УДК 616.132:616.132.2]–089.86]–089.5–053.89/.9–039.72:612.13 DOI 10.11603/2415-8798.2019.1.9959

©О. М. Дружина[1,2], О. А. Лоскутов[1,2], С. Р. Маруняк[1,2], А. В. Михайлова[1]

ДУ "Інститут серця МОЗ України", м. Київ[1]

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ[2]

ВИРАЖЕННЯ АПОПТИЧНИХ РЕАКЦІЙ У ПАЦІЄНТІВ З ІШЕМІЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ ПРИ АОРТОКОРОНАРНОМУ ШУНТУВАННІ В УМОВАХ ШТУЧНОГО КРОВООБІГУ ЗАЛЕЖНО ВІД СХЕМИ АНЕСТЕЗІОЛОГІЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

Резюме. За даними досліджень, частота летальності серед пацієнтів похилого та старечого віку після проведення аортокоронарного шунтування складає від 3 до 11 %, разом з тим, як ускладнення виникають у 30–40 % випадках. Одним із найчастіших порушень, яке можна спостерігати в ранній післяопераційний період, та яке безпосередньо загрожує життю пацієнтів, є післяопераційна кардіальна дисфункція. Важливу роль у її патогенезі займає зростання загибелі кардіоміоцитів шляхом апоптозу.

Мета дослідження – вивчити вираження впливу на апоптичні реакції різних схем анестезіологічного забезпечення у пацієнтів з ішемічною хворою серця (ІХС) при аортокоронарному шунтуванні (АКШ) в умовах штучного кровообігу.

Матеріали і методи. У дослідження включено 20 пацієнтів з ІХС, яким виконували АКШ-3 в умовах штучного кровообігу. Середній вік хворих склав (68,5±4,1) року. Чоловіків було 70,0 %, жінок – 30,0 %. Залежно від схеми анестезіологічного забезпечення, усіх пацієнтів поділили на 2 групи: перша (10 осіб) – із використанням в якості гіпнотика "Севофлуран"; друга групи (10 осіб) – із застосуванням засобу "Пропофол". Локальний захист міокарда – штучна електрична фібриляція. Зразки біоптату міокарда забирали з вушка правого передсердя. Гістологічні зрізи використовували для проведення імуногістохімічних досліджень із застосуванням первинних антитіл проти білків BAX, Bcl-2 та каспази – 3 (DAKO).

Результати досліджень та їх обговорення. При схемі анестезіологічного забезпечення із застосуванням севофлурану як гіпнотика, експресія антиапоптичного гена Bcl-2 виявлялась у 5 разів (p=0,003) вищою, порівняно з аналогічними значеннями, отриманими від пацієнтів, де використовували пропофол. Експресія проапоптичних генів Cpp-32 і BAX в групі з анестезією севофлураном була у 3 (p=0,032) і 2 разів (p=0,011) відповідно, достовірно меншою, порівняно з показниками при використанні пропофолу.

Висновки. За рахунок підвищення експресії антиапоптичного гена Bcl-2 і зниження експресії проапоптичних генів Cpp-32 і BAX, севофлуран достовірно менше, порівняно з пропофолом, впливає на активацію апоптозу, внаслідок чого зменшується вірогідність програмованої клітинної загибелі міокардіоцитів.

Ключові слова: аортокоронарне шунтування; штучний кровообіг; ішемічна хвороба серця; апоптоз.

ВСТУП За даними досліджень, частота летальності серед пацієнтів похилого та старечого віку після проведення аортокоронарного шунтування складає від 3 до 11 %, разом з тим, як ускладнення виникають у 30–40 % випадках [1]. Одним із найчастіших порушень, яке можна спостерігати в ранній післяопераційний період, та яке безпосередньо загрожує життю пацієнтів, є післяопераційна кардіальна дисфункція. Важливу роль у її патогенезі займає зростання загибелі кардіоміоцитів шляхом апоптозу [2].

Мітохондріальні механізми апоптозу останнім часом привертають пильну увагу дослідників. Усередині мітохондрій міститься ряд білків (цитохром С, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, ендонуклеаза G та ін.), потрапляння яких в цитоплазму призводить до запуску апоптозу. Їх кількість дозволяє деяким авторам порівнювати мітохондрії з "чашею, переповненою отрутою" [3].

Для попередження необґрунтованого запуску "мітохондріального" апоптозу існує система білків, що контролює вихід проапоптотичних факторів із мітохондрій. Ця система представлена білками сімейства Bcl-2, що мають 4 гомологічні домени (BH1–BH4). Серед них виділяють білки з прямопротилежними функціями – антиапоптичними (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) і проапоптичними (BAX, Bak, Bok, Bik, Bid, Bad, Blk, Bim, Bnip-3). Власне, рівновага між цими білками визначає "долю" клітини [4].

Схематично роботу такої складної системи можна представити таким чином: Bcl-2 запобігає виходу цитохрому С й інших зазначених факторів з інтермітохондріального простору через канали, в утворенні яких беруть участь проапоптичні білки цього сімейства. Деградація Bcl-2 призводить до потрапляння в цитоплазму цитохрому С, який сприяє олігомеризації цитозольного білка – апоптозактивуючого фактора (Apaf), що відіграє роль "арматури", на якій відбувається протеолітичний процесинг каспаз-9. Результати експериментальних робіт показали ефективність Bcl-2 в скороченні зони реперфузійного ушкодження і відповідно покращення серцевої функції [5].

Метою дослідження було вивчити вираження впливу на апоптичні реакції різних схем анестезіологічного забезпечення шляхом визначення Bcl-2, Cpp-32 і BAX у кардіоміоцитах пацієнтів з ІХС при аортокоронарному шунтуванні в умовах штучного кровообігу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ У дослідження включено 20 пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС), яким на базі ДУ "Інститут серця МОЗ України" виконували аортокоронарне шунтування з накладанням 3 аорто-коронарних анастомозів в умовах штучного кровообігу (ШК). Середній вік пацієнтів складав (68,5±4,1) року. Частка чоловіків була 70,0 %, жінок – 30,0 %. Залежно від схеми анестезіологічного забезпечення усіх пацієнтів поділили на 2 групи: (10 осіб) – схема анестезіологічного забезпечення з використанням в якості гіпнотика "Севофлуран" для (введення наркозу за принципом "болюс–анестезії" севофлураном, підтримка – по напівзакритому контуру при (2,28±0,11) МАК); друга групи (10 осіб) – схема анестезіологічного забезпечення з використанням в якості гіпнотика "Пропофол" (для введення в анестезію пропофол у дозі (1,46±0,05) мг/кг, для підтримки – інфузія зі швидкістю 2,5–3 мг/кг/год).

Штучну вентиляцію легень в обстежених пацієнтів проводили повітряно-кисневою сумішю з FiO_2 50 % в режимі нормовентиляції під контролем газового складу

крові (середня значення pCO_2 артеріальної крові складало (35,5±4,2) мм рт. ст.).

Електричну фібриляцію здійснювали за допомогою апарата змінного струму "Shtocer", Німеччина. Фібриляцію створювали низьковольтним генератором (частота струму − 50 Гц, напруга струму – 12 вольт, сила струму – 25 Ма). При цьому вінцеві судини перфузувались природним шляхом кров'ю з оксигенатора апарата ШК. Достовірої різниці між тривалістю штучної фібриляції у першій та другій групах не встановлено ((59,4±12,3) хв та (55,9±15,9) хв відповідно).

Штучний кровообіг проводили на апараті "System 1" (Terumo, США) з використанням одноразових мембранних оксигенаторів "Affinity" (Medtronic, США) в умовах помірної гіпотермії (+32 °С). Підключення апарата ШК і перфузію до штучної фібриляції серця виконували в ламінарному режимі з подальшим переходом у пульсуючий режим (серцевий індекс підтримувався на рівні 2,4–2,5 л/хв/м^2). Під час ШК використовували нормоволемічну гемодилюцію при середньому рівні гематокриту (27,1±3,1) % та гемоглобіну (89,4±7,3) г/л. Згортання крові оцінювали за часом активованого згортання, підтримуючи його в межах 500–600 с.

Усім пацієнтам проводили інтраопераційну оцінку глибини анестезії, яку визначали за допомогою монітора VISTA (Aspect Medical System Inc, США). При цьому електроенцефалограму реєстрували в лобних відведеннях за схемою, рекомендованою фірмою-розробником, з подальшим розрахунком біспектрального індексу (BIS).

Зразки біоптату міокарда (близько 300 мм^3) забирали з вушка правого передсердя після відключення від штучного кровообігу за допомогою гострого скальпеля. У подальшому гістологічні зрізи використовували для проведення імуногістохімічних досліджень із застосуванням первинних антитіл проти білка BAX, білка Bcl-2 та кас пази-3 (DAKO). Візуалізацію первинних антитіл проводили полімерною системою DAKO із барвником діамінобензидином. Підрахунок досліджуваних об'єктів у гістологічних препаратах із проведеними імуногістохімічними реакціями здійснювали з використанням світлового мікроскопа зі збільшенням об'єктива х40, бінокулярної насадки х1,5 і окулярів х10.

Отримані результати статистично оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного (М) за результатами кожного дослідження±стандартне відхилення (m). Достовірними вважали відмінності при p<0,05 (95,5 %). Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Statistica-6.

Дослідження було проведене відповідно до VII перегляду принципів Гельсінської декларації прав людини (2013). Від пацієнтів отримано інформаційну згоду.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій групі експресія антиапоптичного антигену Bcl-2 виявлялась в основному в цитоплазмі кардіоміоцитів і представляла хаотичні дифузні або дрібновогнищеві коричневі мікрогранулярні скупчення, розташовані переважно по периферії м'язових клітин. Площа експресії Bcl-2 склала при цьому (23,2±2,3) % (табл.).

У препаратах, отриманих від пацієнтів, анестезіологічне забезпечення яких проводили з використанням пропофолу, позитивну реакцію антигену Bcl-2 визначали в основному в кардіоміоцитах, локалізованих навколо судин. При цьому інтрацитоплазматична експресія антигену Bcl-2 склала (4,6±0,84) %, що виявлялось майже у 5 разів достовірно нижче порівняно з першою групою (p=0,003) (табл.).

Таблиця. Значення показників, що виражають активацію апоптозу при дослідженні зразків препарату вушка правого передсердя залежно від схеми анестезіологічного забезпечення (n=20)

Показник	Значення	
	перша група (n=10)	друга група (n=10)
Bcl-2 (%)	23,2±2,3[1]	4,6±0,84
Cpp-32 (%)	12,36±3,2[1]	36,4±3,7
BAX (%)	21,3±3,1[1]	42,8±4,4

Примітка: 1) Bel-2, % – площа кардіоміоцитів з інтрацитоплазматичною експресією антигену Bcl-2; BAX, % – площа кардіоміоцитів з інтрацитоплазматичною експресією антигену BAX; CPP 32, % – площа кардіоміоцитів з інтрацитоплазматичною експресією каспази-3 в кардіоміоцитах;

2) [1] – p<0,005 між групами дослідження.

Щодо каспази-3, яка відіграє ключову роль у формувані апоптосом, то її експресію у першій групі визначали в цитоплазмі кардіоміоцитів у вигляді коричневих дифузних округлих гранул переважно на полюсах м'язових клітин та у середньому складала (12,36±3,2) % від площі кардіоміоцитів (табл.). Разом з тим, достовірно встановлено, що середня площа експресії каспази-3 (Cpp-32) в групі з використанням пропофолу майже у 3 рази (p=0,032) виявлялась більшою, порівняно з першою групою, та складала (36,4±3,7) % (табл.).

Експресія антигену BAX в препаратах групи з севофлураном проявлялася у вигляді коричневого фарбування ядра, а також у цитоплазмі у вигляді коричневих гранул різного розміру, хоатично розміщених. Площа цитоплазматичної експресії цього антигену дорівнювала (21,3±3,1) % (табл.).

У препаратах групи, де в якості гіпнотика використовували "Пропофол", експресію антигену BAX визначали у вигляді скупчення гранул різного розміру, які дифузно заповнювали цитоплазму. Інтрацитоплазматична експресія антигену BAX у цих зразках складала (42,8±4,4) %, що достовірно у 2 рази (p=0,011) була більшою порівняно з першою групою (табл.).

Згідно з нашим дослідженням встановлено, що за рахунок підвищеної експресії антиапоптичного гену Bcl-2 і зниженої експресії проапоптичних генів Cpp-32 і BAX, севофлуран достовірно менше, порівняно з пропофолом, впливає на активацію апоптозу, внаслідок чого зменшується вірогідність програмованої клітинної загибелі міокардіоцитів.

ВИСНОВКИ 1. При схемі анестезіологічного забезпечення з використанням севофлурану як гіпнотика, експресія антиапоптичного гена Bcl-2 виявлялась у 5 разів вищою, порівняно з аналогічними значеннями, отриманими від пацієнтів, де використовували пропофол.

2. Експресія проапоптичних генів Cpp-32 і BAX у групі з анестезією севофлураном була у 3 і 2 разів відповідно достовірно меншою порівняно з показниками при використанні пропофолу як гіпнотика.

Перспективи подальших досліджень У процесі дослідження нам вдалося встановити переваги використання анестезії севофлураном, порівняно з пропофолом, на

основі вивчення ступеня активації апоптозу під час аортокоронарного шунтування зі штучним кровообігом. Надалі планується проаналізувати поліморфізм генів, що відповідають за метаболізм даних препаратів та встановити ефективність їх застосування залежно від індивідуальної чутливості.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Long-term outcome and predictors of noninstitutionalized survival subsequent to prolonged intensive care unit stay after cardiac surgical procedures / R. A. Manji, R. C. Arora, R. K. Singal, [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 2016. – Vol. 101 – P. 56–63.

2. Low-cardiac-output syndrome after cardiac surgery / V. V. Lomivorotov, S. M. Efremov, M. Y. Kirov [et al.] // Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. – 2017. – Vol. 31. – P. 291–308.

3.Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy / P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J. M. Adams // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2014. – Vol. 15. – P. 49–63.

4. Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways / J. H. Ha, J. S. Shin, M. K. Yoon [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288. – P. 7387–7398.

5. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment / S. Goldar, M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan, B. Baradarn // Asian Pac. J. Cancer Prev. –2015. – Vol. 16. – P. 2129–2144.

Отримано 08.01.19

©O. M. Druzhyna[1,2], O. A. Loskutov[1,2], S. R. Maruniak[1,2], A. V. Myhailova[1]

Institute of Heart of Ministry of Health of Ukraine, Kyiv[1]
P. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv[2]

EXPRESSION OF APOPTOTIC REACTIONS IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE DURING CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING WITH CARDIOPULMONARY BYPASS DEPENDING ON THE ANESTHETIC SCHEME

Summary. According to research data, the mortality rate among elderly and senile patients after coronary artery bypass surgery is from 3 to 11 %, along with how complications occur in 30–40 % of cases. One of the most frequent disorders that can be observed in the early postoperative period and which directly threaten the lives of patients is postoperative cardiac dysfunction. An important role in its pathogenesis is played by the growth of the death of cardiomyocytes during apoptosis.
The aim of the study – to learn the severity of the effect on the apoptotic reactions of various anesthetic management schemes in patients with coronary heart disease during coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass.
Materials and Methods. The study included 20 patients with coronary heart disease who underwent coronary artery bypass grafting (CABG-3) with cardiopulmonary bypass. The average age was (68.5±4.1) years. The share of men – 70.0 %, women – 30.0 %. Depending on the scheme of anesthetic management, all patients were divided into 2 groups: group 1 (10 people) – using sevoflurane; group 2 (10 people) – using propofol. Local protection of the myocardium – artificial electrical fibrillation. Myocardial biopsy specimens were collected from the right atrial appendage. Histological sections were used to conduct immunohistochemical studies using primary antibodies against BAX protein, Bcl2 protein and caspase 3 (DAKO).
Results and Discussion. Under the anesthetic scheme using sevofluran as hypnotics, the expression of the anti-apoptic Bcl 2 gene was 5 times higher ($p = 0.003$) compared with similar values obtained in patients using propofol. The expression of pro-apoptic genes cpp 32 and BAX in the group with anesthesia of sevoflurane was in 3 ($p = 0.032$) and 2 times ($p = 0.011$), respectively, significantly less, compared with group using propofol.
Conclusions. By increasing the expression of the anti-apoptic Bcl 2 gene and reducing the expression of the pro-apoptic genes Cpp 32 and BAX, sevoflurane is significantly less compared with propofol affects the activation of apoptosis, resulting in a reduced probability of programmed cell death of myocardiocytes.

Key words: coronary artery bypass grafting; cardiopulmonary bypass; ischemic heart disease; apoptosis.

©А. Н. Дружина[1,2], О. А. Лоскутов[1,2], С. Р. Маруняк[1,2], А. В. Михайлова[1]

ГУ "Институт сердца МЗ Украины", г. Киев[1]
Национальна медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, г. Киев[2]

ВЫРАЖЕННОСТЬ АПОПТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПРИ АОРТОКОРОНАРНОМ ШУНТИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СХЕМЫ АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Резюме. По данным исследований, частота летальности среди пациентов пожилого и старческого возраста после проведения аортокоронарного шунтирования составляет от 3 до 11 %, вместе с тем, как осложнения возникают в 30–40 % случаях. Одним из наиболее частых нарушений, которое можно наблюдать в ранний послеоперационный период, и которое непосредственно угрожает жизни пациентов, является послеоперационная кардиальная дисфункция. Важную роль в ее патогенезе занимает рост гибели кардиомиоцитов путем апоптоза.
Цель исследования – изучить выраженность влияния на апоптические реакции различных схем анестезиологического обеспечения у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) при аортокоронарном шунтировании (АКШ) в условиях искусственного кровообращения.

Материалы и методы. В исследование включено 20 пациентов с ИБС, которым выполняли АКШ-3 в условиях искусственного кровообращения. Средний возраст больных составил (68,5±4,1) лет. Мужчин было 70,0 %, женщин – 30,0 %. В зависимости от схемы анестезиологического обеспечения всех пациентов разделили на 2 группы: первая (10 человек) – с использованием гипнотика “Севофлуран”; вторая группы (10 человек) – с использованием препарата “Пропофол”. Локальная защита миокарда – искусственная электрическая фибрилляция. Образцы биоптата миокарда забирали из ушка правого предсердия. Гистологические срезы использовали для проведения иммуногистохимических исследований с применением первичных антител против белков BAX, Bcl-2 и каспазы-3 (DAKO).
Результаты исследований и их обсуждение. При схеме анестезиологического обеспечения с использованием севофлурана как гипнотика, экспрессия антиапоптичного гена Bcl-2 была в 5 раз (p=0,003) выше, по сравнению с аналогичными значениями, полученными от пациентов, где использовали пропофол. Экспрессия проапоптичных генов Cpp-32 и BAX в группе с анестезией севофлурана была у 3 (p=0,032) и 2 раз (p=0,011) соответственно, достоверно меньше, по сравнению с показателями при использовании пропофола.
Выводы. За счет повышения экспрессии антиапоптичного гена Bcl-2 и снижение экспрессии проапоптичных генов Cpp-32 и BAX, севофлуран достоверно меньше, по сравнению с пропофолом, влияет на активацию апоптоза, в результате чего уменьшается вероятность программируемой клеточной гибели миокардиоцитов.

Ключевые слова: аортокоронарное шунтирование; искусственное кровообращение; ишемическая болезнь сердца; апоптоз.

Адреса для листування: С. Р. Маруняк, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, вул. Теодора Драйзера, 7, Київ, 02217, Україна, e-mail: maruniak.stepan@gmail.com