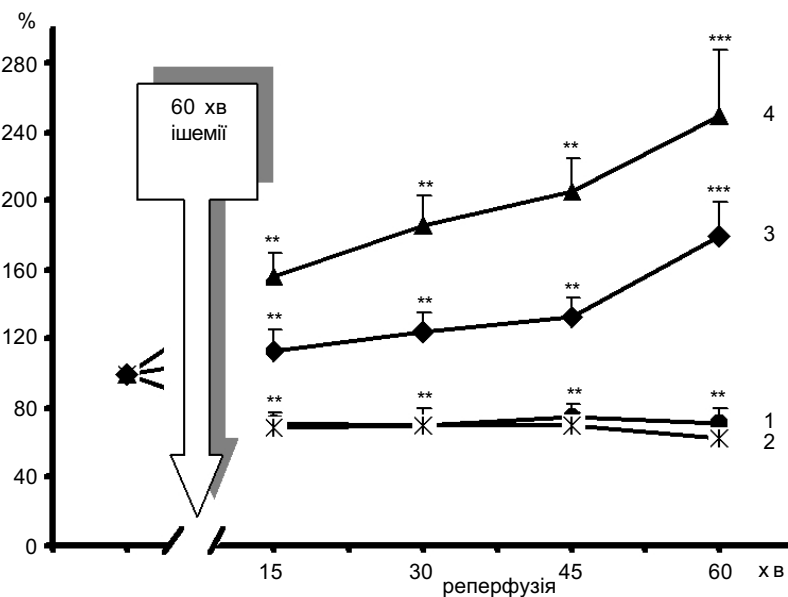


Рис. 2. Зміни центральної гемодинаміки та легеневого кровотоку при реперфузії ішемізованого серця собаки: 1 – артеріальний тиск, 2 – серцевий викид, 3 – тиск в легеневій артерії, 4 – опір легеневих судин

дослідах можна було порівняти з даними, які були одержані раніше в експериментах на ізольованому серці, міокардіальній трабекулі та судинних смужках [1, 2, 4]. Паралельно з цим у пробах крові з правого передсердя було виявлено різке підвищення оптичної густини поглинання у перші хвилини реперфузії. Рівень мітохондріального фактора на 1-й хвилині реперфузії ішемізованого міокарда становив $0,29 \pm 0,05$, а на 3-й хвилині – $0,31 \pm 0,06$. Слід підкреслити, що мітохондріальний фактор вивільнювався у кров, яка відтікала у перші хвилини реперфузії, що свідчило про відкривання МП і апоптотичну та, можливо, некротичну загибель клітин міокарда (рис. 3). Це збігалось з даними інших авторів, які зазначили, що максимальна активація МП і вихід у цитозоль клітин метаболітів мітохондріального походження відбуваються саме під час реперфузії [10].

Під час клінічного дослідження оптична густина збільшувалася у перші хвилини реперфузії. Рівень мітохондріального фактора в крові, взятої з правого передсердя за допомогою катетера, введеного через праву яремну вену, становив $0,082 \pm 0,012$. За умов роботи АШК у період зупинки серця та використання кров'яної кардіоплегії в пробах кардіоплегічного розчину, зібраного також з правого передсердя, спостерігалось підвищення рівня мітохондріального фактора з $0,082 \pm 0,012$ до $0,21 \pm 0,02$ ($P < 0,05$) на 10-й хвилині і до $0,28 \pm 0,027$ ($P < 0,05$) на 90-й хвилині кардіоплегії. У разі реперфузії

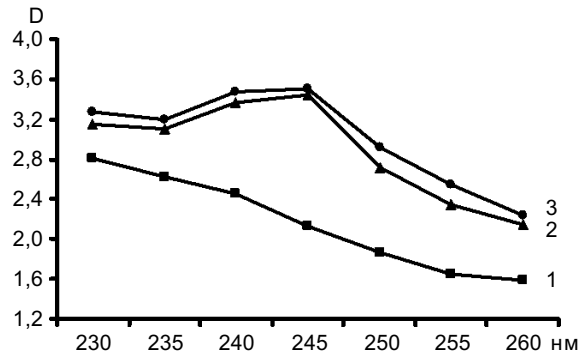


Рис. 3. Зміни оптичної густини поглинання сироватки крові з правого передсердя при реперфузії ішемізованого серця собаки: 1 – контрольні проби, взяті до початку ішемії, 2, 3 – 1-ша та 3-тя хвилини реперфузії відповідно

міокарда при роботі АШК мітохондріальний фактор підвищувався з $0,26 \pm 0,04$ ($P < 0,01$) на 2-й хвилині до максимального значення, яке визначалося на 5-й хвилині та становило $0,35 \pm 0,05$ ($P < 0,001$; рис.4). Надалі відбувалося поступове зниження цього показника. У 30 % хворих було виявлено зміни ЕКГ (у першу добу післяопераційного періоду), які проявлялися порушеннями серцевого ритму та свідчили про розвиток гіпоксії міокарда та порушення роботи серця. Ці зміни мали досить високу кореляцію з максимальним значенням рівня мітохондріального фактора ($r=0,81$), який у крові хворих продемонстрував високу кореляцію з широко застосовуваними в клінічній практиці маркерами пошкодження міокарда: КФК ($r=0,97$), мвКФК ($r=0,92$), ЛДГ ($r=0,81$), АСТ ($r=0,85$; рис. 5). Проте біохімічні та

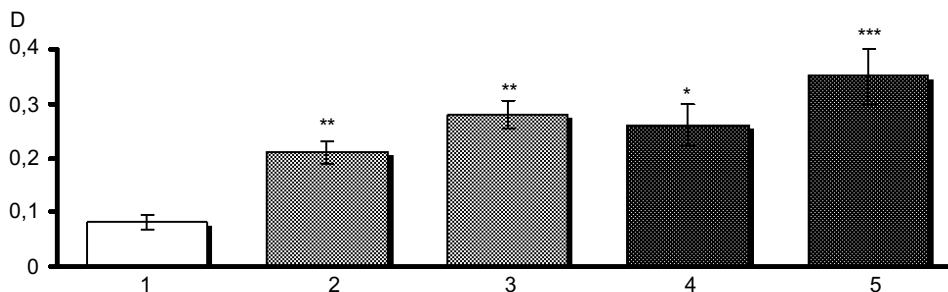


Рис. 4. Мітохондріальний фактор, що визначається в крові з правого передсердя у людини під час операцій з протезування клапанів з використанням штучного кровообігу та кров'яної кардіоплегії: 1 – контроль, 2, 3 – кардіоплегія на 10-й і 90-й хвилині відповідно, 4, 5 – реперфузія на 2-й і 5-й хвилині відповідно

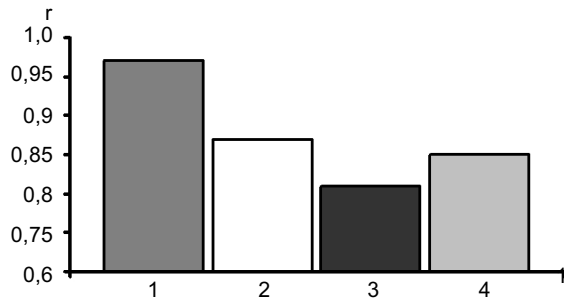


Рис. 5. Кореляція між максимальним рівнем мітохондріального фактора, визначеним під час операцій, і біохімічними показниками пошкодження тканин за першу післяопераційну добу: 1 – креатинфосфокіназа, 2 – мв-креатинфосфокіназа, 3 – лактатдегідрогеназа, 4 – аспартатамінотрансфераза

електрокардіографічні дослідження давали змогу виявити порушення роботи серця тільки через декілька годин після операції, тоді як зміни рівня фактора, а значить і відкривання МП рестрували безпосередньо вже під час самої операції, що давало відчутну перевагу в ранній оцінці функціонального стану міокарда.

Таким чином, в експериментальних і в клінічних умовах реперфузійні пошкодження серця супроводжувались активацією МП і вивільненням мітохондріального фактора. При цьому рівень останнього можна було зіставити зі ступенем порушення скорочувальної функції серця. Дослідження, проведені раніше на ізольованих мітохондріях з використанням відомих індукторів МП – аноксії–реоксигенації та феніларсиноксиду, підтвердили мітохондріальне походження фактора [5]. Результати дослідів на цілому організмі також збігаються з проведеними раніше дослідженнями з вивчення порушень роботи серця при ішемії–реперфузії на ізольованих препаратах [1, 2, 4,]. Крім того, визначення відкривання МП *in vivo* за рівнем мітохондріального фактора у венозній крові дає змогу оцінювати паралельно міру пошкодження міокарда та безпосередньо стан МП. Також слід підкреслити ще раз те, що мітохондріальний фактор з'являється у крові, яка

відтікає від серця, вже через декілька хвилин після початку реперфузії, що дає можливість дуже рано оцінити тяжкість пошкодження міокарда та ефективність терапевтичних заходів, що застосовуються для його попередження.

V.F. Sagach, V.B. Maxymenko, A.V. Dmitrijeva, J.A. Bubnova, A.J. Boguslavskij, G.V. Knyshev

EARLY MARKER OF MYOCARDIAL INJURY OF ISCHEMIA-REPERFUSED HEART IN EXPERIMENT AND CLINICAL OPERATIONS WITH ARTIFICIAL CIRCULATION

The model of ischemia/reperfusion was reproduced on 9 unconscious dogs. Simultaneously with registration of indexes heart work, hemodynamic and mitochondrial factor (MF) in venous blood from right atrium was defined. Measures were done by spectrophotometria. We have also performed spectrophotometric determination of MF in 11 patients in course of operation with blood cardioplegia. Samples of mixed venous blood from the right atrium were taken on different stages of artificial blood circulation: ischemia and reperfusion. Besides that, patients' level of enzymes was defined: creatine kinase (CK), mv-creatin kinase (mv-CK), lactatedehydrogenase (LDG), aspartataminotransferase (AST), within first day of postoperative period, and also ECG-recording within pre- and after operative period were done. Maximal MF level correlates with frequency and severity of cardiac rhythm disturbance, severity of myocardial hypoxia ($r=0,81$). Maximum MF level also demonstrated correlation with KK ($r=0,97$), mvKK ($r=0,92$), LDG ($r=0,81$), AST ($r=0,85$). Thus, in experimental and clinic conditions myocardial ischemia was accompanied by mPTP activation, which led to reperfusion myocardial injuries and to release of MF. Method of MF determination gives opportunity to propose its usage as early marker of ischemic injuries and also as marker of mPTP opening *in vivo*.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

N.M. Amosov Institute of cardiovascular surgery, Academy of medical Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №1. – С.3–8.
2. Надточій С.М., Богуславський А.Ю., Сагач В.Ф. Вивчення стабільного фактора мітохондріального походження *in vivo* // Там само. – 2003. – **49**, №5. – С. 25–31.
3. Меерсон Ф.З., Капелько В.И. Роль взаємозв'язку

- між інтенсивністю скорочувальної функції та швидкості розслаблення серцевого м'язу в адаптації серця до великих навантажень // Кардіологія. – 1974. – **14**, №7. – С. 43–53.
4. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, що вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондральної пори // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №6. – С. 3–12.
 5. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондральної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондрального фактора // Там само. – 2003. – **49**, №1. – С.3–12.
 6. Трифонов І.Р. Біохімічні маркери некрозу міокарда. Частина 1. Загальна характеристика біомаркерів. Їх застосування для діагностики інфаркту міокарда: огляд сучасних рекомендацій // Кардіологія. – 2001. – №11. – С. 93–95.
 7. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // J. Physiol. – 2000. – **29**, №1. – P. 11–21.
 8. Dimond G., Forrester J. S.: Effect of coronary artery disease and acute myocardial infarction on left ventricular compliance in man // Circulation. – 1972. – **45**. – P. 11–19.
 9. Halestrap A. Mitochondria and cell death. Execution through a pore // Biochem. – 2000. – **4**. – P. 19–24.
 10. Halestrap A., Mcstay G., Clarke S. The permeability transition pore complex: another view // Ibid. – 2002. – **84**. – P.153–166.
 11. Murphy A. Mitochondria in human disease // Ibid. – 2000. – **4**. – P. 139–184.
 12. Skulachev V.H. Mitochondrial physiology and pathology. Concepts of programmed death of organelles, cells and organisms // Mol. Aspects Med. – 1999. – **20**. – P. 139–184.
 13. Veragut N, P., Krayenbuecht H. P. Estimation and quantification of myocardial contractility in the closed chest dog // Cardiologia. – 1965. – **47**. – P. 96–112.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 30.03.2006*