

Крутицкий С.С.¹, Цапко Л.П.², Евтушенко А.В.¹, Евтушенко В.В.², Бощенко А.А.², Григорьев Е.В.¹ DOI 10.25694/URMJ.2020.11.26

Оценка эффективности оптической лазерной флуоресцентной диагностики для интраоперационного мониторинга функционального состояния миокарда

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово; ² ФГБНУ "Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук", г. Томск

Krutitskii S.S., Tsapko L.P., Evtushenko A.V., Evtushenko V.V., Boshchenko A.A., Grigoryev E.V.

Optical biopsy for online monitoring of the myocardium during cardiovascular interventions: an experimental study

Резюме

Цель исследования - установить диагностическую значимость лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) в оценке ишемических и реперфузионных повреждений миокарда в условиях кардиоплегического ареста

Материалы и методы. В исследование включен 41 пациент (60,0±9,0 лет), которым проведено кардиохирургическое вмешательство в условиях ИК и фармакоологической кардиopleгии. Для «on-line» мониторинга функционального состояния миокарда использовали метод ЛИФ, основанный на регистрации спектра вторичного излучения ткани. Для количественной оценки флуоресценции миокарда применяли коэффициент флуоресцентной контрастности (Kf) коллагена, эластина, NADH, пиридоксина, флавинов. Параллельно оценивали тропонин I и БСЖК.

Результаты. При проведении кардиopleгии Kf NADH увеличивается, что свидетельствует о нарастании гипоксического повреждения. К моменту окончания ИК отмечается снижение Kf NADH, что указывает на отсутствие анаэробного повреждения миокарда. Аналогичные результаты получены при изучении динамики Kf флавинов, что в целом говорит о хорошей кардиопroteкции и наличии компенсаторных возможностей миокарда. До начала ИК и после кардиopleгической индукции, Kf NADH и концентрация тропонина I и БСЖК имеет слабую корреляционную связь ($r=0,36$). При нарастании ишемии, к моменту окончания окклюзии, корреляционная связь усиливается ($r=0,89$). Похожая тенденция отмечается для Kf Пиридоксина и флавинов.

Выводы. Метод ЛФД в условиях кардиохирургического вмешательства позволяет определить маркеры ишемического повреждения кардиомиоцитов в режиме «on-line» и может выступить как метод экспресс - диагностики патологических состояний миокарда

Ключевые слова: оптическая лазерная диагностика, флуоресценция, миокард, «on-line» мониторинг, кардиохирургическое вмешательство

Для цитирования: Крутицкий С.С., Цапко Л.П., Евтушенко А.В., Евтушенко В.В., Бощенко А.А., Григорьев Е.В., Оценка эффективности оптической лазерной флуоресцентной диагностики для интраоперационного мониторинга функционального состояния миокарда, Уральский медицинский журнал, №11 (194) 2020, с. 96 - 101, DOI 10.25694/URMJ.2020.11.26

Summary

The research aim – to identify the diagnostic significance if laser-induced fluorescence (LIF) in the assessment of ischemic and reperfusion injury of myocardium in conditions of cardiac arrest.

Materials and methods 41 (60,0±9,0 years) patients were included in the research, who were treated with cardiac surgery with the use of EC and pharmacological cold cardioplegia. For on-line monitoring of myocardium functional state the LIF, based on method of secondary radiation spectrum of the tissue, was used. To evaluate myocardial fluorescence, the coefficient of fluorescent contrast (Kf) of collagen, elastin, NADH, pyridoxine, and flavins was used. Troponin I and BSFA were evaluated in parallel.

Results. During cardioplegia, Kf NADH increases, which indicates an increase in hypoxic damage. By the end of EC, there was a decrease in NADH, which indicates that there is no anaerobic damage of the myocardium. Similar results were obtained when

studying the dynamics of Kf flavins, which generally indicated good cardioprotection and the presence of compensatory capabilities of the myocardium. Before the start of EC and after cardioplegic induction, both NADH and troponin I concentrations and BSC have a weak correlation ($r=0.36$). With an increase in ischemia, by the time the occlusion ends, the correlation increases ($r=0.89$). A similar trend is observed for Kf Pyridoxine and flavins.

Conclusions: The LIF method in case of cardiac surgery allows to determine the markers of ischemic damage of cardiomyocyte «on-line» and can be used as express-method of pathologic states of myocardium diagnosis

Key words: optic laser diagnosis, fluorescence, myocardium, «on-line» monitoring, cardiosurgical interference

For citation: Krutitskii S.S., Tsapko L.P., Evtushenko A.V., Evtushenko V.V., Boshchenko A.A., Grigoryev E.V., Optical biopsy for online monitoring of the myocardium during cardiovascular interventions: an experimental study, Ural Medical Journal, No. 11 (194) 2020, p. 96 - 101, DOI 10.25694/URMJ.2020.11.26

Введение

В настоящее время, лидирующую роль в причине смертности занимают сердечно-сосудистые заболевания [1, 2, 3]. Чаще всего при коррекции врожденных или приобретенных пороков сердца прибегают к открытым операциям на сердце. Выполнение подобных операций возможно благодаря применению искусственного кровообращения (ИК). Соответственно, для клиницистов важна оценка морфо-функционального состояния миокарда при выполнении операций в условиях ИК [4, 5, 6]. В настоящее время существуют различные методики оценки состояния миокарда, такие как электрокардиография, импедансометрия, ультразвуковое исследование сердца, скинтиграфия миокарда, магнитно-резонансная томография [7, 8, 9]. Однако, «золотым стандартом» изучения состояния миокарда остается его морфологическое исследование (биопсия), недостатки которого связаны с его инвазивностью (травматичность, опасность контаминации и т.п.).

К сожалению, на данный момент нет единого протокола интраоперационного кардиомониторинга. Имеющиеся протоколы интраоперационного кардиомониторинга основаны на определении маркеров повреждения миокарда из системного и коронарного кровотока, рН-метрии, термометрии миокарда и др. [10, 11]. Каждый из приведенных выше методов мониторинга имеет свои положительные и отрицательные стороны, однако есть ряд общих отрицательных моментов приводящих к пагубным последствиям (станнинг, инфаркт): изолированность точек анализа, длительность получения результатов, недостаточная информативность.

Таким образом, необходима методика неинвазивного «on-line» мониторинга состояния миокарда, которая позволит оценивать его метаболизм и морфологию структур. Достаточно перспективной методикой, которая позволяет оценивать морфо-функциональное состояние миокарда, является лазерная флуоресцентная диагностика (ЛФД). Она доказала высокую точность и специфичность в экспериментальных работах [12, 13, 14]. Помимо этого, она дает возможность «онлайн» мониторинга, при этом не нарушая структуры ткани.

Цель данного исследования - установить диагностическую значимость лазерно-индуцированной флуоресценции в оценке ишемических и реперфузионных повреждений миокарда в условиях кардиоплегического ареста.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись пациенты с показаниями к хирургическому лечению в условиях ИК. Критериями включения пациентов в обследование были выбраны следующие показатели: возраст старше 18 лет; наличие органического сердечного заболевания, требующего хирургической коррекции в условиях ИК и фармакоологической кардиopleгии; подписанное информированное согласие.

Критерии исключения пациентов из исследования явились: возраст менее 18 лет; признаки вторичной кардиопатии (ишемической или вальвулярной); повторные операции на сердце; полиорганная недостаточность; фракция изгнания левого желудочка менее 40%; декомпенсированная коморбидная патология; острый коронарный синдром; слипчивый перикардит; комбинированные и гибридные процедуры на открытом сердце; отказ от участия в исследовании.

В исследование включен 41 пациент, которым выполнены кардиохирургические вмешательства в условиях ИК и фармакоологической кардиopleгии. Средний возраст пациентов составил $60,0 \pm 9,0$ лет.

Фармакоологическая кардиopleгия осуществлялась введением раствора Кустодиола, имеющего температуру $+60$ С, в общей дозе 25-30 мл/кг массы тела в течение 8 минут в два этапа: 50% дозы антеградно в коронарные артерии и 50% дозы ретроградно в коронарный синус.

Для «on-line» мониторинга функционального состояния миокарда использовали метод ЛФД. Метод основан на регистрации спектра вторичного излучения (флуоресценции) ткани при ее зондировании лазерным излучением в УФ-спектре на длине волны 365 нм, соответствующей длине волны поглощения излучения определенных биологических веществ: коллагена, эластина, NADH, пиридоксина, флавинов, липофусцина.

Для количественной оценки флуоресценции ткани миокарда применяли коэффициент флуоресцентной контрастности, определяемый по формуле:

$$Kf = 1 + (If - I) / (I - I_0)$$

где: If – максимум (пик) интенсивности в линии флуоресценции биологического вещества, I – максимум интенсивности в лазерной линии возбуждения.

Показатели флуоресценции снимали в 4-х временных интраоперационных периодах: до окклюзии аорты (ДО); после окклюзии аорты и введения кардиopleгии

ческого раствора (NaO); перед снятием зажима с аорты (КО); после отключения аппарата искусственного кровообращения (КИК).

Параллельно оценивали стандартные маркеры повреждения миокарда (тропонин I и БСЖК) в крови из коронарного синуса до окклюзии аорты (ДО) и сразу после снятия зажима с аорты (КО).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона и критерия Фридмана с поправкой Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Для оценки степени ишемического повреждения миокарда использовались стандартные маркеры повреждения миокарда тропонин I и БСЖК [15]. В дальнейшем, с целью валидации методики, проводили корреляционный анализ показателей оптической биопсии и биохими-

ческих маркеров повреждения миокарда.

При анализе концентрации тропонина I и БСЖК из коронарного синуса (рис. 1) отмечается нарастание маркеров повреждения миокарда к концу окклюзии аорты.

Следовательно, несмотря на проведение кардиopleгии, миокард подвергается повреждениям в период аноксии.

При анализе полученных данных было выявлено, что индуцированная флуоресценция коллагена статистически значимо различалась во всех точках исследования (рис. 2). Это связано с незначительностью ишемического повреждения миокарда, которая не вызвала смены структуры белка, что в свою очередь, говорит об адекватно проведенной кардиopleгии.

Стоит отметить, что Kf коллагена без помех регистрируется только в точках NaO и КО, т.к. при перфузии миокарда кровью Kf коллагена регистрируется с помехами, так как происходит накладка спектров флуорес-

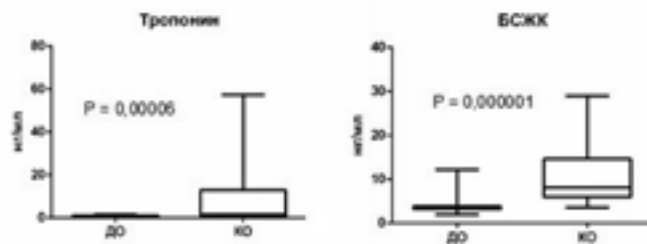


Рисунок 1. Показатели Тропонина I и БСЖК. Обозначения: ДО - до окклюзии, КО – конец окклюзии

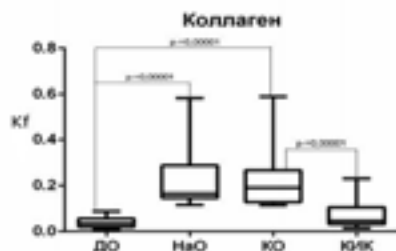


Рисунок 2. Коэффициент флуоресцентной контрастности коллагена в интактном миокарде по данным ЛФД на различных этапах операции с искусственным кровообращением. Обозначения: ДО - до окклюзии, NaO - начало окклюзии, КО – конец окклюзии, КИК – окончание искусственного кровообращения

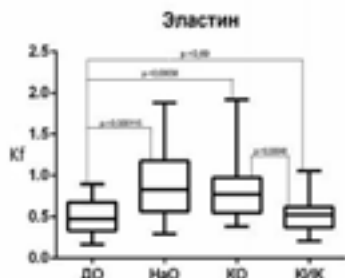


Рисунок 3. Коэффициент флуоресцентной контрастности эластина в интактном миокарде по данным ЛИФ на различных этапах операции с искусственным кровообращением. Обозначения: ДО - до окклюзии, NaO - начало окклюзии, КО – конец окклюзии, КИК – окончание искусственного кровообращения

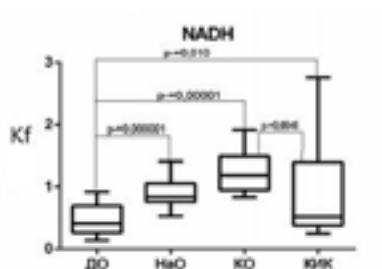


Рисунок 4. Коэффициент флуоресцентной контрастности NADH в интактном миокарде по данным ЛФД на различных этапах операции с искусственным кровообращением. Обозначения: ДО - до окклюзии, НаО - начало окклюзии, КО – конец окклюзии, КИК – окончание искусственного кровообращения

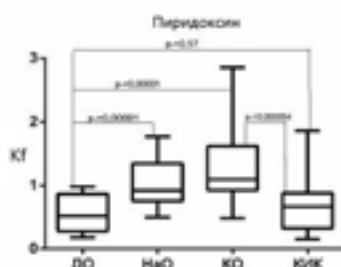


Рисунок 5. Коэффициент флуоресцентной контрастности пиридоксина в интактном миокарде по данным ЛФД на различных этапах операции с искусственным кровообращением. Обозначения: ДО - до окклюзии, НаО - начало окклюзии, КО – конец окклюзии, КИК – окончание искусственного кровообращения

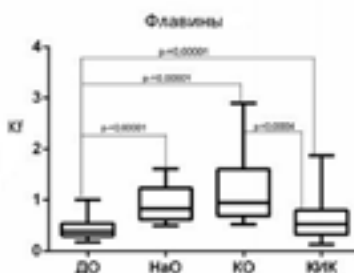


Рисунок 6. Коэффициент флуоресцентной контрастности флавинов в интактном миокарде по данным ЛФД на различных этапах операции с искусственным кровообращением. Обозначения: ДО - до окклюзии, НаО - начало окклюзии, КО – конец окклюзии, КИК – окончание искусственного кровообращения

ценции гемоглобина и коллагена друг на друга. Тем не менее, можно видеть, что Kf эластина незначительно увеличивается при длительной ишемии. Следовательно, конформационные изменения, происходящие с коллагеном не столь значительны, что говорит об адекватности проведенной кардиopleгии и отсутствии значительных повреждений миокарда.

Исходно, стоит отметить, что до начала кардиopleгической индукции Kf эластина ниже, чем после проведения кардиopleгии (рис. 3). Это объясняется изменением структуры эластина за счет охлаждения миокарда, что подтверждается снижением Kf при постепенном согревании миокарда до момента снятия зажима с аорты. После реперфузии Kf восстанавливается до исходных значений,

что позволяет говорить о незначительном влиянии гипотермии на миокард. Разница между Kf на параллельном ИК и после его остановки незначительна, следовательно, свидетельствует об адекватности выбора температурного режима, который не привел к значительным изменениям. Подобная тенденция позволяет говорить о возможности оценки температурного режима и тем самым служить альтернативной заменой термометрии миокарда.

NADH является одним из производных NAD-зависимых коферментов цитоплазматической мембраны, участвующих в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). При переходе с аэробного пути метаболизма на аэробный посредством кардиopleгии Kf NADH увеличивается, что говорит о недостаточном питании миокарда. В динамике

это приводит к увеличению Kf NADH, что свидетельствует о нарастании гипоксического повреждения (рис. 4). Однако, к моменту окончания ИК можно отметить снижение Kf NADH даже ниже исходного уровня, что говорит о компенсаторном увеличении потребности данного кофермента. Таким образом, можно судить об адекватности реперфузии миокарда и отсутствии анаэробного повреждения миокарда, и переходе на аэробный путь метаболизма.

Одним из производных NAD- зависимых коферментов цитоплазматической мембраны, участвующих в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), является пиридоксин. Стоит отметить, что это косвенный показатель, который участвует синтезе/распаде NADH. До начала ишемии и при кардиоплегической индукции Kf не значительно отличается, что говорит об имеющемся резерве, следовательно, равновесие синтез/распад NAD- зависимых коферментов смещено влево (рис. 5). Однако при длительной аноксии Kf увеличивается, что позволяет судить о смещении равновесия синтез/распад NAD- зависимых коферментов вправо, при этом увеличение незначительное. Соответственно, аноксическое повреждение не столь критично и не приводит к серьезным изменениям. При реперфузии равновесие синтез/распад NAD- зависимых коферментов смещено влево и находится ниже исходного уровня. Таким образом, миокард компенсирует метаболический недостаток за счет увеличения синтеза NAD- зависимых коферментов, что косвенно свидетельствует о компенсаторных возможностях и незначительном повреждении миокарда, а также о восстановлении метаболического статуса.

Предшественниками FAD- зависимых коферментов, участвующих в ЦТК, являются флавины. Это один из косвенных показателей синтеза/распада FAD- зависимых коферментов в митохондриях. После начала ишемии Kf флавинов увеличивается (рис. 6) и продолжает нарастать при увеличении длительности аноксии, следовательно, при переходе с аэробного гликолиза на анаэробный равновесие синтеза/распада FAD- зависимых коферментов смещается вправо. При этом, повышения незначительны, что говорит о хорошей кардиопротекции и наличии компенсаторных возможностей миокарда. В последствии можно отметить, что к окончанию ИК равновесие синтеза/распада FAD- зависимых коферментов смещается влево, что позволяет судить о стабилизации митохондрий и о попытке компенсировать недостаток FAD- зависимых коферментов, накопившихся за период аноксии.

При проведении корреляционного анализа выявлены следующие закономерности. В точке до начала ИК и после кардиоплегической индукции, где метаболический статус миокарда не нарушен и может быть принят за исходные значения, в виду отсутствия ишемии, Kf NADH и концентрация тропонина I и БСЖК имеет слабую корреляционную связь ($r=0,36$), однако при нарастании ишемии, к моменту окончания окклюзии, корреляционная связи усиливается ($r=0,89$).

Похожая тенденция отмечается при корреляции до начала ИК и после кардиоплегической индукции Kf Пиридоксина и флавинов с концентрациями тропонина I и БСЖК ($r=0,56$) и ($r=0,72$) соответственно. При нарастании ишемии их корреляционная связи приближается к 1,0. Подобная тенденция позволяет судить о возможности использования данных маркеров как дополнительных критериев при оценке степени ишемии миокарда.

Заключение

Проведенное исследование доказало, что метод ЛФД в условиях кардиохирургического вмешательства позволяет определить маркеры ишемического повреждения кардиомиоцитов в режиме реального времени. Таким образом, ЛФД может являться одним из методов экспресс-диагностики патологических состояний в миокарде. ■

Крутицкий Сергей Сергеевич – лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий, врач анестезиолог-реаниматолог отделения анестезиологии - реанимации НИИ КПССЗ, Кемерово; **Цапко Людмила Петровна** - младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики отдела экспериментальной кардиологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск; **Евтушенко Алексей Валерьевич** - д.м.н., заведующий лабораторией пороков сердца НИИ КПССЗ, г. Кемерово; **Евтушенко Владимир Валериевич** – к.м.н., врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения № 1 Томского НИМЦ РАН, г. Томск; **Боценко Алла Александровна** – д.м.н., старший научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца Томского НИМЦ РАН, г. Томск; **Григорьев Евгений Валерьевич** - д.м.н., профессор, профессор РАН, заместитель директора по научной и лечебной работе НИИ КПССЗ, г. Кемерово. Автор, ответственный за переписку: Крутицкий Сергей Сергеевич, e-mail: kss911@mail.ru, телефон: 8 923 502 59 95.

Литература:

1. Вишневецкий А., Андреев Е., Тимонин С. Смертность от болезней системы кровообращения и продолжительность жизни в России. Демографическое обозрение. 2016; 1(3): 6 - 34.
2. Исакаев Е.Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний. Медицина и экология. 2017; 2: 19 - 28.
3. Townsend N., Wilson L., Bhatnagar P., Wickramasinghe K., Rayner M., Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European Heart Journal*. 2016; 37(42): 3232 - 3245.
4. Гриценко В.В., ред. Защита миокарда при операции на «открытом» сердце: учебное пособие. Санкт-Петербург. СПбГМУ; 2009.
5. Буненков Н.С., Комок В.В., Соколов А.В., Немков

- А.С. Новые возможности оценки интраоперационного ишемически-реперфузионного повреждения миокарда при операциях реваскуляризации в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце. Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал им. Б.В. Петровского. 2017; 2: 40 - 48.
6. Маслов Л.Н., Воронков Н.С., Семенцов А.С., Джагги А.С., Петроцеллис Л.Де., Ванг Х. и др. Реперфузионное повреждение сердца. Основные звенья патогенеза. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018; 8: 881 - 903.
 7. Усов В.Ю., Архангельский В.А., Федоренко Е.В. Оценка жизнеспособности поврежденного миокарда у кардиохирургических больных: сравнение возможностей магнитно-резонансной и эмиссионной томографии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2014; 3: 124 - 133.
 8. Чегрина Л.В., Рыбка М.М. Диагностика и предупреждение интраоперационного повреждения миокарда у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения. Клиническая физиология кровообращения. 2011; 4: 9 - 13.
 9. Vokeriya L. A., Bledzhyants G. A., Movsesyan R. R. Muratov R. V., Korzhenevskii A. V., Kornienko V. N. et al. Bioelectric impedancemetry of the myocardium during cardiac surgery with artificial circulation. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2007; 143: 32 - 35.
 10. Битчук Н.Д. Диагностика присутствия феномена миокардиального стэннинга в клинических условиях с помощью инструментальных методов исследования. Медицина неотложных состояний. 2019; 5(100): 13 - 21.
 11. Кенжаев М.Л., Аляви А.Л., Кенжаев С.Р., Дадамян Н.Г., Рахимова Р.А., Ортиков М.М. Методы диагностики жизнеспособного миокарда при остром инфаркте миокарда. Вестник экстренной медицины. 2018; 2 (11): 68 - 74.
 12. Салмин В.В., Салмина А.Б., Фурсов А.А., Фролова О.В., Лалетин Д.И., Фурсов М.А. и др. Использование флуоресцентной спектроскопии для оценки ишемизированного миокарда. Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. 2011; 2: 142 - 157.
 13. Brachmanski M., Gebhard M.M, Nobiling R. Separation of fluorescence signal from Ca²⁺ and NADH during cardioplegic arrest and cardiac ischemia. Cell Calcium. 2004; 35: 381- 391.
 14. Enzyme-dependent fluorescence recovery of NADH after photobleaching to assess dehydrogenase activity of isolated perfused hearts / A. Moreno, S. Kuzmiak-Glancy, R Jaimes., M.W. Kay // Sci Rep. 2017. - №7. - P. 45744.
 15. Сальников А.С., Сорокина Н.Н., Рукавишников М.Ю., Офицеров В.И. Белок, связывающий жирные кислоты, - серологический маркер повреждения миокарда. Бюллетень СО РАМН. 2012; 1(32): 86 - 92.
 16. Чегрина Л.В., Рыбка М.М. Взаимосвязь повышения послеоперационного уровня тропонина Т и лактата с развитием осложнений у больных, оперированных с применением искусственного кровообращения. Клиническая физиология кровообращения. 2015; 1: 42 - 48.