

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

Використання маркера відкривання мітохондріальної пори для визначення ішемічних пошкоджень міокарда у людей

Исследовали возможность определения уровня митохондриального фактора (МФ) для ранней диагностики ишемических повреждений миокарда у пациентов в Институте сердечно-сосудистой хирургии им. Н.М.Амосова. Реперфузионные повреждения сердца человека сопровождались активацией митохондриальной поры и высвобождением МФ. Начало реперфузии практически не изменяло уровень МФ, но уже через 5 мин после возобновления кровотока и сердечных сокращений он достигал своего максимального значения. При этом он тесно коррелировал с данными биохимических исследований, которые традиционно используются в клинике для диагностики повреждений миокарда. Это позволяет утверждать, что именно реперфузия является основным фактором, повреждающим миокард и вовлекающим периферическое сосудистое русло в процесс поддержания жизнеспособности сердечной мышцы. Также важно, что изменение уровня МФ мы регистрировали в первые минуты реперфузии, то есть намного раньше, чем при помощи других маркеров.

ВСТУП

Захворювання системи кровообігу тривалий час залишаються основною причиною смертності населення у розвинутих країнах. За даними ВООЗ, у 2005 р. від серцево-судинних захворювань померло 17,5 млн людей, що становить 30 % усіх летальних випадків у світі. З них 7,6 млн припадає на ішемічну хворобу серця (ІХС), що свідчить про збільшення її питомої ваги серед загальної кількості серцево-судинної патології. Для зменшення смертності проводиться активний пошук нових методів ранньої та ефективної діагностики ішемічних пошкоджень міокарда. Останнім часом багато уваги приділяється дослідженню ролі мітохондрій у розвитку порушень серцевої діяльності в умовах ішемії–реперфузії міокарда. Доведено, що мітохондріальна пора (МП) є основним тригером розвитку апоптозу та некрозу враже-

них ішемією органів і тканин організму [14, 16, 17]. За сучасними даними саме відкривання МП призводить до загибелі клітин міокарда під час ішемії–реперфузії [9, 10, 13]. Дослідженнями, які проводились у відділі фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця на ізольованих мітохондріях, міокардіальних і судинних препаратах, серці тварин і на цілому організмі, встановлено вивільнення у кров, що відтікає від ішемізованого серця, або у сольовий розчин мітохондріального фактора (МФ), який може бути маркером утворення/відкривання МП [1, 2, 4–6]. У наших попередніх експериментах, які проводилися на наркотизованих тваринах, було виявлено, що рівень МФ тісно корелює з інтенсивністю пошкодження міокарда *in vivo* [4].

Раннє виявлення маркерів ішемічного пошкодження серця в крові дає змогу забезпечити своєчасне діагностування та підвищення ефективності лікування пацієн-

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

тів. Тому метою нашої роботи було дослідження можливості використання визначення рівня МФ у клінічній практиці для діагностики ішемічних пошкоджень міокарда у пацієнтів під час операцій на серці, які проводились в Інституті серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова.

МЕТОДИКА

Обстежено 33 людини, яких розділили на 3 групи. До першої групи ввійшло 12 донорів. Проби венозної крові з ліктьового згину для визначення рівня МФ були взяті під час попереднього лабораторного обстеження перед здачею ними крові. Також вимірювали артеріальний тиск, частоту серцевих скорочень, робили загальний аналіз крові та інші обов'язкові для донорів обстеження. За віком ми розподілили донорів на дві підгрупи: 18–34 роки та 35–58 років.

Друга група складалася з 20 хворих на ІХС, середній вік яких становив $60,5 \pm 12,9$ років. Пацієнтам була проведена планова хірургічна реваскуляризація міокарда з накладанням від 1 до 4 аорто- і мамакоронарних шунтів. Тривалість операції становила в середньому 4,07 год. Післяопераційна медикаментозна терапія складалася з застосування антагоністів кальцієвих каналів (адалат), інгібіторів ангіотензинперетворювального фактора (берліприл), в-блокаторів (егілок, метапролол), препаратів-донорів NO (нітрогліцерин, ізокет), антиангінальних препаратів метаболічної дії (предуктал). Інотропну підтримку серця проводили з використанням допаміну, дігосину. У пацієнтів були взяті проби венозної крові з ліктьового згину для визначення рівня МФ до оперативного втручання та протягом першої післяопераційної доби. Також проводили лабораторні дослідження, електрокардіографію (ЕКГ), ехокардіографію та селективну коронарографію.

До третьої дослідної групи входили 11 пацієнтів віком від 31 до 63 років, яким було проведено пластику клапанів серця з використанням штучного кровообігу та кров'яної кардіоплегії. Тривалість операції становила 4 год 40 хв \pm 21 хв, штучний кровообіг підтримували 2 год 30хв \pm 8 хв, тривалість кардіоплегії була 1 год 46 хв \pm 9 хв. Проби змішаної венозної крові з правого передсердя брали на різних етапах штучного кровообігу: під час кардіоплегії, реперфузії та відновлення скорочувальної активності серця. Як контроль використовували проби крові, зібрані перед зупинкою серця та підключенням апарата штучного кровообігу (АШК). Для оцінки функціонального стану серця пацієнтам проводили електрокардіографічне й ехокардіографічне дослідження в до- та післяопераційному періоді, а також визначали в крові вміст ферментів, що звичайно використовуються в клініці як маркери пошкодження міокарда: креатинфосфокіназу (КФК), мв-креатинфосфокіназу (мв-КФК), лактатдегідрогеназу (ЛДГ), аспартатамінотрансферазу (АСТ).

Для визначення рівня МФ проби крові центрифугували при 3000 хв^{-1} протягом 15 хв, відділяли плазму, потім додавали 50%-й розчин трихлорцтової кислоти для забезпечення повного осадження білків у кількості 10 % від об'єму плазми в пробірці. Після осадження білка проби повторно центрифугували, а потім проводили спектрофотометричне вимірювання оптичної густини отриманої сироватки в ультрафіолетовій ділянці спектра при довжинах хвиль від 230 до 260 нм за допомогою спектрофотометра СФ 46. Причому для кожної довжини хвилі реєстрували спочатку значення екстинції контрольної проби, а потім – досліджуваної. Як контроль використовували дистильовану воду. За різницею між максимальним значенням оптичної густини, що знаходиться праворуч у діапазоні 230–260 нм і мінімальним

значенням, розташованим ліворуч у цьому ж діапазоні довжини хвилі визначали рівень МФ [6].

Методика проведення дослідження відповідала Гельсинській декларації 1975 р. та її перегляду 1983 р. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показники клініко-лабораторного обстеження, артеріального тиску, частоти серцевих скорочень, загального аналізу крові та інших обов'язкових досліджень усіх донорів першої групи знаходились у межах фізіологічних норм. Водночас рівень МФ у сироватці крові цих людей значно відрізнявся. Так, у підгрупі донорів віком від 18 до 34 років він становив $0,07 \pm 0,01$, тоді як у підгрупі віком від 35 до 58 років – був вірогідно вищим $0,125 \pm 0,01$ ($P < 0,05$). У середньому у першій групі рівень МФ становив $0,098 \pm 0,01$. Відомо, що зниження фізіологічних функцій, уповільнення метаболічних процесів і зменшення адаптаційних можливостей людини, які відбуваються в організмі з віком, призводять до підвищення чутливості тканин у зрілих і старих тварин, а також у людей до дії негативних чинників, які зумовлюють та/або полегшують відкриття МП [16, 17]. Різні рівні МФ у різних вікових підгрупах донорів можуть свідчити про те, що у людей старшої вікової групи процеси активації та відкриття МП відбуваються інтенсивніше, ніж у молодих, навіть за відсутності скарг на стан здоров'я та даних об'єктивного обстеження, які не виходять за межі фізіологічної норми. Цим можливо пояснити підвищення з віком ризиків гострих серцево-судинних розладів. Визначення показників МФ у людей зрілого та старшого віку дає змогу виявити групу ризику серцево-судинних порушень до появи клінічних симптомів.

У пацієнтів кардіохірургічної клініки визначення рівня МФ допомогало оцінити ступінь пошкодження серцевого м'яза під час різних оперативних втручань на серці. Так, у другій групі пацієнтів операції аортокоронарного шунтування проводили на працюючому серці, що вважається менш травматичним для міокарда, ніж втручання з використанням штучного кровообігу. Згідно з анамнезом, прооперовані пацієнти другої групи хворіли на ІХС (стабільна стенокардія II–IV функціональний клас) в середньому понад 15 років, 90 % з них перенесли інфаркт міокарда, повторний інфаркт був у 16 %. Напади стенокардії у переважної більшості пацієнтів відбувалися декілька разів на день, в основному при незначному фізичному навантаженні. Рівень МФ перед проведенням операції становив $0,24 \pm 0,01$. Це майже вдвічі вище порівняно з донорами старшого віку (рис. 1), що може свідчити про давність і

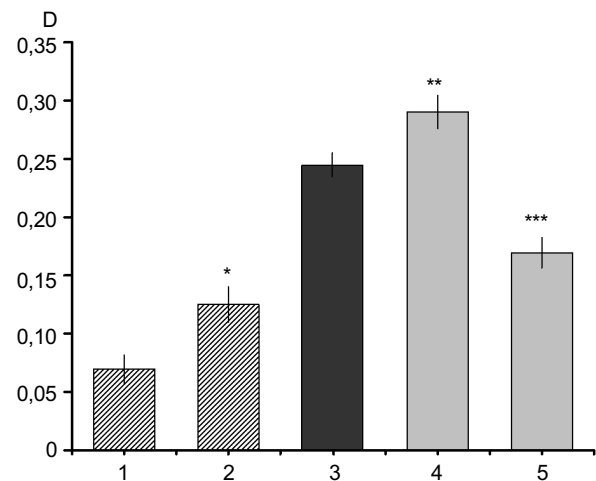


Рис. 1. Кількісні зміни мітохондріального фактора у венозній крові донорів різного віку та пацієнтів після аортокоронарного шунтування:

1 – донори віком від 18 до 34 років ($n=6$); 2 – донори віком від 35 до 58 років ($n=6$); 3 – хворі на ішемічну хворобу серця (ІХС) ($n=20$); 4–1-ша підгрупа хворих на ІХС після аортокоронарного шунтування ($n=11$); 5–2-га підгрупа хворих на ІХС після аортокоронарного шунтування ($n=9$). * $P < 0,05$ – групи донорів порівнювали між собою; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,005$ – підгрупи хворих на ІХС після аортокоронарного шунтування порівнювали з групою хворих на ІХС

тяжкість захворювання, яке було зумовлене хронічною ішемізацією міокарда. У першу післяопераційну добу середній рівень МФ у хворих цієї групи становив $0,22 \pm 0,008$, що вірогідно не відрізняється від доопераційних значень. Показники електрокардіографічного обстеження в ранньому післяопераційному періоді виявили посилення ішемії в окремих ділянках міокарда у 50 % пацієнтів, порушення ритму (миготлива аритмія, блокади, екстарсистоли) у 25 %. При виписці позитивна динаміка ЕКГ спостерігалася у 80 % пацієнтів. Під час операції на організм негативно впливають операційна травма, оксидативний стрес, реперфузійне пошкодження ревааскуляризованих ділянок міокарда. З іншого боку, покращується кровопостачання значних ділянок міокарда, відновлюються продукція макроергів і функція каналних структур кардіоміоцитів. Тому зміни функціонального стану серця в ранньому післяопераційному періоді можуть бути різноспрямованими. За динамікою показників електрокардіографії у післяопераційному періоді та рівнем МФ ми розділили пацієнтів другої групи на дві підгрупи. У першій підгрупі хворих ($n=9$) рівень МФ після оперативного втручання знижувався на 29,2 % ($P<0,005$), що підтверджувалося нормалізацією серцевого ритму та зменшенням проявів ішемії міокарда за даними ЕКГ. У другій підгрупі ($n=11$) рівень МФ підвищувався на 20,8% ($P<0,05$), що супроводжувалося збільшенням ділянки ішемії міокарда, порушеннями провідності та ритму серцевих скорочень (див. рис. 1). Індекс кореляції між змінами рівня МФ у першу післяопераційну добу та напрямком змін даних ЕКГ становив 0,87. На нашу думку, такий тісний зв'язок та однакова спрямованість змін рівня МФ і функціонального стану міокарда можуть відображати ступінь пошкодження серцевого м'яза та швидкість його відновлення після оперативного втручання.

У третій групі пацієнтів під час операцій з пластики клапанів серця рівень МФ у пробах крові, отриманих перед підключенням АШК, становив $0,082 \pm 0,012$. Упродовж роботи АШК спостерігалася прогресуюче підвищення рівня МФ 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. Під час реперфузії коронарного русла та відновлення скорочувальної активності серця на 2-й хвилині його роботи рівень МФ становив $0,26 \pm 0,04$, а на 5-й – він збільшувався до максимального значення ($0,37 \pm 0,05$; $P<0,05$). Далі рівень МФ поступово знижувався (рис. 2). У 30 % хворих третьої групи в післяопераційному періоді були виявлені електрокардіографічні зміни, які проявлялися порушеннями провідності, серцевого ритму, посиленням гіпоксії міокарда. Спрямованість і виразність цих змін тісно корелювали ($r=0,81$) з максимальними в цій групі значеннями МФ (до 0,58). Крім того, напрямок змін роботи серця і рівня МФ, зареєстровані під час кардіохірургічних втручань з використанням АШК продемонстрували високу кореляцію з традиційними біохімічними маркерами пошкодження міокарда: КФК ($r=0,97$), мв-КФК ($r=0,92$), ЛДГ ($r=0,81$), АСТ ($r=0,85$). Слід зазначити, що рівень МФ ми визначали під час хірургічного втручання, а показники ЕКГ і біохімічні

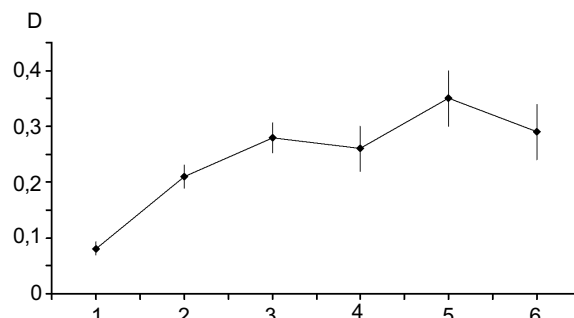


Рис. 2. Зміни рівня мітохондріального фактора у сироватці крові з яремної вени під час операції серця з використанням апарата штучного кровообігу ($n=11$): 1 – контроль; 2–10 хв кардіоплегії; 3–90 хв кардіоплегії; 4–2 хв реперфузії; 5–5 хв реперфузії; 6–30 хв реперфузії

маркери були отримані тільки наступної доби. Це ще раз підкреслює інформативність і перспективність досліджуваного фактора для раннього виявлення порушень і підвищення ефективності післяопераційної терапії.

Раніше Halestrap та співавт. [13] встановили, що найактивніше утворення/відкриття МП відбувається саме у перші хвилини реперфузії. В наших попередніх експериментах, проведених на ізольованому серці та на цілому організмі наркотизованих тварин, максимальний рівень МФ також визначався у перші хвилини реперфузії ішемізованого серця [2, 4]. Результати, що були отримані нами в проведеному клінічному дослідженні збігаються з даними експериментів і підтверджують думку про провідну роль реперфузії в пошкодженні міокарда та інформативність розробленого нами маркера [6]. Реперфузійні пошкодження серця людини супроводжувались активацією МП і вивільненням МФ. При цьому рівень МФ мав високу кореляцію з даними біохімічних досліджень, що традиційно використовуються в клініці для діагностики пошкодження міокарда. Одержані результати повністю збігаються з нашими попередніми даними при вивченні порушень роботи серця при ішемії–реперфузії на ізольованому серці, міокардіальній трабекулі та судинних смужках в умовах їх перфузії сольовим розчином [1, 2, 5, 7].

Тривалий час стандартними методами в діагностиці ішемічних пошкоджень міокарда були визначення в крові рівня або активності таких ферментів, як КФК, ЛДГ (через 14–48 год) [18], а також АСТ (через 8–12 год) [11]. Для більш ранньої та точної діагностики пошкоджень міокарда використовують визначення рівня мв-КФК (через 3–4 год) [15], тропоніну-Т та І (через 6 год) [12], міоглобіну, гомоцистеїнату тощо [8, 19]. У раніше проведених клінічних дослідженнях при порівнянні ефективності

операцій прямої реваскуляризації міокарда на працюючому серці та в умовах штучного кровообігу визначалися вміст тропоніну-Т і мв-КФК. При цьому в групі хворих, яким коронарне шунтування проводилося на працюючому серці, встановлено підвищення вмісту мв-КФК у 2,5 раза [3]. У другій групі пацієнтів, яким аналогічне втручання виконували в умовах штучного кровообігу та кров'яної кардіоплегії, цей показник підвищувався у 3,8 раза. Концентрація кардіоспецифічного маркера пошкоджень тропоніну-Т під час таких операцій була значно вищою, ніж в умовах втручання на працюючому серці та достовірно перевищувала нормальний вміст цього ферменту [3]. Зміни рівня МФ у нашому дослідженні збігаються зі змінами кардіоспецифічних маркерів, які визначалися в дослідженнях інших учених, що ще раз свідчить про інформативність цього показника. Але слід зазначити, що для

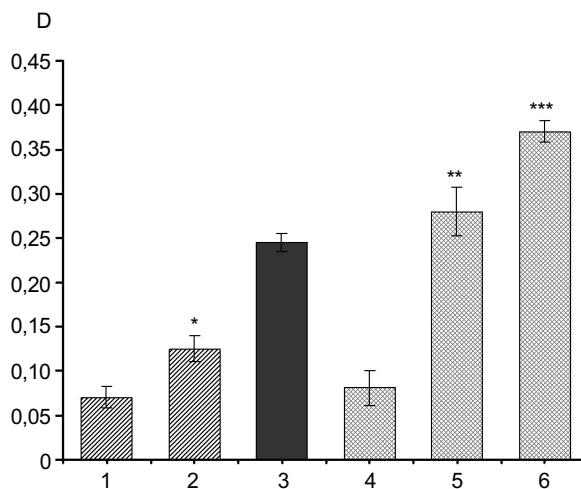


Рис. 3. Зміни рівня мітохондріального фактора у сироватці крові пацієнтів з ішемізацією міокарда різного генезу: 1 – донори 18–34 років; 2 – донори 35–58 років; 3 – хворі на ішемічну хворобу серця (ІХС) до операції; 4 – контроль перед операцією з використанням апарата штучного кровообігу; 5 – 90 хв кардіоплегії; 6 – 5 хв реперфузії. * $P < 0,05$ – групи донорів порівнювали між собою; ** $P < 0,005$ рівень мітохондріального фактора на 90-й хвилині кардіоплегії порівнювали з рівнем у хворих на ІХС до операції 5-й хвилині реперфузії; *** $P < 0,05$ рівень мітохондріального фактора на 5-й хвилині реперфузії порівнювали з рівнем у хворих на ІХС до операції;

визначення рівня МФ, на відміну від методики визначення вмісту тропініну-Т, не потрібні дорогі реактиви. За нашими результатами, операція на працюючому серці також менш травматична для міокарда, ніж проведена з використанням АШК. Ще одне важливе спостереження зроблене під час кардіоплегії. Зареєстроване в нашому дослідженні підвищення рівня МФ впродовж кардіоплегії можна було зіставити з таким, який визначався у хворих на ІХС перед початком операції аортокоронарного шунтування (рис. 3). Початок реперфузії практично не змінював рівня МФ, але вже через 5 хв відновлення кровотоку та серцевих скорочень він сягав свого максимального значення. Ці результати дають змогу стверджувати, що саме реперфузія є основним фактором, що вражає міокард (див. рис. 2). При цьому дуже важливим є те, що зміни рівня МФ ми реєстрували у перші хвилини реперфузії. Тобто за допомогою нашого методу, пошкодження міокарда визначалося набагато раніше, ніж при визначенні інших маркерів.

Таким чином, використання методики визначення МФ у венозній крові пацієнтів може бути дуже інформативним для виявлення груп ризику серцево-судинних захворювань, особливо у людей середнього та старшого віку, для визначення рівня ішемізації міокарда під час хірургічних втручань, для прогнозування перебігу післяопераційного періоду та підвищення ефективності інтенсивної терапії, для контролю ефективності лікування в кардіологічних відділеннях.

**V. F. Sagach, A. V. Dmitrieva, J. A. Bubnova,
V. B. Maksimenko, G. V. Knyshov**

EARLY DIAGNOSTICS OF ISCHEMIC DAMAGES OF THE MYOCARDIUM BY MEANS OF THE MARKER OF OPENING THE MITOCHONDRIAL PORE

In the article a possibility of definition of level of the mitochondrial factor (MF) for early diagnostics of the myocardial is-

chemic damages at patients during heart surgery was investigated. The reperfusion damages of heart were manifested by MPTP activation and MF release. The rising of MF level during a cardioplegia is comparable to level, which has been noted at patients with angina before operation of aorto-coronary shunting. The beginning of reperfusion, practically did not change MF level, but 5 minutes after restoration of a blood flow and warm reductions it increased to the maximum values. Thus, it closely correlated with a level of a myocardial contractility depression and data of biochemical researches, which are traditionally used in clinic for diagnostics of damages of a heart. It allows to confirm, what exactly reperfusion is a major factor damaging of a myocardium. Its important that, change of MF level we registered at first minutes of heart reperfusion, those are much earlier, than by means of other markers. It seems to us, that investigation of a MF is very perspective for early finding of an ischemic damages of different tissues and organs.

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

M.M.Amosov Institute Surgery Academy Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дмитрієва А.В., Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю. Дослідження участі мітохондріальної пори в розвитку порушень скорочувальної активності міокарда та судин // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №3. – С. 18–24.
2. Дмитриева А.В., Сагач В.Ф., Богуславский А.Ю. Стабильный митохондриальный фактор, который высвобождается во время реперфузии, – исследование природы и влияния на миокард и сосуды // Клини. и эксперим. патология. – 2004. – **3**, №2(1). – С. 20–22.
3. Карташев Д.И., Митофанова Л.Б., Рубинчик В.Е. и др. Сравнительная эффективность операций прямой реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце // Серцево-судин. хірургія. – 2006. – Вип. 14. – С. 93–96.
4. Надточій С.Н., Богуславський А.Ю., Сагач В.Ф. Визначення стабільного фактора мітохондріального походження *in vivo* // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, №5. – С. 25–31.
5. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Аكوпова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора // Там само. – 2003. – **49**, №1. – С. 3–12
6. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Бубнова Ю.О. та ін. Спосіб діагностики ішемічно-реперфузійних пошкоджень міокарда та відкриття мітохондріальної пори // Патент на корисну модель № 26385–2007.
7. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.Н. Попередження постреперфузійних порушень функцій серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів відкриття мітохондріальної пори // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №6. – С. 3–12.

8. Трифонов И.Р. Биохимические маркеры некроза миокарда. Часть 1. Общая характеристика биомаркеров. Их применение для диагностики инфаркта миокарда: обзор современных рекомендаций // Кардиология. – 2001. – №11. – С.93–95.
9. Borutaite V., Jekabsone A., Morkuniene R., Brown G.C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevent mitochondrial dysfunction, cytochrom c release and apoptosis inuced by heart ischemia // J.Mol. Cell.Cardiol. – 2003. – **35**. – P. 357–366.
10. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell deth // J. Physiol. – 2000. – **29**, №1. – P.11–21.
11. Dimond G., Forrester J.S. Effect of coronary artery disease and acute myocardial infarction on left ventricular compliance in man // Circulation. – 1972. – **45**. – P. 115–118.
12. Donnely R., Millar-Craig M.W. Cardiac troponin: IT upgrade for the heart // Lancet. – 1998. – **351**. – P. 537–539.
13. Halestrap A., Mcstay G., Clarke S. The permeability transition pore complex: another view // Biochimie. – 2002. – **84**. – P.153–166.
14. Murphy A. Mitochondria in human disease // Biochemist. – 2000. – **4**. – P.139–184.
15. Roberts R., Godwa K., Ludbrook P. et al. Specificity of elevated serum MB creatine phosphokinase activity in the diagnosis of acute myocardial infarction // Amer. J. Cardiol. – 1975. – **36**. – P. 433–437.
16. Sastre J., Pallardo F.V., Vina J. Mitochondrial oxidative stress play a key role in aging and apoptosis // Life. – 2000. – **49**. – P. 427–435.
17. Skulachev V.H. Mitochondrial physiology and pathology. Concepts of programmed deth of organelles, cells and organisms // Mol. Aspects Med. – 1999. – **20**. – P. 139–184.
18. Vasudevan G., Mercer D., Varat M. Lactic dehydrogenase isoenzyme determination in the diagnosis of acute myocardial infarction // Circulation. – 1978. – **57**. – P. 1055–1067.
19. Wu A., Apple F., Gibler B. et al. Use of cardiac marker in coronary artery disease. NACB SOLP Recommendations. National meeting American Association of Clinical Chemistry. – Chicago, 1998. – P. 148 – 152.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т серцево-судинної хірургії ім. М.М.Амосова АМН
України, Київ
E-mail: j.bubnova@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 19.09.2008*