

Ю.Д. Удалов¹, К.Г. Куликов²,
В.В. Панкратова², В.Н. Быков³

Исследование митохондриальной дисфункции у больных с инфарктом миокарда после хирургических вмешательств на органах брюшной полости

¹Городская клиническая больница № 40, Москва

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. В ходе исследования у 27 пациентов, прооперированных по поводу различных заболеваний органов брюшной полости, у которых в раннем постоперационном периоде развился острый коронарный синдром, выявляли митохондриальную дисфункцию в лимфоцитах периферической крови. Сравнивали изменения структуры и функции митохондрий в лимфоцитах и кардиомиоцитах, полученных при биопсии у всех обследованных пациентов снижалась активность митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, α -глицерофосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы. На фоне снижения активности ферментов митохондрий при цитохимическом исследовании регистрировали снижение количества гранул и изменение их качественных характеристик, что свидетельствовало о нарушении энергетического обмена в лимфоцитах. Функциональные нарушения сопровождались грубыми изменениями структуры митохондрий, выявляемые при электронно-микроскопическом исследовании. Имело место разрушение крист, снижение плотности митохондриального матрикса, появление кристаллоидных включений и полное разрушение органелл. Системный характер митохондриальной дисфункции, выявленной при анализе структуры и функции митохондрий лимфоцитов периферической крови, подтверждался при изучении состояния митохондрий кардиомиоцитов, полученных при биопсии. Функциональное и структурное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови на фоне развития постоперационного острого коронарного синдрома свидетельствует об энергетическом статусе кардиомиоцитов. Снижение активности ферментов митохондрий лимфоцитов и наличие в органеллах характерных цитохимических изменений может служить сигналом для начала патогенетической терапии, направленной на коррекцию нарушений биоэнергетического обмена.

Ключевые слова: операции на брюшной полости, острый коронарный синдром, митохондриальная дисфункция, ферменты энергетического обмена, лимфоциты, кардиомиоциты, морфометрия.

Введение. В раннем послеоперационном периоде у больных, перенесших оперативное вмешательство на органах брюшной полости, острый коронарный синдром (ОКС) может развиваться при следующих факторах риска: инфаркт миокарда в течение предшествующих 6 месяцев; сердечная недостаточность; нестабильная стенокардия напряжения; желудочковая экстрасистолия с частотой более 5 в минуту; частая предсердная экстрасистолия или более сложные нарушения ритма; возраст больных свыше 70 лет; гемодинамически значимый аортальный стеноз; экстренный характер операции (перфоративная язва, перитонит и др.) и общее тяжелое состояние. Сочетание любых трех состояний из первых шести свидетельствует о почти 50% вероятности развития послеоперационного инфаркта миокарда, отека легких, желудочковой тахикардии или смерти больного. Каждый в отдельности из трех последних факторов увеличивает риск данных осложнений на 1%, а любое сочетание двух из трех последних повышает риск до 5–15% [12, 13].

Инфаркт миокарда обычно развивается в первые шесть суток после операции, поэтому очень важно

выполнять электрокардиографию (ЭКГ) в 1, 3 и 6 суток после операции. К сожалению, не всегда удаётся вовремя скорректировать ту или иную сопутствующую патологию, что определяет необходимость проведения операции вне зависимости от общего состояния пациентов (особенно по срочным и экстренным показаниям). В этих условиях повышен риск развития острой коронарной недостаточности у прооперированных на органах брюшной полости. В первую очередь это относится к онкологическим пациентам (более старший возраст, большая частота встречаемости сопутствующей патологии) и молодым пациентам с острым панкреатитом или панкреонекрозом (высокая частота злоупотребления алкоголем). Летальный исход у больных ОКС в течение 2 недель после операций на животе составляет от 1,6 до 5,9%.

В течение нескольких последних десятилетий в медицине интенсивно развивается так называемое «метаболическое» направление, ставящее своей целью теоретический и прикладной анализ обменных процессов на различных уровнях как основу или фон для многих болезней [9, 11]. Ключевым звеном метаболи-

ческого комплекса являются митохондрии – органеллы, выполняющие жизненно важные для каждой клетки функции. Нарушения клеточного метаболизма, в основе которых лежит митохондриальная недостаточность (дисфункция), ведут к широкому спектру клинических проявлений. В настоящее время принято выделять два вида митохондриальной дисфункции (МД): первичную, как следствие врожденного генетического дефекта, и вторичную, возникающую при различных приобретенных заболеваниях, в том числе ОКС [2, 6].

Ю.А. Васюк с соавт. [3], И.В. Леонтьева с соавт. [6] показали, что активность ферментов лимфоцитов может отражать состояние ферментативного статуса клеток различных тканей организма. При экспериментальном моделировании инфаркта миокарда у собак [5] была выявлена корреляция активности митохондриальных ферментов – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), α -глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в ишемизированных кардиомиоцитах и в лимфоцитах периферической крови. Можно предположить, что метаболические нарушения в митохондриях миокарда при ОКС происходят не только в ишемизированных кардиомиоцитах, но и имеют системный характер и могут быть выявлены при исследовании митохондрий в лимфоцитах периферической крови.

Цель исследования. Выявление и определение степени выраженности МД при развитии ОКС у хирургических больных в раннем послеоперационном периоде, изучение подходов к ее медикаментозной коррекции и установление возможности применения цитохимического метода в оценке МД.

Материалы и методы. Основу исследования составили наблюдения за 27 хирургическими больными в возрасте $65 \pm 1,4$ лет, прооперированными по поводу острого холецистита (8), перфоративной язвы двенадцатиперстной кишки (7), панкреонекроза (6), перфорации опухоли толстой кишки (5), перфорации мочевого пузыря и перитонита (1) в Городской клинической больнице № 40 г. Москвы за период с 2009 по 2012 гг. У всех пациентов в раннем послеоперационном периоде развился ОКС, который подтверждали по результатам ЭКГ и путем выявления стандартных биохимических маркеров (тропонин Т и I, мозговой натрийуретический пептид, С-реактивный белок).

Определение вторичной МД проводили при ОКС у всех прооперированных больных и 27 здоровых добровольцев в возрасте от 46 до 69 лет, составивших контрольную группу. Цитохимическое выявление активности митохондриальных ферментов осуществляли наборами реактивов производства компании «Химтехмаш» и Федерального государственного унитарного предприятия «ИРЕА»: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), α -глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ), глутаматдегидрогеназы (ГДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) лимфоцитов периферической крови (методика Пирса в модификации Р.П. Нарциссова [8], с последующей визуальной и компьютерной морфометрией (пакет программ «Видеотест», методика В.С. Сухору-

кова, Е.В. Тозлиян [10]). Для определения активности фермента в популяции лимфоцитов подсчитывалось среднее количество гранул в 30 клетках.

С помощью последующей компьютерной телеметрии определяли количество депозитов, их размерные характеристики, такие как площадь, периметр, длина, ширина, средний габарит, средняя хорда, максимальный, минимальный и средний диаметры Фере, показатели формы, фактор формы эллипса, округлость, удлиненность, оптические параметры, такие как средняя яркость, отклонение яркости, минимальная и максимальная яркости, интервал яркости (разнородность), интегральная яркость, средняя оптическая плотность, интегральная оптическая плотность гранул. Оценку результатов компьютерной морфометрии проводили под светооптическим микроскопом (увеличение $10-15 \times 90$, масляная иммерсия). В каждом препарате число гранул формазана оценивали не менее чем в 50 лимфоцитах. Для компьютерного морфометрического анализа полученных цитохимических показателей использовали аппаратное и программное обеспечение пакета программ «Видео-Тест 4.0 Авто» (морфология). В настоящей работе оценивали и обрабатывали статистически все вышеперечисленные параметры для мелких, средних гранул и кластеров оцениваемых ферментов: СДГ, α -ГФДГ, ГДГ, ЛДГ, а также для гранул всех размеров в совокупности.

Основным размерным критерием в распределении гранул на мелкие, средние и кластеры являлась площадь гранул. Для мелких гранул этот показатель составил от 0,00 до 0,5 мкм², для средних – от 0,5 до 1,5 мкм² и для кластеров – от 1,5 до 100,0 мкм². Всего анализировали 87 параметров по каждому ферменту, всего – 348 параметров.

Для ультраструктурного анализа лимфоцитов образцы предварительно отцентрифугированной лейкоцезы венозной крови фиксировали в растворах глутарового альдегида и четырехокси осмия, заливали в эпон-аралдитовую смесь смол, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали при помощи электронного микроскопа «ЕМ-109».

Для выявления общих гистологических изменений применяли окраску замороженных и парафиновых срезов гематоксилином и эозином, а также окраску по Гомори-Энгела и Ван-Гизону. Для выявления активности отдельных ферментов и субстратов гистохимически выявляли СДГ по Нахласу, цитохромоксидазу по Берстону, гликоген по Шабадашу, кальций по Косса, липиды по Лизону [7].

Определение концентрации молочной и пировиноградной кислот проводили натошак. Принцип определения молочной кислоты основан на ее дегидрировании лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в присутствии никотинамиддинуклеотида (НАД). По количеству образовавшегося восстановленного никотинамиддинуклеотида (НАДН₂), определенное спектрофотометрически, судили о содержании молочной кислоты, т.к. реакция проходит стехиометрически – 1 моль НАД на 1 моль молочной кислоты дает 1 моль НАДН₂.

Принцип определения пировиноградной кислоты основан на ее восстановлении под влиянием ЛДГ до молочной кислоты. При этом на восстановление 1 моль пирувата расходуется 1 моль НАДН₂ и по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 340 нм можно судить об убыли НАДН₂ и, следовательно, о концентрации пировиноградной кислоты.

Оценку состояния процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови осуществляли путем определения содержания гидроперекисей (ГП), малонового диальдегида (МДА) и уровня антиокислительной активности плазмы крови. Первичный продукт ПОЛ – ГП липидов – исследовали по В.Б. Гаврилову и соавт. [4]. Для определения концентрации ГП липидов измеряли ультрафиолетовое поглощение липидных экстрактов крови. Исследование проводили на спектрофотометре «СФ-26». Вторичный продукт ПОЛ – МДА определяли в осадке β-липопротеидов плазмы крови по реакции между МДА и 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК), которая при высокой температуре и кислом значении pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы 2-ТБК [1].

Для оценки общего антиокислительного потенциала плазмы крови использовали методику определения антиокислительной активности (АОА), основанную на способности плазмы крови тормозить накопление ТБК-активных продуктов в суспензии желточных липопротеидов, взятой в качестве модельной основы окисления, и выражали в процентах [1].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что средняя активность СДГ у обследованных больных составила $16,54 \pm 0,71$ у.е. и оказалась ниже аналогичного показателя контрольной группы – $21,04 \pm 0,39$ у.е. Средняя активность ГФДГ у больных с ОКС составила $7,37 \pm 0,52$ у.е. и была достоверно ($p < 0,001$) ниже, чем у группы здоровых добровольцев – $14,21 \pm 0,61$ у.е. Средняя активность ГДГ у больных была равна $8,64 \pm 1,13$ у.е. и была достоверно ниже аналогичного показателя в группе контроля – $13,75 \pm 0,74$ у.е. Средняя активность ЛДГ в основной группе составила $12,81 \pm 0,52$ у.е., в группе контроля – $15,48 \pm 1,1$ у.е. ($p < 0,05$).

Для сравнительного анализа из всех цитохимических параметров лимфоцитов периферической крови, полученных с помощью компьютерной морфометрии, выбраны те, которые статистически наиболее достоверно различались между группами. Для фермента СДГ это оказались: среднее количество мелких и средних гранул ($p < 0,01$), СДГ процент мелких гранул от общего количества гранул ($p = 0,04$), отклонение яркости и интервал яркости всех видов гранул ($p = 0,003$ и $p = 0,001$ соответственно), средний диаметр Фере для всех гранул ($p = 0,039$), а также фактор формы эллипса кластеров ($p = 0,03$). Для фермента ГФДГ наиболее значимыми оказались: среднее количество всех, мелких и средних гранул ($p < 0,001$), ГФДГ процент кластеров от общего количества гранул ($p = 0,002$), фактор формы эллипса и

удлиненность всех видов гранул ($p = 0,01$ и $p = 0,009$ соответственно). Для фермента ГДГ статистически достоверно различными показателями оказались среднее количество всех изученных гранул, а также мелких и средних ($p < 0,001$), ГДГ процент кластеров от общего количества гранул ($p = 0,03$), фактор формы эллипса и удлиненность, средний диаметр Фере для всех гранул ($p = 0,003$, $p = 0,001$ и $p = 0,03$ соответственно). Также достоверно различными были отклонение яркости и интервал яркости всех видов гранул ($p = 0,03$ и $p = 0,04$ соответственно) и средняя оптическая плотность всех гранул ($p = 0,04$). Значимыми для данного фермента оказались такие показатели, как удлиненность средних гранул ($p = 0,01$), площадь, средний диаметр Фере и средняя оптическая плотность кластеров ($p = 0,02$, $p = 0,005$ и $p = 0,01$ соответственно). Для фермента ЛДГ такими показателями оказались среднее количество всех изученных гранул, а также мелких и средних ($p < 0,001$), площадь ($p = 0,01$), средний диаметр Фере ($p < 0,001$), фактор формы эллипса ($p = 0,03$), удлиненность ($p = 0,04$), отклонение яркости ($p = 0,03$) и интервал яркости ($p = 0,002$) всех видов гранул.

Таким образом, выраженные изменения, проявившиеся в виде значительного снижения количества гранул и изменения их качественных параметров (увеличения площади мелких гранул и кластеров, округления гранул, повышения оптической плотности), свидетельствующие о нарушении функции митохондрий и нарушении энергетического обмена, были характерны для всех больных с развившимся в раннем послеоперационном периоде ОКС.

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры лимфоцитов венозной крови выявило относительное увеличение размеров митохондрий, появление вытянутых форм с частым расположением в виде цепочек. Митохондрии лимфоцитов характеризовались наличием грубых ультраструктурных изменений, проявлявшихся частичным или полным разрушением крист, нарушением плотности матрикса, появлением кристаллоидных включений, а иногда и полным разрушением митохондрий. Митохондрии лимфоцитов условно здоровых добровольцев соответствовали традиционно описанному в литературе.

Из 27 биопсий мышечной ткани в 24 случаях диагноз митохондриальная недостаточность подтвержден морфологически. Феномен «рваных» красных волокон был выявлен у 20 пациентов. У 14 больных определялось снижение активности СДГ в мышечной ткани, у 10 – снижение активности цитохромоксидазы. У 20 больных имели место косвенные признаки МН в виде субсарколеммального накопления гранул кальция, липидов, гликогена. Электронно-микроскопическое исследование у 18 больных выявило достоверные ($p < 0,05$) изменения размеров митохондрий, их вакуолизацию и деструкцию крист.

Сравнительное исследование концентрации молочной и пировиноградной кислот в крови показало, что средний уровень лактата натощак у больных составил $2,07 \pm 0,09$ ммоль/л, что было достоверно ($p < 0,001$)

выше, чем в контрольной группе – $1,03 \pm 0,05$ ммоль/л. Концентрация пировиноградной кислоты натощак в крови у больных составила $0,15 \pm 0,04$ ммоль/л, что было достоверно ($p=0,03$) выше, чем в контрольной группе – $0,08 \pm 0,02$ ммоль/л.

Показано, что средний уровень первичного продукта ПОЛ – ГП липидов составил $2,351 \pm 0,17$ отн. ед./мл пл., что было достоверно ($p=0,01$) выше, чем в контрольной группе – $1,04 \pm 0,32$ отн.ед./мл пл. Содержание вторичного продукта ПОЛ –МДА составило $3,92 \pm 0,25$ нмоль/мл пл., что было достоверно ($p=0,003$) выше, чем в контрольной группе – $1,92 \pm 0,24$ нмоль/мл пл.

Заключение. Установлено, что у прооперированных больных с развившейся острой коронарной недостаточностью имеет место митохондриальная дисфункция. Отмечена большая информативность цитохимического метода при изучении митохондриальных дисфункций, сочетающего оценку функциональных (биохимических) и морфологических (топографических) критериев. Исследование ферментативной активности с учетом распределения ее в живой клетке дает значительное повышение информативности по сравнению с аналогичными исследованиями «в пробирке». Наличие характерных изменений показателей активности митохондриальных ферментов и структуры самих митохондрий служит обоснованием для проведения следующего этапа комплексного обследования с применением дополнительных методик для уточнения нозологической формы и своевременного назначения патогенетически оправданной терапии выявленных нарушений биоэнергетического обмена.

Литература

1. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб, 2000. – 103 с.
2. Васюк, Ю.А. Особенности систолической функции и ремоделирования у больных с артериальной гипертензией / Ю.А. Васюк, А.А. Козина, Е.Н. Юшук // Сердечная недостаточность. 2003. – Т. 4. № 2. – С. 79–85.
3. Васюк, Ю.А. Вторичная митохондриальная дисфункция при остром коронарном синдроме / Ю.А. Васюк [и др.]. – РФК. – 2007. № 1. – С. 41–47.
4. Гаврилов, В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. № 3. – С. 33–35.
5. Клембовский, А.И. Учение о митохондриальной патологии в современной медицине / А.И. Клембовский, В.С. Сухоруков // Клинические и патогенетические проблемы нарушений клеточной энергетики: Мат. I Всеросс. конф. М., 1999. – С. 28–30.
6. Леонтьева, И.В. Диагностика и лечение митохондриальной дисфункции при кардиомиопатиях у детей: пособие для врачей / И.В. Леонтьева, Ю.М. Белозеров, В.С. Сухоруков. – М., 2002. – 36 с.
7. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. М.: Мир, 1969. 645 с.
8. Нарциссов, Р.П. Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии / Р.П. Нарциссов // Педиатрия. – 1998. – № 4. – С. 101–105.
9. Солодовникова, И.М. Новообразование митохондрий в условиях аноксии: динамика процесса и исследование функциональной активности / И.М. Солодовникова [и др.] // Конф. по эл. микроскопии: тез. докл. XXI Росс. конф. Черноголовка, 2006. – С. 271.
10. Сухоруков, В.С. Энергодефицитный диатез у детей / В.С. Сухоруков, Н.В. Клейменова, Е.В. Тозляян. М.: Медпрактика-М, 2009. 28 с.
11. Beal, M.F. Mitochondria in neurogen eration / M.F. Beal // Mitochondrial disorders: from pathophysiology to acquired defects. New York: Springer, 2002. – P. 17–35.
12. Brealey, D. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock / D. Brealey [et al.] // Lancet. – 2003. № 360. – P. 219–223.
13. Brown, D.T. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes / D.T. Brown [et al.] // Am. j. hum. genet. 2001. – Vol. 68. P. 533–536.

Yu.D. Udalov, K.G. Kulikov, V.V. Pankratova, V.N. Bykov

Investigation of mitochondrial dysfunction in patients with myocardial infarction after abdominal cavity surgery

Abstract. During the investigation of 27 patients operated in cases of different diseases of abdominal cavity, which had an acute coronary syndrome at the early postoperative stage, mitochondrial dysfunction in peripheral blood lymphocytes was observed. Structural and functional changes of mitochondria in lymphocytes and cardiomyocytes, obtained from all patients at biopsy, were compared. It was ascertained that on the background of an acute coronary syndrome in peripheral blood lymphocytes of all patients the activity of mitochondrial enzymes such as succinate dehydrogenase, lactic dehydrogenase, α -glycerophosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase decreased. On the background of the decrease of mitochondrial enzyme activity under cytochemical investigation decrease of quantity of granules and changes of their qualitative characteristics were registered, this fact indicated the disorder of energy metabolism in lymphocytes. Functional disorders were accompanied by rough structural changes of mitochondrion that were detected under electron-microscopic examination. The damage of mitochondrial cristas, the decrease of mitochondrial matrix density, the appearance of crystalloid inclusion and complete organelle destruction were observed. The systemic character of dysfunction, being detected under structural and functional mitochondrial analysis of peripheral blood lymphocytes, was confirmed under research of cardiac hystiocyte mitochondria that were obtained at biopsy. Hereby, functional and structural condition of mitochondria in peripheral blood lymphocytes on the background of a development of postoperative acute coronary syndrome makes it possible to arrive at a conclusion about energetic status of cardiomyocytes. The decrease of enzyme activity of mitochondria in lymphocytes and the presence of typical cytochemical changes in organelle may be a signal for the beginning of pathogenetic therapy directed at the correction of bioenergetic metabolism disorders.

Key words: abdominal cavity operations, acute coronary syndrome, mitochondrial dysfunction, energy metabolism enzymes, lymphocytes, cardiomyocytes, morphometry.

Контактный телефон: 916-310-23-63; e-mail: doc-udalov@rambler.ru