

УДК 581.17: 612.172: 535.372: 53.082.56

Использование флуоресцентной спектроскопии для оценки ишемического повреждения миокарда

**В.В. Салмин^{а*}, А.Б. Салмина^б,
А.А. Фурсов^б, О.В. Фролова^б,
Д.И. Лалетин^б, М.А. Фурсов^б, Г.В. Юдин^б,
Н.А. Малиновская^б, Л.Д. Зыкова^б, А.С. Проворов^{а*}**

*^а Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79*

*^б Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого,
Россия 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1¹*

Received 3.06.2011, received in revised form 10.06.2011, accepted 17.06.2011

Представлены результаты экспериментального исследования возможности применения лазерно-флуоресцентного анализа миокарда для оценки повреждения, индуцированного ишемией в условиях кардиохирургического вмешательства. Доказано, что метод оптической биопсии с использованием азотного лазера (337 нм) позволяет регистрировать метаболические изменения в миокарде, проявляющиеся нарушением уровня пиридиновых нуклеотидов, изменением функции гемопротеидов, активности НАД(Ф)Н-утилизирующих процессов и развитием контрактуры и гибели кардиомиоцитов.

Ключевые слова: оптическая биопсия, миокард, ишемия, флуоресценция.

Введение

В последние годы в развитии медицинских диагностических методов обозначилась тенденция к увеличению спектра неинвазивных методик регистрации функциональной активности органов и тканей. Перспективность внедрения такого рода методов в медицинскую практику обусловлена их высокой информативностью, отсутствием инвазивно-

го этапа исследования, возможностью применения метода в режиме непрерывного мониторинга. Среди неинвазивных методов диагностики особое место занимают оптические методы. Совокупность таких методов получила название «оптическая биопсия» (Optical Biopsy) (Bigio, Mourant, 2007). При оптической биопсии, в отличие от обычной биопсии, ткань не удаляется, а применяется

* Corresponding author E-mail address: vsalmin@gmail.com

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

та или иная форма оптических измерений, часто спектроскопических, выполняемых неинвазивно или минимально инвазивно с целью поставить диагноз *in situ* и в режиме реального времени. Методы медицинской оптической визуализации – оптическая когерентная томография, конфокальная лазерная эндомикроскопия, эндоцитоскопия и т.д. – расширяют и дополняют арсенал методов оптической биопсии (Newton et al., 2011). Высокую актуальность сохраняет проблема мониторинга состояния миокарда *in situ* во время кардиохирургических вмешательств или для оценки жизнеспособности трансплантируемого сердца (Ларионов и др., 2002; Khabbaz et al., 2001).

Основным осложнением после кардиохирургических вмешательств и во время них является ишемия, в развитии которой можно идентифицировать несколько периодов: 1) латентный, определяемый резервами аэробного метаболизма и кислорода в ткани миокарда (1-15 с); 2) период «выживания», определяемый ресурсами анаэробной продукции АТФ (5-6 мин); 3) период необратимых изменений, характеризующийся стойкой дисфункцией и нарушением структуры кардиомиоцитов (до 15 мин с момента начала ишемии). Среди имеющихся в распоряжении специалистов методов кардиомониторинга доминирующее значение имеют методы регистрации внутримиокардиальной температуры, рН, идентификация биохимических маркеров повреждения миокарда в биологических жидкостях (например, тропонина), визуализация особенностей кровоснабжения миокарда с помощью спектроскопии с использованием ближнего инфракрасного излучения (Nighswander-Rempel et al., 2002; Mair, Hammemer-Lercher, 2005). Вместе с тем применение указанных методов лимитируется несколькими факторами, в частности, необходимостью прямого контакта используемых датчиков с тканью, недоста-

точной чувствительностью или высокой стоимостью расходных материалов, что создает объективные помехи в использовании этих методов в реальной клинической практике.

Интересный и перспективный подход к решению комплексной задачи интраоперационного кардиомониторинга – использование методов оптической биопсии, к преимуществам которой относятся: 1) достижение анатомической и функциональной визуализации ткани с микроскопическим разрешением; 2) возможность экспресс-диагностики и точного количественного анализа; 3) отсутствие повреждающего действия на ткани физических или химических агентов; 4) возможность раскрытия новых субклеточных механизмов патогенеза в функционирующих клетках и тканях; 5) регистрация интегральных показателей метаболизма; 6) разрешение в миллисекундном диапазоне; 7) возможность оценки внутри- и внеклеточных событий одновременно.

Среди методов оптической биопсии, позволяющих производить мониторинг миокарда во время острой ишемии, можно назвать метод лазерно-индуцированной люминесценции (Renault et al., 1985). В основе метода лежит регистрация изменений клеточной аутофлуоресценции, вызванных восстановлением пиридиновых нуклеотидов во время ишемии (Chance et al., 1962, 1965).

Известно, что одним из основных источников клеточной аутофлуоресценции являются нуклеотиды – пиридиновые и флавиновые, находящиеся в цитозоле и митохондриях (Riess et al., 2002). Минимальные или краткосрочные изменения редокс-состояния этих молекул приводят к изменению их флуоресценции. В цитоплазме клеток преобладают окисленные формы НАД⁺ и восстановленные формы НАД(Ф)Н. Накопление НАДН в митохондриях обеспечивает градиент для

транспорта электронов в дыхательной цепи и окислительное фосфорилирование, поэтому в отличие от цитоплазматического соотношения НАД⁺/НАДН в митохондриях на два порядка меньше. В условиях гипоксии накопление НАДН выступает основным признаком активации анаэробного гликолиза (Riess et al., 2002; Brachmanski et al., 2004).

Митохондриальная дисфункция приводит к увеличению продукции свободных радикалов и развитию окислительного стресса (Grivennikova, Vinogradov, 2006), причем и НАДН, и НАД(Ф)Н могут инициировать перекисное окисление липидов, связанное с митохондриальной продукцией активных форм кислорода в кардиомиоцитах *in vitro* (Takayanagi et al., 1980). Интересно, что развитие окислительного стресса стимулирует окисление флавиновых нуклеотидов, а осцилляции концентраций митохондриальных НАДН и ФАД соответствуют осцилляциям внутримитохондриального кальция и митохондриального мембранного потенциала (Brachmanski et al., 2004). В условиях продолжающейся гипоксии клеток, вплоть до гибели, интенсивность флуоресценции клеточного НАДН и НАД(Ф)Н снижается, что отражает глобальное изменение клеточного метаболизма (Xia et al., 2009).

Момент начала увеличения аутофлуоресценции вследствие накопления НАД(Ф)Н определяется балансом между доставкой кислорода в клетки и интенсивностью потребления энергии. Для миокарда этот баланс определяется, с одной стороны, адекватностью кровоснабжения и функциональной активностью внутриклеточного миоглобина как «депо» кислорода (Wittenberg, 2003), а с другой стороны, активностью энергопотребляющих процессов (сокращение кардиомиоцитов, работа АТФ-зависимых кальциевых транспортеров и калиевых каналов, биосинтетиче-

ские процессы) и НАД(Ф)Н-утилизирующих ферментов (например, НАД(Ф)Н-оксидазы). Известно, что использование при кардиохирургических вмешательствах кардиopleгии базируется на разобщении электромеханического сопряжения и редуцировании уровня клеточного метаболизма, что дополнительно достигается применением гипотермии. Такой эффект обусловлен использованием деполяризирующего раствора, нарушающего механизмы высвобождения кальция из внутриклеточных депо в цитоплазму и поступление кальция из внеклеточного пространства в цитозоль. Таким образом, применение кардиopleгии в условиях остановленного сердца позволяет существенно сократить активность энергопотребляющих процессов в миокарде, в результате чего сигнал аутофлуоресценции НАДН миокарда в реальной кардиохирургической практике отражает, в основном, степень нарушения электронтранспортных процессов в митохондриях.

Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию флуоресценции миокарда, обширный накопленный экспериментальный материал и понимание основных биохимических и патологических процессов, протекающих в ткани миокарда при острой ишемии, возможности использования флуоресцентной диагностики для контроля состояния миокарда при ишемии в условиях кардиопротекции изучены мало. Т. Nishioka (1984) одним из первых использовал флуоресцентный метод контроля миокарда при кардиopleгической защите. Контроль флуоресценции НАДН осуществлялся устройством Omron Redoximeter. Была обнаружена связь между динамикой флуоресценции НАДН в реперфузионный период и длительностью, температурой и типом кардиopleгии. При этом полное и быстрое восстановление уровня флуоресценции относили к отсутствию

необратимых изменений в миокарде, а неполное восстановление – к наличию таковых. К недостаткам рассмотренного флуоресцентного метода контроля можно отнести то, что данные о состоянии миокарда могут быть получены только в реперфузионном периоде. Хотя, как следует из результатов измерения уровня АТФ, монотонные биохимические изменения происходят в течение всего периода ишемии. Как следует из приведенных автором диаграмм динамики флуоресценции во время ишемии, изменений в ее интенсивности не было обнаружено. По всей видимости, точность измерений интенсивности флуоресценции не позволяла зарегистрировать такие изменения.

Динамика лазер-индуцированной флуоресценции НАДН в тканях миокарда при возбуждении излучением азотного лазера 337 нм при последовательной окклюзии и холодной кардиопротекции представлена в работе (Norvath et al., 1994). В ней показаны достоверные различия в динамике и амплитуде флуоресценции в различных зонах миокарда (зона инфаркта, пограничная и нормальная) в периоде окклюзии. Однако, как и в предыдущей работе, достоверных различий в динамике и амплитуде флуоресценции во время ишемии в указанных зонах не было обнаружено.

Регистрация излучения с длиной волны 460 нм при возбуждении 350 нм использовалась для мониторинга концентрации НАДН (Riess et al., 2004). Для устранения артефактов, связанных с перемещением оптоволоконного зонда относительно объекта, использовалась дополнительно регистрация интенсивности флуоресценции на длине волны 405 нм. Уровень НАДН оценивался по величине отношения интенсивностей I_{465}/I_{405} . Причем выбор длины волны 405 нм в качестве внутреннего эталона аргументировался ссылкой на работу (Brandes, Bers, 1996) как необходимый для

учета альтерации поглощения миоглобина во время гипоксии. В работе показано отличие динамики флуоресценции НАДН при ишемии при разных температурах, однако динамические параметры не были детально исследованы.

Динамика концентрации НАДН при холодной кардиопротекции при ишемии оценивалась с помощью регистрации флуоресценции на двух длинах волн – 405 и 460 нм при возбуждении излучением с длиной волны 350 нм (An et al., 2005). Был обнаружен быстрый рост люминесценции за время менее 5 мин с последующим монотонным спадом в течение всего периода ишемии (2 ч). Любопытно, но динамика люминесценции другого индикатора редокс-потенциала ФАД (возбуждение 480 нм, люминесценция 540 нм), приведенная в данной работе, имела качественное отличие. Так, в начале ишемии происходил быстрый (в течение 5 мин) спад люминесценции, затем следовал медленный спад в течение 30 мин, стационарный уровень – 1 ч и медленный подъем до окончания исследования. Авторы также не приводят значений динамических переменных.

Аналогичная методика оценки динамики изменения уровней НАДН и ФАД при ишемии миокарда при использовании кардиopleгии гиперкалемическим раствором и лидокаином приведена в работе (Aldakkak et al., 2009). Показаны отличия в динамике люминесценции НАДН при использовании кардиopleгии и без таковой. При этом имеются достоверные отличия в уровне люминесценции во время ишемии при использовании кардиopleгии и без нее. Динамика люминесценции ФАД сходна с описанной в работе (An et al., 2005), однако на интервале ишемии не обнаруживаются достоверные отличия между интенсивностью и динамикой люминесценции ФАД с использованием кардиopleгии и без нее, а

отличия обнаруживаются только на этапе реперфузии.

В работе (Brachmanski et al., 2004) исследована динамика люминесценции НАДН во время ишемии при использовании кардиopleгии раствором Custodiol при комнатной температуре. Уделено внимание начальному этапу «блокады», определена постоянная времени роста люминесценции НАДН, которая составляла 88 с, в то время как без использования кардиopleгии – 43 с. Авторы указывают на то, что при использовании кардиopleгии интенсивность люминесценции НАДН достигает насыщения в течение 4-5 мин, но не проводят анализа динамики на более длительном интервале ишемии, хотя диаграмма для этого периода свидетельствует о медленном незначительном монотонном росте на интервале времени ишемии вплоть до 30 мин.

Неоднозначность выбора длин волн для оценки динамики уровней НАДН и гемопротеидов, а также для внутреннего эталона при анализе динамики ишемии с использованием кардиopleгии, имеющая место в выше рассмотренных работах, а также скудность данных по динамике люминесценции миокарда в периоде острой ишемии при использовании кардиopleгии побудили нас к проведению нашей экспериментальной работы.

Цель исследования – изучить информативность метода оптической биопсии для оценки интегрального показателя метаболизма миокарда в период, предшествующий необратимому повреждению клеток, определить кинетику метаболического индекса остановленного миокарда в условиях присутствия и отсутствия депо кислорода (гемопротеиды), соотнести данные спектрального анализа, морфологической картины и патобиохимических процессов в кардиомиоцитах при острой аноксии для оценки возможности применения метода оптической биопсии в кардиохирурги-

ческой практике для задач интраоперационного кардиомониторинга.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 59 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все эксперименты выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными.

Вводный наркоз осуществляли ингаляционным введением лабораторному животному паров фторотана при дозированной подаче кислорода 0,4 л/мин, основной наркоз проводили кетамин (2,5 мг). Доступ к сердцу животного осуществляли посредством торакотомии, после перикардотомии зажимом Бильрота пережимался сосудистый пучок (аорта, легочная артерия, верхняя полая вена) без выделения каждого из сосудов. Состояние ишемии миокарда вызывали наложением зажима на аорту. Для кардиopleгии и остановки сердца в левый желудочек вводили кардиopleгический деполяризующий раствор (4 мл) в соотношении с кровью 1:4. Состав кардиopleгического раствора НИИПК: NaCl 0,9 % – 200 мл; лидокаин 50 мг; KCl 4 % – 10 мл; NaHCO₃ – 10 мл, раствор MgSO₄ 25 % – 2,5 мл, папаверина гидрохлорида 1 % – 1 мл, преднизолон 1,5 мл. Время введения раствора в полость левого желудочка составляло в среднем 60-100 с. В экспериментах с использованием модуляторов гемопротеидов применяли кардиopleгический раствор с дитионитом натрия, выступающим в роли восстановителя гемо- и миоглобина, или кардиopleгический раствор, насыщенный CO, выступающим в качестве индуктора образования карбоксигемоглобина.

Аутофлуоресценцию ткани миокарда регистрировали *in situ* с помощью экспериментального лазерного спектрофлуориметра

с оптоволоконной доставкой излучения (Попов и др., 2005; Popov et al., 2006). Для возбуждения флуоресценции использовали высокоэффективный малогабаритный азотный лазер с магнитным сжатием импульса возбуждения (Provorov, Salmin, 1993; Provorov et al., 2005). Для записи спектров флуоресценции применяли контактный метод: после наложения зажимов на аорту оптический зонд накладывался на участок эпикарда площадью 2 мм², плотно прижимался к нему и оставался неподвижным в течение всего периода записи. Спектры флуоресценции записывали в интервале 380-550 нм. Регистрация спектров продолжалась 20 минут. От участка эпикарда каждого животного было записано 40 спектров флуоресценции (по 2 спектра в минуту).

Образцы ткани миокарда для биохимических и морфологических исследований были получены в контрольной группе животных, а также в экспериментальной группе животных через 250 и 500 с после начала ишемии. Приготовление гомогената ткани миокарда осуществляли с использованием гомогенизатора Silent Crusher M (Heidolph, Германия). Суммарную *НАД(Ф)Н-оксидазную активность* измеряли в гомогенате миокарда с использованием кинетики флуоресценции (спектрофлуориметр SOLAR SM2203, Беларусь) при возбуждении флуоресценции на длине волны 340 нм и выражали в единицах активности на мг белка ткани. *Концентрацию лактата* в гомогенате ткани миокарда измеряли методом, основанным на дегидрировании лактата в присутствии лактатдегидрогеназы и НАД⁺ со спектрофотометрической регистрацией количества образовавшегося НАДН. В состав реакционной смеси входили гомогенат ткани, 1 М глициновый буфер (рН 9,5), 0,56 М гидразина сульфат (рН 8,6), 0,1 М НАД⁺ (рН 6,75), через 5 мин (после перемешивания) при +37 °С добавляли 2,7 единиц/мкл лактатде-

гидрогеназы, измеряли оптическое поглощение при 340 нм, по калибровочному графику определяли концентрацию лактата (ммоль/г). *Концентрация малонового диальдегида* как продукта перекисного окисления липидов в гомогенате ткани оценивалась по стандартному методу с тиобарбитуровой кислотой (Журавлева, Суплютов, 2008). Для оценки морфологических изменений в миокарде применяли микроскопию тонких срезов межжелудочковой перегородки в поляризирующем свете (x900).

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики и проверки гипотезы о нормальности распределения. Гипотеза о нормальности распределения в пределах выборки проверяли графически с использованием функции НОРМСТОБР(Р) пакета MS Excel. Коэффициент корреляции линейной регрессии составлял не хуже $R^2 > 0,95$. Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего. Сравнение средних значений концентраций лактата с исходным уровнем осуществляли с помощью Т-теста.

Результаты

Мы установили, что в динамике ишемии миокарда развиваются необратимые изменения в кардиомиоцитах, характеризующиеся морфологическим повреждением клеток. Так, в первые секунды после начала ишемии кардиомиоциты имеют обычную форму и поперечную исчерченность, редко встречаются участки пересокращения, соотношение площади анизотропных и изотропных дисков миофибрилл изменяется от 1:2 (в норме) до 1:1. К 250-й секунде ишемии миокарда значительно увеличивается толщина анизотропных дисков, присутствует деформация миофибрилл. К 500 секунде ишемии миокарда в ткани ре-

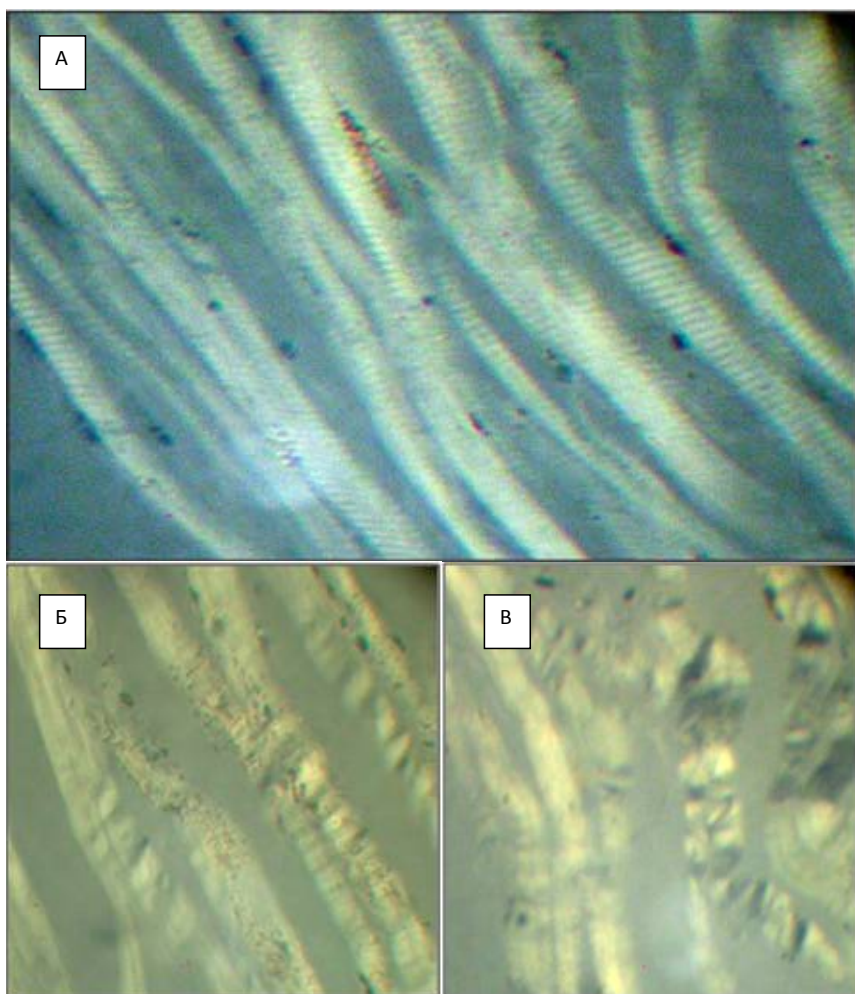


Рис. 1. Морфологическая картина миокарда крыс при ишемии. А Начало ишемии: кардиомиоциты имеют обычную форму и поперечную исчерченность. Б 250 с: наряду с нормальными кардиомиоцитами имеются участки пересокращения (контрактуры). В 500 с: множественные участки «волнообразной» деформации и миолизиса

гистрируются множественные участки деформации миофибрилл и миолиза (рис. 1).

При возбуждении флуоресценции на длине волны 337 нм усредненный спектр флуоресценции миокарда крыс имел типичную для аутофлуоресценции живых тканей форму с максимумом на длине волны 470 нм, что соответствует максимуму флуоресценции свободной формы НАД(Ф)Н. Мы осуществляли запись спектров флуоресценции миокарда в интервале от 380 до 550 нм с шагом 10 нм, с временными промежутками 30 с

в течение 20 мин ишемии. Первым этапом работы явилось исследование динамики всего спектра люминесценции миокарда в периоде острой ишемии. При этом оценивали изменения в нормированных спектрах. Нормировку для каждого исследуемого животного осуществляли с помощью значения средней мощности сигнала по всему диапазону регистрации флуоресценции. Для усреднения по всей выборке опытов кривые изменения интенсивности флуоресценции на каждой из длин волн спектрального интервала норми-

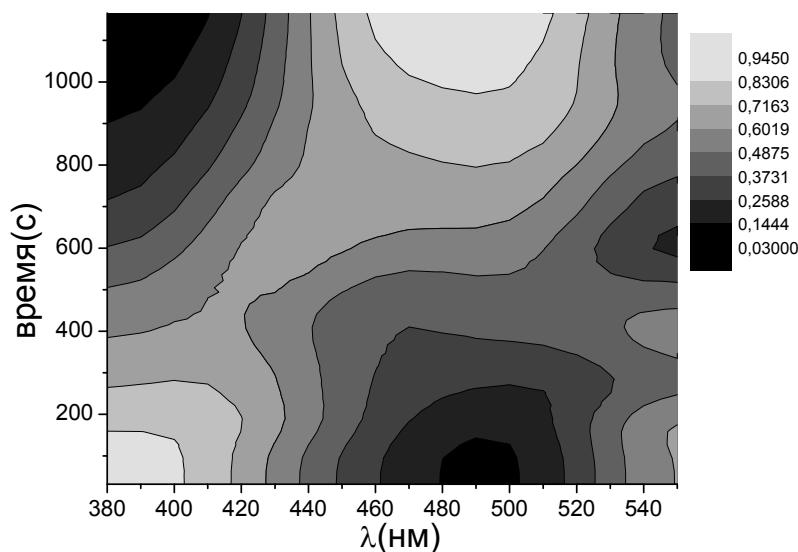


Рис. 2. Карта нормированных вариаций спектров люминесценции миокарда крыс во время ишемии при использовании кардиоopleгии (n=10)

ровали так, чтобы максимальное значение равнялось 1, а минимальное 0. Усредненная и сглаженная двумерная карта изменений спектров люминесценции от времени приведена на рис 2.

По полученной карте (рис. 2) построен график зависимости относительной дисперсии от длины волны к 20 минуте ишемии (рис. 3). На основании положения максимумов и минимумов на полученной кривой для оценки динамики в спектре люминесценции миокарда можно выбрать следующие реперные длины волн – 390, 440, 490, 540 нм. При этом интенсивности люминесценции на длинах волн 450 и 540 соответствуют наименее изменчивым участкам спектра люминесценции и могут быть использованы в качестве внутреннего эталона. Интенсивность на длине волны 490 нм, имеющая положительную динамику изменения во время ишемии, интерпретируется нами как изменение концентрации НАДН, а интенсивность на длине волны 390 нм, имеющая отрицательную динамику, – как изменение концентрации окис-

ленных гемопротеидов. Соответственно, при учете нормировки на интенсивность люминесценции внутреннего эталона фактор, описывающий НАДН:

$$\eta_{NADH} = \frac{I_{490}}{I_{440} + I_{540}},$$

а фактор, описывающий оксигемопротеиды:

$$\eta_{HbO} = \frac{I_{390}}{I_{440} + I_{540}}.$$

Нами также предложен комплексный параметр, учитывающий как изменение концентрации НАДН, так и оксигемопротеидов – индекс жизнеспособности (Viability Index):

$$\eta_{VIA} = \frac{I_{390}}{I_{490}}.$$

Вторым этапом исследований была оценка динамики флуоресценции на реперных длинах волн при различных модификациях состава кардиоopleгического раствора веществами, влияющими на состояние гемопротеидов: дитионитом натрия и монооксидом

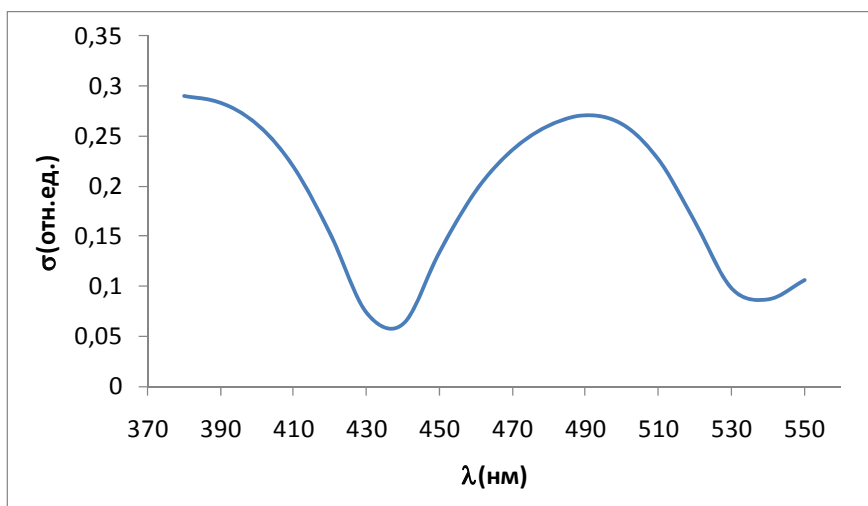


Рис. 3. Спектр стандартных отклонений нормированных вариаций интенсивности люминесценции миокарда крыс к моменту 20 мин ишемии при использовании кардиоплегии

углерода. Контрольной была группа со стандартной кардиопротекцией кардиоплегическим раствором.

Для оценки динамических параметров мы ограничились рассмотрением начального этапа ишемии (20 мин), где изменения носили монотонный характер. Типичная нормированная кривая динамики концентрации оксигемопротейдов в контрольной группе представлена на рис. 4. Кривая динамики может быть надежно аппроксимирована суммой двух экспоненциальных функций. Причем указанная возможность с высоким коэффициентом корреляции $R^2 > 0,99$ выполняется для всех динамических кривых. Как видим, большую амплитуду имеет «медленная» экспонента (A_2). Значения постоянной времени «медленной» экспоненты для динамики концентрации НАДН, гемопротейдов и индекса жизнеспособности (VIA) при различных видах кардиоплегии приведены в табл. 1

Дитионит натрия $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$, будучи сильным восстановителем, способен восстанавливать оксигемопротейды, цитохромы и

пиридиновые коферменты. Соответственно, можно ожидать усиления ишемических изменений в ткани миокарда при его использовании в кардиоплегическом растворе, что выразилось в уменьшении соответствующих постоянных времени (табл.1). В противоположность эффектам дитионита натрия мы наблюдали увеличение постоянных времени при включении в состав кардиоплегического раствора СО (табл.1).

Как видим из табл. 1, для контрольной группы характерен диапазон постоянных времени 460-500 с. Для сравнения мы проанализировали динамику изменения уровня малонового диальдегида (МДА) в ткани (рис. 5). Данные на рисунке приведены для логарифмов отношений концентраций на разных этапах ишемии. Очевидно, что на исследуемом интервале происходит монотонное снижение уровня МДА, что свидетельствует об истощении субстратов окисления либо об активизации антиоксидантной системы в первые минуты острой ишемии. Из значения коэффициента наклона линии тренда следует, что постоянная времени t , равная 516 с, близка по

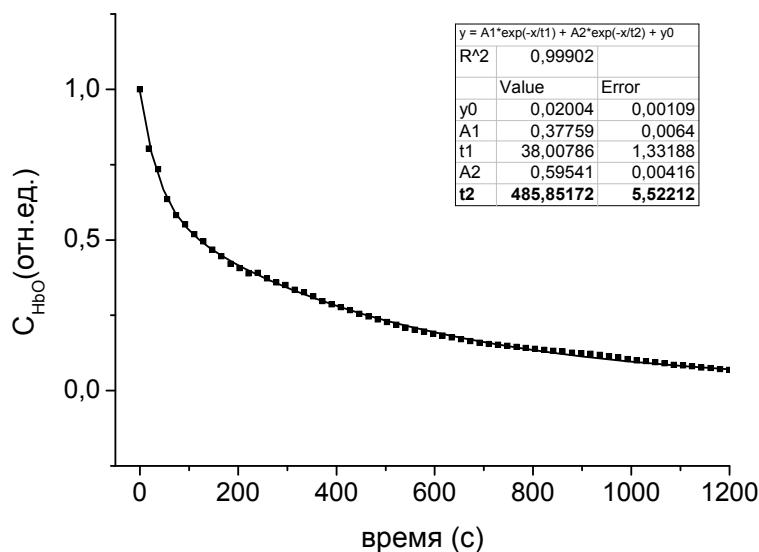


Рис. 4. Динамика пула оксигемопroteидов в миокарде при ишемии для контрольной группы (плегия поляризующим р-ром, n=10). Точки – экспериментальные значения, сплошная линия – аппроксимация суммой двух экспонент. Параметры аппроксимации указаны в легенде диаграммы

Таблица 1. Постоянные времени «медленной» экспоненты для различных показателей ишемии при модификации состава кардиоплегического раствора

| | Плегический раствор | Плегический раствор + дитионит натрия | Плегический раствор+CO |
|------|---------------------|---------------------------------------|------------------------|
| NADH | 492±5 (с) | 425±10 (с) | 853±20 (с) |
| Hb | 486±6 (с) | 430±10 (с) | 650±5 (с) |
| VIA | 465±5 (с) | 406±10 (с) | 654±6 (с) |

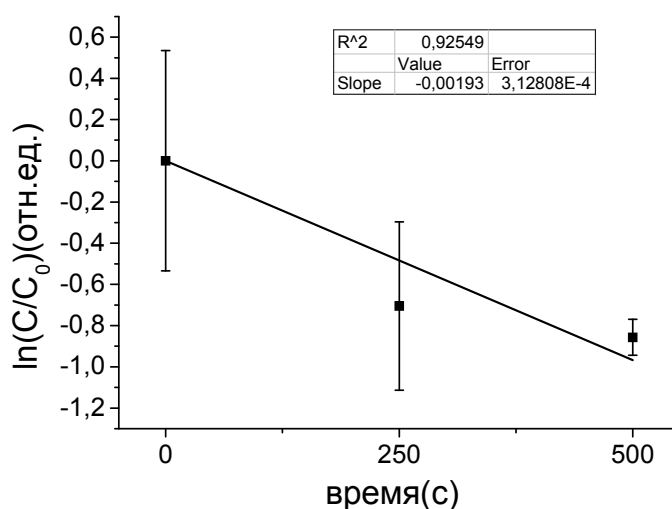


Рис. 5. Динамика относительной концентрации МДА в миокарде крыс (n=10 для каждого значения времени) во время ишемии на фоне кардиopleгии

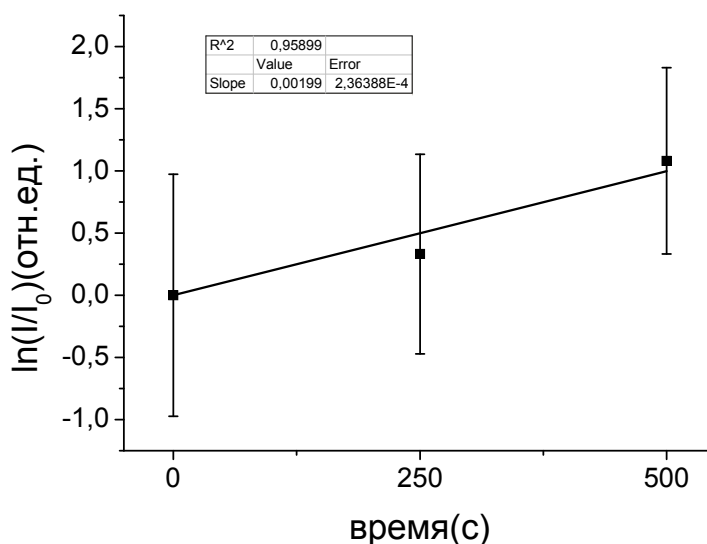


Рис. 6. Активность НАДФН-оксидазы в миокарде крыс (n=10 для каждого значения времени) во время ишемии миокарда на фоне кардиopleгии

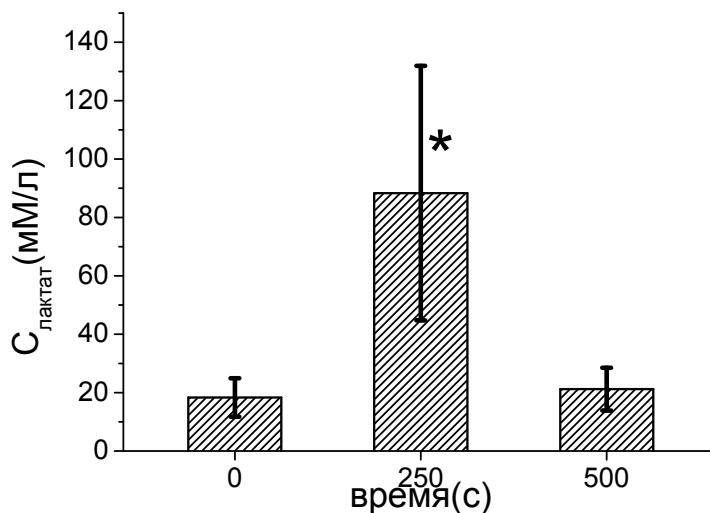


Рис. 7. Концентрация лактата в ткани миокарда крыс (n=10 для каждого значения времени) во время ишемии миокарда на фоне кардиopleгии. * – достоверность отличий между группами при P<0,05

значению к постоянным времени НАДН и Нб, приведенным в табл. 1.

Динамика активности НАД(Ф) Н-оксидазы свидетельствует о монотонном росте на исследуемом интервале (рис. 6). Причем значение постоянной времени t=502 с также близко к полученным для НАДН, Нб,

МДА. Рост активности НАДН-оксидазы при ишемии – хорошо известный феномен, приводящий к активной продукции свободных радикалов. Разнонаправленное изменение активности фермента и накопления продуктов перекисного окисления липидов, а именно МДА (рис. 5), подтверждает предположение

об эффективном подавлении окислительного стресса в первые минуты ишемии компонентами антиоксидантной системы.

Изменение концентрации лактата в ткани миокарда во время ишемии представлено на рис. 7. Очевиден двухфазный характер изменения активности реакций гликолиза: начальная активация анаэробного гликолиза и гиперпродукция лактата, сменяющиеся подавлением реакций гликолиза при накоплении НАДН, лактата и истощении НАД⁺ к 500-й сек ишемии.

Обсуждение

Значительная часть исследований по изучению аутофлуоресценции НАД(Ф)Н для оценки состояния миокарда и изолированных кардиомиоцитов сфокусирована на регистрации аккумуляции НАД(Ф)Н в ткани или клетках как основном проявлении гипоксического или ишемического повреждения (Fomin et al., 2003; Brachmanski et al., 2004). В некоторых исследованиях была предпринята попытка оценить влияние гемопротеинов миокарда (миоглобин, цитохромы митохондрий) на оптические параметры этой ткани (Arai et al., 1999; Leisey et al., 1994), однако данные о влиянии лигандов гемопротеинов на динамику флуоресценции пиридиновых и флавиновых нуклеотидов миокарда при ишемии с использованием кардиopleгии в литературе практически отсутствуют.

Мы установили, что применение лазерно-флуоресцентного анализа миокарда в экспериментальной модели, максимально приближенной к реальной клинической ситуации (кардиохирургическое вмешательство с кардиopleгией и остановкой сердца), позволяет адекватно зарегистрировать и оценить повреждения клеток, ассоциированные с морфологическими и патобиохимическими изменениями. Мы впервые показали, что по-

вышение восстановительного потенциала кардиopleгического раствора путем введения в его состав дитионита натрия оказывает негативное влияние на динамику спектра люминесценции миокарда, тогда как присутствие в составе кардиopleгического раствора монооксида углерода оказывает кардиopleгический эффект, регистрируемый по увеличению постоянных времени. Обнаруженный нами в эксперименте эффект СО в отношении жизнеспособности ткани миокарда вполне соответствует литературным данным о протективном действии СО, реализуемом за счет активации р38 MAPK, Akt, синтазы оксида азота (Fujimoto et al., 2004), регуляции транспорта ионов (Varadi et al., 2007) в кардиомиоцитах.

Эти данные косвенно подтверждают предположения о важной роли миоглобина в качестве внутриклеточного депо и переносчика кислорода к митохондриям в ответ на формирование дефицита кислорода как конечного акцептора электронов в дыхательной цепи митохондрий (Wittenberg, Wittenberg, 2003). Эти результаты существенно дополняют известные литературные данные о картировании степени оксигенации миокарда с помощью спектроскопии в ближнем инфракрасном свете (Nighswander-Rempel et al., 2002).

Особенности экспериментальной модели (кардиopleгия и остановка сердца) позволили нам оценить характер флуоресценции НАД(Ф)Н при значительном торможении энергопотребляющих процессов в миокарде, а также при нарушении доставки кислорода в клетки из-за повреждения механизма облегчения диффузии кислорода в интерстициальное пространство при отсутствии ритмических сокращений миокарда и нарушении коронарного кровотока. Наши данные подтвердили, что флуоресценция НАД(Ф)Н является чув-

ствительным индикатором утилизации кислорода в миокарде (Stoner et al., 2004). Зарегистрированное нами изменение пула НАД(Ф)Н клеток предшествовало развитию необратимой контрактуры и лизиса миофибрилл, аккумуляции лактата и нарушению НАД(Ф)Н-оксидазной активности. С учетом литературных данных о том, что уровень НАДН и НАД⁺ в цитозоле кардиомиоцитов контролирует высвобождение кальция из внутриклеточных депо (Zima et al., 2004), регистрация флуоресценции пиридиновых нуклеотидов способна дать существенную информацию о возможности восстановления сократительной активности клеток после глобальной ишемии сердца.

Регистрируемые с помощью метода оптической биопсии изменения кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н миокарда соответствуют индуцированным ишемией нарушениям энергетического метаболизма (интенсификация анаэробного гликолиза, митохондриальная дисфункция), морфологическим альтерациям (контрактура и лизис миофибрилл) и отражают сохранность кислород-транспортной и кислород-депонирующей функции гемопротеидов в ткани.

Примечательно, что изменение отношения НАД⁺ и НАДН в клетках миокарда имеет патогенетическое значение для нарушения функционирования риаудиновых рецепторов 2-го типа и, соответственно, приводит к нарушению высвобождения и захвата Ca²⁺ из внутриклеточных депо (саркоплазматического ретикулума) (Cherednichenko et al., 2003;

Zima et al., 2004). Это позволяет нам считать патогенетически взаимосвязанными событиями аккумуляцию НАДН и развитие контрактуры кардиомиоцитов на 250-500-х секундах ишемии. Таким образом, сопоставление данных спектрального анализа, морфологической картины и патобиохимических процессов в кардиомиоцитах при острой ишемии свидетельствует о высокой информативности метода оптической биопсии для регистрации обратимых и необратимых изменений в ткани миокарда при ишемии. В наших условиях эксперимента 500-я секунда с момента наступления ишемии (в условиях защиты миокарда кардиоплегическим раствором) являлась точкой наступления необратимых структурно-функциональных изменений.

Заключение

Метод оптической биопсии позволяет регистрировать метаболические изменения в миокарде, проявляющиеся нарушением пула пиридиновых нуклеотидов, изменением кислород-транспортной и кислород-депонирующей функции гемопротеидов, активности НАД(Ф)Н-утилизирующих процессов и развитием контрактуры и гибели кардиомиоцитов.

Регистрация метаболического индекса в автоматическом режиме с использованием лазерно-флуоресцентного анализа в динамике кардиохирургической операции позволит определить начало развития ишемического повреждения клеток и вовремя скорректировать протокол защиты миокарда.

Работа выполнена при поддержке КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (2010).

Список литературы

Журавлева Т.Д., Суплютов С.Н. (2008) Сравнительная оценка методов исследования содержания в крови малонового диальдегида (ТБК-активных веществ). Клини. лаб. диагн. 9: 56а-56

Ларионов П.М., Литасова Е.Е., Малов А.Н., Мандрик М.М., Маслов Н.А., Оришич А.М., Федюк Ю.А. (2002) Исследование жизнеспособности тканей сердца методами лазерно-индуцированной флуоресценции и флуоресцентных зондов. Патол. кровообр. кардиохир. 2: 61-66.

Попов А.Ю., Салмин В.В., Салмина А.Б., Фурсов А.А., Степаненко А.В., Соколович А.Г., Манторова Н.С., Ребенкова А.В., Проворов А.С. (2005) Спектрофлуориметрический метод оценки ишемии миокарда. Вестник КрасГУ, серия Физико-математические науки. 4: 89-92.

Aldakkak M., Stowe D.F., Lesnefsky E.J., Heisner J.S., Chen Q., Camara A.K.S. (2009) Modulation of Mitochondrial Bioenergetics in the Isolated Guinea Pig Beating Heart by Potassium and Lidocaine Cardioplegia: Implications for Cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 54: 298-309.

An J., Camara A.K.S., Rhodes S.S., Riess M.L., Stowe D.F. (2005) Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 288: H2620-H2627.

Arai A.E., Kasserra C.E., Territo P.R., Gandjbakhche A.H., Balaban R.S. (1999) Myocardial oxygenation in vivo: optical spectroscopy of cytoplasmic myoglobin and mitochondrial cytochromes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 46: H683-H697.

Bigio I.J., Mourant J.R. (2007) Optical Biopsy in *Encyclopedia of Optical Engineering*. London: Taylor & Francis, 1577-1593.

Brachmanski M., Gebhard M.M., Nobiling R. (2004) Separation of fluorescence signal from Ca²⁺ and NADH during cardioplegic arrest and cardiac ischemia. *Cell Calcium* 35: 381-391.

Brandes R., Bers D.M. (1996) Increased work in cardiac trabeculae causes decreased mitochondrial NADH fluorescence followed by slow recovery. *Biophys. J.* 71: 1024-1035.

Chance B., Cohen P., Jobsis F., Schoener B. (1962) Intracellular Oxidation-Reduction States in vivo. *Science*. 3529: 499-508.

Chance B., Williamson J., Jamieson D., Schoener B. (1965) Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart. *Biochem. J.* 341: 357-377.

Cherednichenko G., Zima A.V., Feng W., Schaefer S., Blatter L.A., Pessah I.N. (2003) NADH Oxidase Activity of Rat Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Regulates Calcium-Induced Calcium Release. *Circ Res.* 01.RES.0000115554.65513.7C.

Fomin V.M., Karas'kov A.M., Larionov P.M., Malov A.N., Maslov N.A., Orishich A.M. (2003) Determination of myocardium viability on the basis of the spectra of laser-induced fluorescence. *Dokl. Biol. Sci.* 391: 296-298.

Fujimoto H., Ohno M., Ayabe S., Kobayashi H., Ishizaka N., Kimura H., Yoshida K.-i., Nagai R. (2004) Carbon Monoxide Protects Against Cardiac Ischemia--Reperfusion Injury In Vivo via MAPK and Akt--eNOS Pathways. *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.* 24: 1848-1853.

Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(5-6): 553-561.

Horvath K.A., Schomacker K.T., Lee C.C., Cohn L.H. (1994) Intraoperative myocardial ischemia detection with laser-induced fluorescence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107: 220-225.

Khabbaz K.R., Zankoul F., Warner K.G. (2001) Intraoperative metabolic monitoring of the heart: II. Online measurement of myocardial tissue pH. *Ann. Thorac. Surg.* 72(6): 2227-2233.

Leisey J.R., Scott D.A., Grotyohann L.W., Scaduto R.C. (1994) Quantitation of myoglobin saturation in the perfused heart using myoglobin as an optical inner filter. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 36: H645-H653

Mair J., Hammemer-Lercher (2005) Markers for perioperative myocardial ischemia: what both interventional cardiologists and cardiac surgeons need to know. *Heart Surg. Forum* 8(5): E319-E325.

Newton R. C., Kemp S. V., Shah P. L. et al. (2011) Progress toward optical biopsy: bringing the microscope to the patient. *Lung.* 189: 111-119.

Nighswander-Rempel S.P., Shaw R.A., Mansfield J.R., Hewko M., Kuprianov V.V., Mantsch H.H. (2002) Regional variations in myocardial tissue oxygenation mapped by near-infrared spectroscopic imaging. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34: 1195-1203.

Nishioka T. (1984) Basic and Clinical Studies of Cardioplegia on Myocardial Metabolism. *Acta Medica Kinki University.* 9: 217-233.

Popov A.Y., Salmin V.V., Fursov A.A., Stepanenko A.V., Sokolovich A.G., Salmina A.B., Rebenkova A.A., Makarov R.A., Provorov A.S. (2006) Automated laser spectrofluorimeter for monitoring of myocardial metabolism. *Proceedings of SPIE.* 6284: 62840J.

Provorov A.S., Salmin V.V. (1993) Compact N₂ laser with magnetic pulse compression. *Quantum Electronics.* 23: 527-529.

Provorov A.S., Salmin V.V., Salmina A.B., Fursov A.A., Stepanenko A.V., Sokolovich A.G., Lazarenko V.I., Rebenkova A.A., Popov A.Y., Testov A.A., Trusova E.Y., Mikhutkina S.V., Lopatina O.L., Olovyannikova R.Y. (2005) Pulsed gas lasers with longitudinal discharge and their application in medicine. *Laser Physics* 15(9): 1299-1302.

Renault G., Sinet M., Muffat-Joly M. et al. (1985) In situ monitoring of myocardial metabolism by laser fluorimetry: relevance of a test of local ischemia. *Lasers Surg. Med.* 5: 111-122.

Riess M.L., Camara A.K.S., Chen Q., Novalija E., Rhodes S.S., Stowe D.F. (2002) Altered NADH and improved function by anesthetic and ischemic preconditioning in guinea pig intact hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283: H53-H60.

Riess M.L., Camara A.K.S., Kevin L.G., An J., Stowe D.F. (2004) Reduced reactive oxygen species formation and preserved mitochondrial NADH and [Ca²⁺] levels during short-term 17 °C ischemia in intact hearts. *Cardiovascular Research.* 61: 580-590.

Stoner J.D., Angelos M.G., Clanton T.L. (2004) Myocardial contractile function during postischemic low-flow reperfusion: critical thresholds of NADH and O₂ delivery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H375-H380.

Takayanagi R., Takeshige K., Minakami S. (1980) NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol. *Biochem. J.* 192(3): 853-860.

Varadi J., Lekli I., Juhasz B., Bacskay I., Szabo G., Gesztelyi R., Szendrei L., Varga E., Bak I., Foresti R., Motterlini R., Tosaki A. (2007) Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sciences* 80: 1619-1626.

Wittenberg J.B., Wittenberg B.A. (2003) Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* 206: 2011-2020.

Xia W., Wang Z., Wang Q., Han J., Zhao C., Hong Y., Zeng L., Tang L., Ying W. (2009) Roles of NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cell death. *Curr. Pharmaceut. Design* 15: 12-19.

Zima A.V., Copello J.A., Blatter L.A. (2004) Effects of cytosolic NADH/NAD⁺ levels on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in permeabilized rat ventricular myocytes. *J.K. Physiol.* 555(3): 727-741.

Application of Fluorescence Spectroscopy for Assessment of Myocardial Ischemic Injury

**Vladimir V. Salmin^{a*}, Alla B. Salmina^b,
Alexander A. Fursov^b, Olga V. Frolova^b,
Dmitry I. Laletin^b, Maxim A. Fursov^b,
Gennady V. Yudin^b, Nataliya A. Malinovskaya^b,
Larissa D. Zykova^b and Alexander S. Provorov^a**

^a *Siberian Federal University,*

79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

^b *Krasnoyarsk State Medical University*

named after Prof. V.F.Voino-Yasenetsky,

1 P. Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022 Russia

Data of experimental assessment of a possibility to use laser-fluorescent analysis of myocardium for detecting alterations caused by ischemia under the conditions of cardiac surgery are presented. It is confirmed that the method of optical biopsy with Nitrogen laser (337 nm) allows registering metabolic changes in myocardium associated with alterations in pyridine nucleotides concentrations, dysfunction of hemoproteids, changes in the activity of NAD(P)H-utilizing enzymes, and development of contraction and death of cardiomyocytes.

Keywords: optical biopsy, myocardium, ischemia, nitrogen laser.
