

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/282073709>

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПАТОГЕНЕЗА ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ, МАРКЕРЫ И СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ

CONFERENCE PAPER · JANUARY 2012

DOI: 10.13140/RG.2.1.4930.6087

---

READS

8

3 AUTHORS, INCLUDING:



[Denys Vatlitsov](#)

Shupyk National Medical Academy Of Post...

39 PUBLICATIONS 0 CITATIONS

SEE PROFILE

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПАТОГЕНЕЗА ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ, МАРКЕРЫ И СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ

*Игрунова Ксения Николаевна.*

*д.мед.н., НМАПО имени П.Л. Шупика, руководитель ЦНИЛ, г. Киев*

*Ватлицов Денис Владимирович*

*к.б.н., НМАПО имени П.Л. Шупика, ст н.с. ЦНИЛ, г. Киев*

*Андрियाш Виктория Васильевна*

*НМАПО имени П.Л. Шупика, инженер I кат., г. Киев*

*E-mail: [cndl@yandex.ru](mailto:cndl@yandex.ru)*

**Введение.** В мире наблюдается уменьшение количества смертей от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), но внезапная сердечная смерть (ВСС) остается очень важной проблемой здравоохранения во всем мире и составляет 60-80 % смертей у больных ишемической болезнью сердца, составляющих 90% больных ССЗ.[10]. Каждый год около 400 000 американцев умирают внезапно, из них около 251 000 - от ВСС. По данным Hohnloser S. [6], ВСС составляет 15-20% всех ненасильственных случаев смерти среди жителей промышленно развитых стран.

В 1982 году Golgdstein [5] предложил ввести понятие ВСС, куда относили все зарегистрированные случаи смерти, которые наступили в пределах 1 часа с момента появления острых симптомов кардиальной патологии. Несмотря на это, и в настоящее время сохраняются разные подходы при исследовании ВСС, что делает эту проблему «статистическим кошмаром». По данным Kuller L. [7], подходы к проблеме ВСС должны включать временной интервал от начала проявления симптомов заболевания, внезапность начала, данные анамнеза, специфичность этиологии заболевания [9]. Simon S. и др. [8], проведя анализ 106 случаев ВСС, предложили 3 предиктора: первичная аритмия, острая ишемия, и недостаточность насосной функции.

Исходя из вышеприведенного, возникает потребность в разработке концепции развития ВСС, выявлении маркеров развития, проведения исследований относительно эффективности прогнозирования рисков возникновения, профилактики и возможности проверки эффективности способов, которые направлены на предотвращение ВСС, а также разработать схемы подбора индивидуальных схем коррекции и лечения.

Поэтому **целью данного исследования** было проведение в эксперименте моделирования ВСС как результата нарушения регуляции баланса жизнеспособности клеток организма, изучение маркеров развития патологии, что дает возможность определения эффективных методов диагностики групп риска и разработки патогенетически направленных средств коррекции ВСС.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на 148 половозрелых крысах массой 280-310 г возрастом 8-9 месяцев. Все манипуляций проводились в одно и то же время суток. Контрольным материалом служила кровь тех самых крыс до начала эксперимента, отбор материала проводился путем венопункции хвостовой вены.

Разработку метода подбора индивидуальных схем коррекции и контроля лечения *in vitro* с учетом исходного состояния организма проводили на клиническом материале. Клиническим материалом служили 220 образцов крови больных с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Состояние клеток организма оценивали по показателям апоптоза и изменений митохондриального мембранного потенциала мононуклеарных клеток крови, отражающих регуляторное влияние нервной и иммунной систем. Для определения уровня апоптоза выделяли мононуклеарные клетки крови (МНК) на градиенте плотности фикокол-урографин ( $d=1,077$ ). Для определения апоптоза отбирали по  $10^5$  клеток.

Исследование уровня индекса индукции апоптоза (ИИА) МНК проводилось в два этапа: первый – исследование уровня спонтанного апоптоза после культивирования клеток, второй – исследование после добавления в культуральную среду индуктора (индуцированный апоптоз). Определение

уровня спонтанного апоптоза даёт возможность определить исходное состояние клеток организма, а исследование индуцированного апоптоза выявляет способность клеток противостоять повреждающим факторам. Таким образом, данное исследование дает возможность выявить внутренние повреждения и истощение, не определяемые обычными методами, а именно определить степень истощения или функционального резерва клеток организма [2,3].

Исследование уровня апоптоза проводили на проточном цитометре PAS (Partec, Германия) с использованием набора для определения апоптоза Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США).

Определение изменений мембранного потенциала митохондрий (ММП), отражающего энергетический резерв клетки и внутренний механизм запуска апоптоза, проводили по общепринятой методике [4] с родамином 123 («Fluka»).

Математическая обработка полученных результатов проводилась с использованием методов вариационной статистики. Статистическая значимость между групповых расхождений оценивалась по t-критерию Стьюдента [1].

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе проводилось экспериментальное моделирование и выявление маркеров развития ВСС. Полученные результаты относительно уровня спонтанного и индуцированного апоптоза использованы для расчета индекса индукции апоптоза.

Исследование уровня спонтанного апоптоза выявило стремительное повышение уровня апоптоза с  $15,18 \pm 1,61\%$  в контрольном заборе до  $25,05 \pm 2,86\%$  после 2 недель иммобилизационного стресса. Потом наблюдалось снижение уровня апоптоза до  $20,25 \pm 3,17\%$  после 4 недель манипуляций, но введение дополнительной стрессовой нагрузки, гипертермии после иммобилизации, привело к повышению уровня апоптоза МНК до  $24,60 \pm 2,66\%$  после 6 недель, то есть на 2 неделю после введения дополнительной стрессовой нагрузки. Дальнейшее стрессирование экспериментальных животных привело к снижению исследуемого параметра до  $13,06 \pm 5,29\%$  после 8 недель, что было ниже контрольного значения. После добавления дополнительного стрессорного фактора, повышение активности на фоне гипотермии, на 9 неделе, наблюдалось

очередное повышение уровня апоптоза с максимумом после 10 недель  $16,61 \pm 3,09\%$ , с последующим снижением. А сроки гибели животных в результате сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, что было подтверждено результатами вскрытия,  $16,67\%$  после 1 недели,  $20\%$  после 5 недель и  $16,67\%$  после 12 недель, указывают на зависимость увеличения риска ВСС в периоды пиковых стрессовых нагрузок (рис. 1а).

Исследование уровня индуцированного апоптоза выявило схожую картину. Так после 2 недель экспериментального исследования уровень индуцированного апоптоза увеличился до  $23,94 \pm 2,54\%$ , что в 2 раза превышало контрольный показатель  $11,83 \pm 3,53\%$ , с последующим снижением до  $12,28 \pm 2,78\%$  после 4 недель и максимумом  $24,53 \pm 2,63\%$  после 6 недель (рис. 1б).

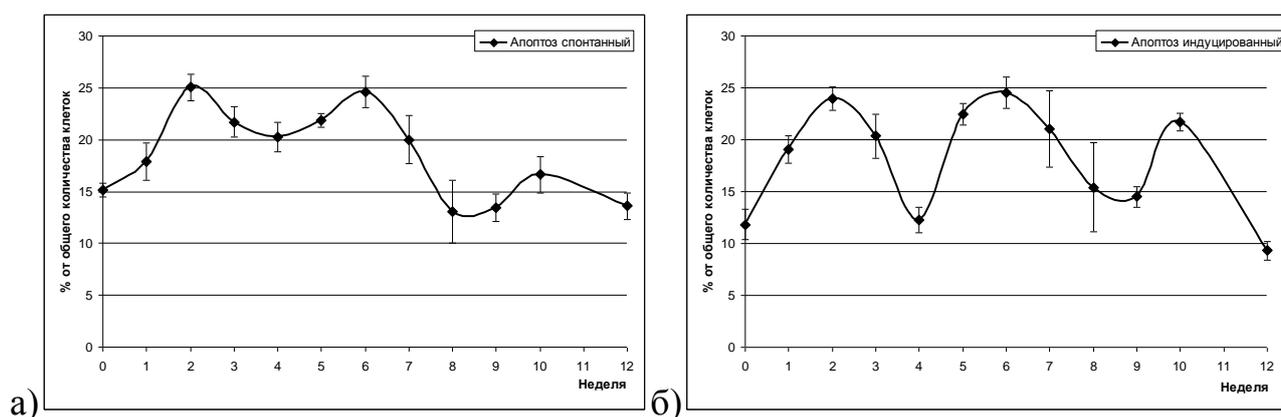


Рис. 1 Динамика изменений уровня спонтанного а) и индуцированного б) апоптоза МНК экспериментальных животных под влиянием длительного иммобилизационно-нагрузочного стресса.

Исследования уровня некроза выявили, что экспериментальное стрессирование практически не влияло на данный показатель и соответствовало контрольному значению  $0,51 \pm 0,58\%$  на всех сроках отбора крови.

Результаты, полученные после расчета индекса индукции апоптоза, показали, что избранная модель вызывает изменения функционального резерва клеток организма и приводит в конечном итоге к истощению, которое, в свою очередь, приводит к смерти после увеличения нагрузок и может быть прогнозируемой. Так, было показано, что у крыс возрастом 8-9 месяцев

контрольное значение ИИА составляет  $1,346 \pm 0,286$  у.е. и превышает норму  $0,500-0,700$ . Это указывает на то, что у данной группы экспериментальных животных наблюдалось истощение, обусловленное возрастной недостаточностью адаптации. Нашими исследованиями показано, что стресс приводит к активации восстановительных систем клеток организма, что отображается в снижении ИИА до  $0,933 \pm 0,106$  у.е., но также приводит к смерти 16,67% после 1 недели. Увеличение сроков эксперимента выявило развитие адаптации к стрессу на 4 неделю ( $1,725 \pm 0,477$  у.е.), но добавление дополнительной нагрузки привело к резкому снижению ИИА до  $0,976 \pm 0,059$  у.е. и смерти 20% животных. Результаты, полученные на поздних сроках эксперимента, указывают на истощение и снижение функционального резерва клеток организма (рис. 2).

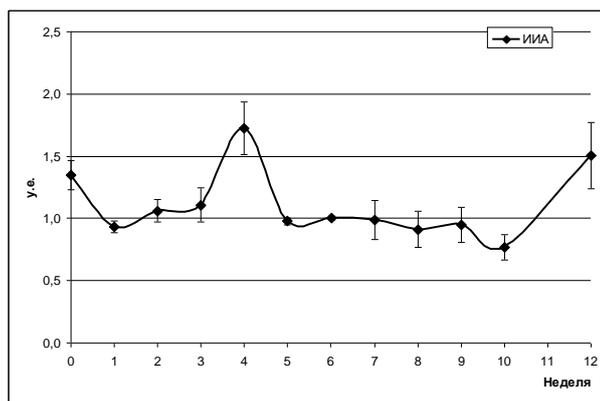


Рис. 2. Динамика изменений индекса индукции апоптоза мононуклеарных клеток крови экспериментальных животных под влиянием длительного иммобилизационно-нагрузочного стресса.

Проведенные исследования крови крыс, стрессированных согласно предложенной модели, дали возможность выявить точки критических нагрузок, прогнозировать дальнейшие исследования по моделированию ВСС и выявить прогностические маркеры ВСС. Было показано, что исследование индекса индукции апоптоза дает возможность оценить функциональный резерв клеток организма и прогнозировать развитие патологий, а также является чувствительным показателем состояния организма. Таким образом, исходя из результатов экспериментального исследования, которое позволило выявить

чувствительный маркер состояния организма, было решено провести исследования возможности коррекции и разработать метод подбора индивидуальных схем коррекции и контроля лечения *in vitro* с учетом исходного состояния организма.

Было предложено использовать методику оценки функционального резерва клеток организма для определения эффективности препаратов коррекции регулирующих клеточный энергетический обмен. Для этого, в инкубационную среду добавляли препарат коррекции в лечебной концентрации в пересчете на объем среды без изменения концентрации других веществ. До и после этого проводили методику по схеме. Одновременно проводили исследование влияния двух препаратов.

Было показано, что использование обоих препаратов коррекции приводит к снижению уровня как спонтанного, так и индуцированного апоптоза МНК в сравнении с контрольными значениями уровня апоптоза,  $22,66 \pm 9,90\%$  спонтанного и  $28,07 \pm 7,84\%$  индуцированного соответственно. Причем 1 препарат коррекции в сравнении со 2 препаратом приводит к большему снижению уровня спонтанного ( $19,13 \pm 6,52\%$  и  $19,72 \pm 6,19\%$  соответственно), но к меньшему снижению индуцированного апоптоза ( $27,72 \pm 7,52\%$  и  $24,20 \pm 6,85\%$  соответственно) (рис. 3а).

Поскольку существенных различий в уровнях апоптоза не было обнаружено, основное внимание обратили на показатели индекса индукции апоптоза. Так было показано, что применение препарата коррекции 1 снижает показатели ИИА до  $0,691 \pm 0,147$  у.е. при том, что исходный показатель был на уровне  $0,817 \pm 0,259$  у.е. и превышал нормальные показатели ( $0,500-0,700$  у.е.). Использование препарата коррекции 2 приводило к увеличению ИИА до  $0,878 \pm 0,408$  у.е. (рис. 3б).

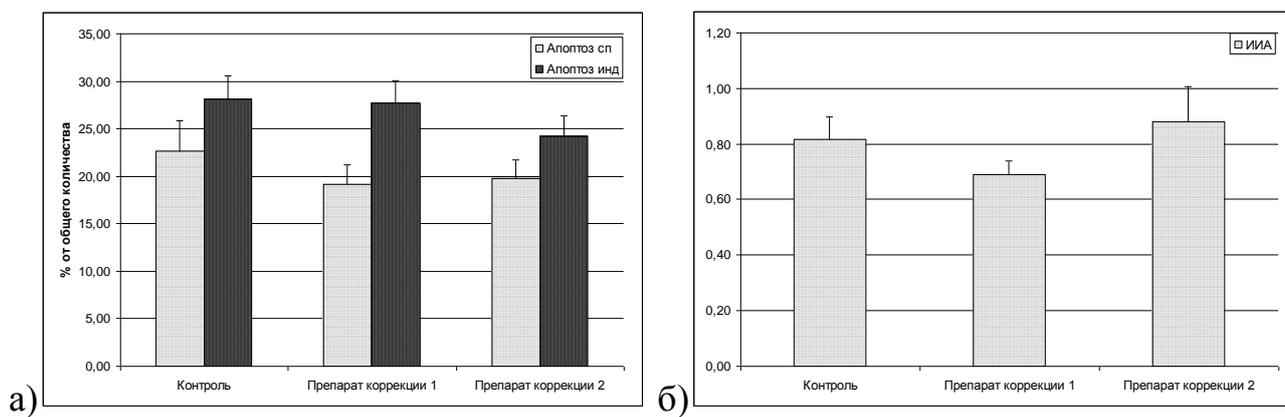


Рис. 3. Влияние препаратов коррекции на уровень апоптоза а) и индекс индукции апоптоза б) МНК больных.

Таким образом, результатами, полученными в ходе исследований, показано, что использованная в исследованиях модель приводит к внезапной сердечной смерти. Также выявлено маркеры, дающие возможность предсказать и оценить риск развития ВСС. Предложенные исследовательские приемы по показателям апоптоза, дают возможность прогнозировать как риски развития критических состояний, так и быть базовыми для усовершенствования методики точного диагностического алгоритма выявления риска ВСС и индивидуального контроля эффективности лечения сердечно-сосудистых патологий, что приводят к ВСС. На основе проведенных экспериментальных исследований была предложена и опробована методика индивидуального подбора препаратов коррекции и контроля лечения *in vitro*.

### Литература.

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М. : Практика, 1999. 459 с.
2. Данченко Е.О. Лабораторные методы оценки апоптоза и некроза // Медицинская панорама (Лабораторная медицина). 1999. N 3. С. 18-19.
3. Ігрунова К.М., Моторна М.М., Степачова Т.І. Апоптоз мононуклеарних клітин крові у хворих з патологією серцево-судинної систем // Лабораторна діагностика. 2004. № 1. С. 16-18.

4. Flow cytometry: a practical approach 3rd edition /University of Oxford ; edited by Michael G. Ormerod. Oxford: Oxford Univ. Press, 2000. 276 p.
5. Goldstein S., Medendorp Sh.V., Landis J.R., Wolfe R.A., Leighton R., Ritter G., Vasu C.M., Acheson A.: Analysis of cardiac symptoms preceding cardiac arrest // Amer.J.Cardiol. 1986. Vol. 58. N 13. P. 1195-1198.
6. Hohnloser S.H. Der plotzliche Herztod. Diagnostik und Therapie bei Patient mit malignen ventrikularen // Arrhythmien. Therapiwoche. 1988. Vol. 38. N 43. P. 3160-3164.
7. Kuller L.H. Sudden death - definition and epidemiologic consideration // Prog. Cardiovasc. Dis. 1980. Vol. 23. N 1. P. 1-12.
8. Simon S.R., Powel L.H., Bartzokis T.C., Hoch D.H. A new system for classification of cardiac death as arrhythmic, ischemic, or due to myocardial pump failure // Am. J. Cardiol. 1995. Vol 76. N 12. P.896-898.
9. Topol E.J., Smith J., Plow E.F., Wang Q.K. Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease // Human Molecular Genetics. 2006. Vol. 15. N 2. P. R117-R123.
10. Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998 // Circulation. 2001. Vol. 104. N 18. P. 2158–2163.