

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ЗАЩИТЫ МИОКАРДА С АНАЛИЗОМ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК КАРДИОЦИТОВ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

Е.В. Углова, П.М. Ларионов, В.Н. Ломиворотов, Ю.Н. Горбатов, Ю.С. Синельников, А.В. Шунькин, И.С. Афанасьев, М.М. Мандрик

ФГУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологий»

cpssc@meshalkinclinic.ru

Ключевые слова: защита миокарда, повреждение ДНК, искусственное кровообращение, коррекция врожденных пороков сердца, первый год жизни.

Изучение вопросов адекватности защиты миокарда у детей первого года жизни с морфологической оценкой современными лабораторными методами крайне актуально, так как вносит вклад в более глубокое понимание интраоперационной патофизиологии сердечной мышцы, а также способствует профилактике послеоперационных осложнений. Известно, что при острой ишемии и реперфузии миокарда происходит усиление перекисного окисления липидов [1, 7, 8]. Оксидативный стресс приводит к повреждению наиболее важных полимеров – нуклеиновых кислот, белков и липидов. Активные формы кислорода (АФК) вызывают повреждения ДНК, окисление оснований, их модификации, разрывы цепей, повреждения хромосом [1, 3, 19]. Из лизосомальных ферментов активируются прежде всего эндонуклеазы, что приводит к гидролизу и расщеплению ДНК, вследствие чего происходит кариопикноз, кариорексис, кариолизис. Активируются также протеазы, вследствие чего происходит деструкция и переваривание эндоскелета. Активация фосфолипаз приводит к разрушению мембран и выходу лизирующих ферментов с фрагментами органелл в цитоплазму клетки, вследствие чего образуется очаг воспаления, а в крайнем варианте очаги некроза.

Активизация эндонуклеаз, повреждающих ДНК, происходит при повышении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , наблюдаемом в ходе окислительного стресса [8]. В результате действия АФК на молекулу ДНК возникают хромосомные aberrации, которые представляют собой нарушения структуры хромосомы [2]. Как известно, апоптоз может быть индуцирован гипоксией и реперфузией миокарда, инфарктом миокарда, инсультом [11, 13–18].

Проблема оценки состояния миокарда на этапах коррекции ВПС с комплексным морфологическим анализом по-прежнему остается актуальной [4, 5]. В предыдущих наших исследованиях оценка адекватности защиты миокарда у пациентов первого года жизни проводилась методом лазерно-индуцированной флуоресценции с определением степени фрагментации ДНК в ядре и цитоплазме кардиоцитов [9]. Это характеризу-

ет новый аспект в оценке жизнеспособности миокарда при коррекции ВПС на новом методическом уровне. В исследованиях НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН был представлен классический анализ ультраструктуры кардиоцитов на этапах коррекции ВПС у детей первого года жизни методом электронной микроскопии, где выявлены преимущества раствора «Custodiol» перед ФХКП [10]. В то же время в работах украинских коллег на основании данных интраоперационной электронной микроскопии у пациентов ВПС первого года жизни выявлены преимущества использования ФХКП с концентрацией раствора калия хлорида 30 ммоль/л, перед раствором Св.Томаса [6]. Таким образом, до настоящего времени изучаемые вопросы остаются предметом дискуссии. В доступных нам информационных источниках исследований по морфофункциональной оценке миокарда с анализом интраоперационного повреждения ДНК кардиоцитов на этапах коррекции ВПС при 3-х вариантах защиты миокарда нами не найдено.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 28 пациентов с ВПС (13-ДМЖП, 5-АВК, 8-ТФ, ДОМС от ПЖ-1, критический КСЛА-1). Средний возраст $11,0 \pm 0,6$ месяцев. Для защиты миокарда у 9 пациентов использовалась ФХКП, у 7 – кровяная кардиоплегия, у 12 – раствор «Custodiol». Средняя окклюзия АО – $54 \pm 3,1$ мин, ИК – $99 \pm 4,3$ мин. По длительности пережатия АО и времени ИК группа ФХКП ($44,2 \pm 3,1$; $80,8 \pm 3,3$) статистически не различалась с группой кровяной кардиopleгии ($48,8 \pm 3,7$; $97,0 \pm 5,5$). В группе «Custodiol» длительность пережатия АО и время ИК ($60,0 \pm 3,8$; $112,1 \pm 5,4$) достоверно отличались ($p < 0,05$, критерий Стьюдента) от вышеописанных групп.

Забор биопсии из ушка правого предсердия производили на следующих этапах операции: 1) перед пережатием АО, 2) после открытия АО, 3) на 30-й минуте реперфузии. Оценка результатов проводилась на люминесцентном компьютеризованном микроскопе с определением интен-

сивности флуоресценции и с последующим вычислением процентного соотношения фрагментированной ДНК в ядре и цитоплазме кардиоцитов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ OFFICE XP, пакета статистических программ STATISTICA 6.0. В качестве достоверных считали результаты при достижении уровня значимости $p \leq 0,05$, для характеристики тенденции указывали уровень $p \leq 0,1$. Методы статистики: непараметрический коэффициент корреляции Спирмена (ρ), достоверность различия между двумя группами оценивали непараметрическими критериями Манна-Уитни, Уилкоксона. Если число сравниваемых групп превышало две, использовали непараметрический тест Краскелла-Уоллиса, для сравнения средних значений использовался критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для пациентов в группах ФХКП и кровяной кардиоплегии определялись статистически достоверные различия процентного содержания фрагментированной ДНК в цитоплазме кардиоцитов относительно ядра между 1 и 2, а также 1 и 3 этапами ($p < 0,05$, t -test) в сторону увеличения процентного содержания фрагментированной ДНК в цитоплазме на этапах 2 и 3 операции. В группе пациентов «Custodiol» различий в показателях между 1 и 2, а также между 1 и 3 этапами не найдено. Динамика процентного соотношения фрагментированной ДНК в цитоплазме кардиоцитов относительно ядра на этапах коррекции ВПС у детей первого года жизни при применении ФХКП, кровяной кардиоплегии и раствора «Custodiol» представлена на рисунке.

При сравнительной оценке трех методов кардиопротекции на втором этапе статистически значимых различий показателей между группами не найдено (критерий Крускала-Уоллиса). На третьем этапе определяются статистически значимые различия (критерий Крускала-Уоллиса) между группа-

ми ФХКП – «Custodiol», кровяная кардиоплегия – «Custodiol» в сторону меньшего процентного содержания показателя при использовании раствора «Custodiol» ($p < 0,05$). Корреляционной зависимости исследуемого показателя с длительностью окклюзии АО при трех методах кардиопротекции не обнаружено (корреляционный анализ по Спирмену). У двоих пациентов с неблагоприятным исходом зарегистрировано соотношение показателей ядро-цитоплазма 1:1 на этапах 2 и 3 операции. Клинические критерии адекватности защиты миокарда при применении ФХКП, кровяной кардиоплегии и раствора «Custodiol» представлены в таблице.

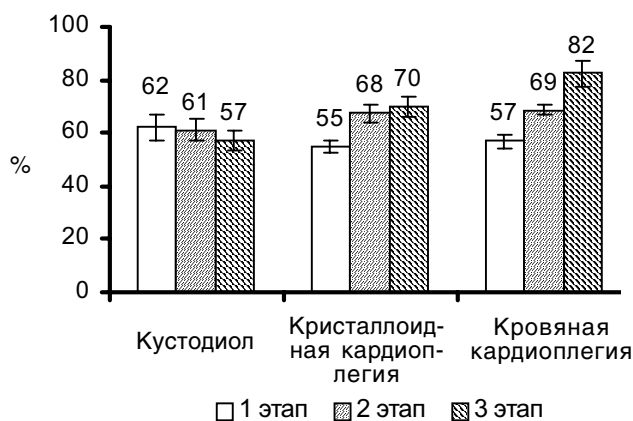
ОБСУЖДЕНИЕ

Нашими исследованиями установлено, что на этапах коррекции ВПС у детей первого года жизни при применении ФХКП и кровяной кардиоплегии имеет место дефрагментация ДНК с достоверным повышением показателя в цитоплазме кардиоцитов относительно ядра на этапах аноксии и реперфузии. Учитывая механизмы повреждения структуры ДНК, описанные выше, данное исследование указывает на наличие интраоперационной гипоксии миокарда, активизации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), индукции механизмов некроза и апоптоза кардиоцитов.

Нами установлен факт наличия фрагментированной ДНК в цитоплазме кардиоцитов, что свидетельствует о повреждении ядерных мембран. Нашими исследованиями выявлено, что при использовании раствора «Custodiol» нет статистических различий в показателях на трех исследуемых этапах, что указывает на менее выраженные ультраструктурные и метаболические сдвиги в миокарде и дает преимущества данному методу кардиопротекции. Немаловажен и факт, что в группу «Custodiol» вошли пациенты с наиболее сложными пороками, в том числе и с цианотическими, а сроки выключения сердца из кровообращения были достоверно более длительными (длительность пережатия АО и время ИК $60 \pm 3,8$; $112,1 \pm 5,4$).

Результаты нашего исследования согласуются с данными из НЦССХ им. А.Н. Бакулева, где по классическим морфологическим характеристикам эффективности защиты миокарда констатировано отсутствие достоверных изменений показателей митохондриального индекса и запасов гликогена в период аноксии и реперфузии при коррекции ВПС у детей первого года жизни при защите миокарда раствором «Custodiol» и снижение этих показателей при использовании ФХКП [10].

Дальнейший детальный анализ клинических характеристик адекватности защиты миокарда в нашей работе подтвердил результаты морфологической оценки. Так, в группе «Custodiol» по сравнению с группами ФХКП и кровяной кардиоплегии по па-



Сравнительная оценка методов защиты миокарда.

Клинические критерии адекватности защиты миокарда при применении ФХКП, кровяной кардиоплегии и раствора «Custodiol»

Критерии	ФХКП (n=9)	Кровяная кардиоплегия (n=7)	Раствор «Custodiol» (n=12)
Восстановление сердечной деятельности			
через A-V блок	6 (67%)	3 (43%)	3 (25%)
через фибрилляцию			1 (8%)
Нарушения ритма в ближайшем послеоперационном периоде			
блокада правой ножки пучка Гиса	6 (67%)	2 (29%)	5 (42%)
фибрилляция			
предсердный ритм	1 (11%)		
ритм A-V узла	1 (11%)		
предсердная экстрасистолия	1 (11%)	1 (14%)	1 (8%)
пароксизмальная тахикардия	1 (11%)		
удлинение электрической систолы желудочков	1 (11%)	4 (57%)	нет
Ухудшение метаболизма миокарда (ЭКГ)	4 (44%)	4 (57%)	нет
Нарушения локальной сократимости миокарда (Эхо КГ)	1 (11%)	1 (14%)	нет

раметрам ЭКГ не отмечено случаев ухудшения метаболизма миокарда и гемодинамически значимых нарушений ритма, а по данным ЭхоКГ – фактов нарушения локальной сократимости сердечной мышцы. Таким образом, нашей работой установлено, что при применении ФХКП и кровяной кардиоплегии метаболическая «цена адаптации» миокарда после этапа аноксии и реперфузии значительно выше, что клинически соответствует более частому возникновению нарушений проводимости и нарушений ритма на фоне ухудшения метаболизма миокарда. Эти выводы согласуются с данными экспериментальных исследований нашего института, в которых при оценке жизнеспособности миокарда методом лазерно-индуцированной флуоресценции было доказано снижение устойчивости проводящих структур сердца к ишемии по сравнению с рабочими кардиоцитами [8]. Нами зарегистрированы нарушения локальной сократимости сердечной мышцы у двоих пациентов из группы ФХКП и кровяной кардиоплегии. Метаболическим «выходом» из данной ситуации, по-видимому, является механизм гибернации миокарда [12]. У двух летальных пациентов при различных видах защиты миокарда на этапе аноксии и реперфузии зарегистрировано соотношение показателя, приближающееся к 1:1 с одновременным снижением интенсивности флуоресценции. В эксперименте уже отмечалось, что снижение интенсивности флуоресценции скорее всего связано с потерей ядерного материала по мере нарастания миокардиальной ги-

поксии [8]. В обоих случаях в послеоперационном периоде наблюдалась тяжелая сердечная недостаточность. У одного пациента наблюдалась клиника «оглушенного миокарда» (stunning myocardium), в то же время в другом случае сердечная недостаточность соотносилась с терминальной стадией порока (легочная гипертензия 3 стадии) и кризовым течением послеоперационного периода.

Выводы

1. При коррекции ВПС у детей первого года жизни при применении ФХКП и кровяной кардиоплегии на этапе аноксии и реперфузии происходит увеличение показателя повреждения ДНК кардиоцитов по сравнению с исходными параметрами с выходом фрагментированных участков ДНК в цитоплазму и соответствующей дефрагментацией ядра.
2. Отсутствие достоверных различий показателя повреждения ДНК кардиоцитов на этапах операции при использовании раствора «Custodiol» указывает на сохранность ультраструктуры миокарда по сравнению с методами ФХКП и кровяной кардиоплегии, что дает преимущества раствору «Custodiol».
3. Факт интраоперационного повреждения структуры ДНК, более выраженного при применении ФХКП и кровяной кардиоплегии, косвенно отражает наличие гипоксии миокарда, активизации процесса ПОЛ, индукции механизмов некроза и апоптоза кардиоцитов.

4. Наличие фрагментированной ДНК в цитоплазме кардиоцитов свидетельствует о повреждении их ядерных мембран.
5. Отсутствие корреляционной зависимости показателя повреждения ДНК кардиоцитов с длительностью выключения сердца из кровообращения при трех вариантах защиты миокарда свидетельствует об относительной адекватности кардиопротекции, что соответствует благоприятному течению послеоперационного периода у 26 пациентов.
6. Сравнительная морфофункциональная оценка применения ФХКП и кровяной кардиоплегии по сравнению с раствором «Custodiol» показывает, что «цена адаптации» оперированного сердца в группах ФХКП и кровяной кардиоплегии обеспечивается большим напряжением физиологических функций – это клинически соответствует более частому возникновению транзиторных ишемических нарушений метаболизма миокарда, нарушений проводимости и нарушений ритма, а также локальных нарушений сократимости, возникающих в раннем послеоперационном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.Б. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). М.: Медицина. 1989. С. 128.
2. Дурнев А., Середенин С. Мутагенез, скрининг и фармакологическая профилактика М.: Медицина: 1999.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113, Вып. 1. С. 107–122.
4. Ларионов П.М., Литасова Е.Е., Мандрик М.М. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2002. № 2. С. 61–66.
5. Ларионов П.М., Мандрик М.М. // Журнал прикладной спектроскопии. 2003. Т. 70, № 1. С. 38–42.
6. Мазур А.П. Захист міокарду при операціях з штучним кровообігом у новонароджених і дітей першого року життя: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Киев, 2001.
7. Меерсон Ф.З., Каган В.Е., Козлов Ю.П., Белкина Л.М., Архипенко Ю.В. // Кардиология. 1982. № 2. С. 81–91.
8. Потапенко М.М. Оценка жизнеспособности миокарда изолированного сердца методом лазерно-индуцированной флуоресценции в сопоставлении с комплексным морфологическим анализом (экспериментальная работа): автореф. дис... канд. мед. наук. Новосибирск, 2006.
9. Углова Е.В., Ларионов П.М., Ломиворотов В.Н., Горбатов Ю.Н., Синельников Ю.С. Афанасьев И.С., Мандрик М.М. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2009. № 1. С. 48–51.
10. Шебаев А.В. Защита миокарда при коррекции врожденных пороков сердца у детей первого года жизни: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2004.
11. Chen C., Ma L., Linfert D.R., Lai T., Fallon J.T., Gillam L.D. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 1997. press.
12. Chen C., Chen L., Fallon J.T., Ma L., Li L., Bow L. et al. // Circulation. 1996. V. 94. P. 507–516.
13. Douglas R. et al. // Tsongalis Clinical Chemistry 1997. V. 43. P. 2431–243.
14. Itoh G., Tamura J., Suzuki M., Suzuki Y., Ikeda H., Koike M. et al. // Am. J. Pathol. 1995. V. 146. P. 1325–1331.
15. Kajstura J., Cheng W., Reiss K., Clark W.A., Sonnenblick E.H., Krajewski S. et al. // Lab. Invest. 1996. V. 74. P. 86–107.
16. Mallat Z., Tedgui A., Fontaliran F., Frank R., Durigon M., Fontaine G. // N. Engl. J. Med. 1996. V. 335. P. 1190–1196.
17. Misao J., Hayakawa Y., Ohno M., Kato S., Fujiwara T., Fujiwara H. // Circulation. 1996. V. 94. P. 1506–1512.
18. Narula J., Haider N., Virmani R., DiSalvo T.G., Kolodgie F.D., Hajjar R.J. et al. // N. Engl. J. Med. 1996. V. 335. P. 1182–1189.
19. Wiseman H., Halliwell B. // Biochem. J. 1996. V. 313. № 1. P. 17–29.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF METHODS FOR MYOCARDIUM PROTECTION WITH ANALYSIS OF CARDIOCYTES DNA LESIONS IN INFANTS

Ye.V. Uglova, P.M. Larionov, V.N. Lomivorotov,
Yu.N. Gorbatykh, Yu.S. Sinelnikov, I.S. Afanasiev,
M.M. Mandrik

3 variants of cardiac protection while applying a laser-induced fluorescence method and determining a degree of DNA fragmentation in the nucleus and cytoplasm in 28 infants with congenital heart disease (CHD) were analyzed. 9 patients were operated under hypothermic conditions, with the use of crystalloid chemical/hypothermic cardioplegia (CCHCP), 7 patients were treated with blood cardioplegia and 12 patients – with «Custodiol» solution. Applying «Custodiol» myocard solution for protection has resulted in the smallest shears in the ultrastructure, thus offering advantages to this technique of cardiac protection. Laboratory study results are shown to match the clinical indicators of myocardium protection efficiency. It is pointed out that when applying crystalloid chemical/hypothermic cardioplegia (CCHCP) and blood cardioplegia, transitory postischemic metabolic imbalances, transitory conductive abnormalities and rhythm disturbances, as well as local disorders of myocardium contractility occur more frequently in the immediate follow-up.

Key words: myocardium protection, cardiocyte DNA damage, CHD repair, chemical/hypothermic cardioplegia, «Custodiol» solution, infants.