Активность комплексов дыхательной цепи моноклеаров периферической крови как маркер митохондриальной дисфункции при острой сердечно-сосудистой патологии

А. Г. Мишура¹, А. Б. Гайковая³, Г. Г. Родионов², В. А. Дадали³

¹СПбГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн», г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России, г. Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Activity of respiratory chain complexes of peripheral blood mononuclear cells as marker of mitochondrial dysfunction in acute cardiovascular pathology

L. G. Mishura, L. B. Gaikovaya, G. G. Rodionov, V. A. Dadali

Hospital for Veterans of Wars, All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov, North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Проведен анализ изменения активности комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов у 100 пациентов с острым инфарктом миокарда. Выявлено достоверное снижение активности комплексов II–III и IV на фоне увеличения активности комплекса I дыхательной цепи. По данным корреляционного анализа была обнаружена обратная связь концентрации тропонина T и I в сыворотке крови и активностью комплекса IV дыхательной цепи. Снижение активности комплекса IV дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов ниже 2,87 МЕ/г белка указывает на повышенный уровень клинического риска у пациентов с острым инфарктом миокарда.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, острый инфаркт миокарда, моноклеары периферической крови.

Summary

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities were determined by spectrophotometric enzyme assay in lymphocytes of 100 patients with acute myocardial infarction. A significant decrease in the activity of complexes II–III and IV and an increase in the activity of complex I of the respiratory chain were found. According to the correlation analysis, the feedback of troponin T and I concentrations in the serum and the activity of complex IV of the respiratory chain was detected. A decrease in the activity of the IV complex of the mitochondrial lymphocyte respiratory chain below 2.87 IU/g of protein indicates an increased level of clinical risk in patients with acute myocardial infarction.

Key words: mitochondrial dysfunction, acute myocardial infarction, peripheral blood mononuclear cells.

Введение

Нарушение функции митохондрий лежит в основе патогенеза и патогенетической терапии широкого круга заболеваний. Митохондриальная дисфункция (МД) не имеет этиологической и нозологической специфики по отношению к какой-либо конкретной болезни, но, включаясь в нее, участвует в качестве одного из механизмов [2]. Клинические проявления МД полиморфны и не могут быть интерпретированы однозначно. Современная диагностика и мониторинг МД требуют комплексного подхода и применения ряда высокотехнологичных и трудоемких лабораторных и инструментальных методов диагностики (хромато-масс-спектрометрия, КТ, МРТ и др.). МД и оксидативный стресс являются ключевыми факторами старения и оказывают значительное влияние на течение и исход различных заболеваний.

В настоящее время специалисты уделяют большое внимание роли МД и нарушениям энергетического метаболизма и энерготропной терапии при сердечно-сосудистой патологии, в частности при ОКС. Были проведены ряд исследований [3, 4], в которых показана эффективность энерготропной терапии при ОКС.

Нарушение функции дыхательной цепи митохондрий является отличительной чертой МД. Она часто является главным лабораторным маркером МД. Активность митохондриальных ферментов тромбоцитов и моноклеаров периферической крови может отражать состояние ферментативного статуса клеток других органов и тканей организма. Предполагается, что циркулирующие в крови моноклеары могут выступать в качестве ранних предиктивных биомаркеров митохондриальной дисфункции при

различных заболеваниях в условиях метаболического стресса [1, 4, 5, 7, 8].

В настоящее время есть основание полагать, что метаболические нарушения при ОКС происходят не только в митохондриях ишемизированных кардиомиоцитов, но носят системный характер и могут быть выявлены при исследовании митохондрий в лимфоцитах периферической крови (цит. по [4]). Снижение активности митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах периферической крови является прогностическим маркером неблагоприятного течения ОКС [4].

Продолжаются поиск и совершенствование методов определения биомаркеров МД. Одним из перспективных направлений в этой области является определение активности комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов у пациентов с МД. Методы фотометрического

Таблица 1
Уровень активности комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов
в группе сравнения (60–74 года) и у пациентов с ОИМ (60–97 лет) Мд [Q25–75]

Параметр, единицы измерения	Группа лиц 60–74 лет (n = 80)	Пациенты с ОИМ (60–90 лет) (n = 100)	Уровень значимости p
Комплекс I, МЕ/г белка	6,72 [5,85–7,35]	9,61 [8,21–11,03]	< 0,001
Комплекс I–III, МЕ/г белка	2,33 [1,73–2,81]	2,12 [1,79–2,37]	0,057
Комплекс II–III, МЕ/г белка	6,74 [6,09–7,61]	5,16 [4,26–5,84]	< 0,001
Комплекс IV, МЕ/г белка	5,21 [4,50–5,93]	2,53 [2,03–3,06]	< 0,001

определения активности комплексов дыхательной цепи относительно просты по технологии, сравнительно недороги и в значительной степени поддаются автоматизации, что позволяет применять их при выполнении исследований в КДЛ.

Цель работы: оценить прогностическую значимость определения активности комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов крови у пациентов с ОИМ.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 100 пациентов с острым инфарктом миокарда, проходивших лечение в 2013–2017 годах в СПбГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» в возрасте от 60 до 90 лет, из них мужчин 45 (45 %) и 55 (55 %) женщин. В группу сравнения вошли 80 человек в возрасте от 60 до 74 лет (28 мужчин [35 %] и 52 женщины [65 %]) из числа лиц, проходивших ежегодные медицинские осмотры в амбулаторно-консультативном отделении данного медучреждения в 2013–2017 годах.

В основную группу были включены пациенты в возрасте 60 лет и старше с диагнозом «острый инфаркт миокарда» (в период 2–3 суток) (уровень тропонина Т выше 0,1 нг/мл, тропонина I выше 0,4 нг/мл), подписавшие информированное согласие пациента на участие в исследовании.

Всем пациентам, включенным в исследование, при отсутствии противопоказаний назначали базисную терапию β-блокаторами, иАПФ, аспирином и статинами. При необходимости назначали диуретики, пролонгированные нитраты, антиаритмические препараты. Тромболизис и эндоваскулярное восстановление коронарного кровотока пациентам на момент обследования не проводили.

Кровь брали в стандартные вакуумные пробирки с ЭДТА. Лимфоциты крови выделяли с использованием Lymphoprep™ Tube по прилагаемой методике. Полученные клетки ресуспензировали в изотоническом (0,154 М NaCl) фосфатном буфере (pH = 7,4) и гомогенизировали (гомогенизатор CAT X-120, Германия). В гомогенате лимфоцитов крови человека определяли активность комплексов дыхательной цепи (I–IV) (на биохимическом анализаторе KONE Specific Basic [9], активность СОД и каталазы (на спектрофотометре Spekord M40 [6]. Концентрацию лактата и активность ЛДГ в гомогенате лимфоцитов определяли с использованием автоматических биохимических анализаторов Cobas Integra 400 Plus или AU 480; концентрацию тропонинов Т и I в сыворотке крови определяли на Hitachi Elecsys 2010 и Access 2 соответственно. Полученные результаты относили к концентрации белка, которую определяли методом Лоури и с красителем пирогаллоловым красным.

Референтные интервалы (РИ) активности комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов крови: комплекс I — 5,67–8,65 МЕ/г белка; комплекс I–III — 1,73–3,68 МЕ/г белка; комплекс II–III — 5,88–8,89 МЕ/г белка; комплекс IV — 4,25–7,17 МЕ/г белка. РИ других исследованных показателей в лимфоцитах крови: лактат — 0,09–0,38 ммоль/г белка, ЛДГ — 237,01–557,10 МЕ/г белка, СОД — 12,25–28,10 Е/г белка, каталаза — 17,88–41,72 Е/г белка.

Полученные данные обрабатывали с использованием статистической программы PASW Statistics 20 и Microsoft Excel. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для изучения связи между количественными переменными пользовались методом корреляционного анализа. Уровень значимости всех статистических тестов принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Активность комплекса I дыхательной цепи у пациентов с ОИМ достоверно отличалась от активности в группе сравнения ($p < 0,001$) (табл. 1). Этот показатель практически у всех пациентов превышал значение РИ и только в некоторых случаях находился на верхней границе РИ. Медианное значение от группы сравнения отличалось на +43 %.

Активность комплекса I–III у пациентов с ОИМ не отличалась от активности в группе сравнения ($p > 0,05$) и преимущественно находилась в пределах референтных интервалов.

Активность комплекса II–III дыхательной цепи практически у всех пациентов с ОИМ находилась ниже РИ, и только в некоторых случаях — на нижней границе РИ ($p < 0,001$). Медианное значение от группы сравнения отличалось на –24 %.

Активность комплекса IV дыхательной цепи практически у всех пациентов с ОИМ находилась ниже РИ ($p < 0,001$). Медианное значение от группы сравнения смещалось на –52 %. По данным корреляционного анализа была обнаружена обратная связь концентрации тропонина Т и I в сыворотке крови с активностью цитохрома С оксидазы (комплекс IV) дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов. Для тропонина Т $r = -0,36$ ($p = 0,01$); для тропонина I $r = -0,41$ ($p = 0,01$).

При низком парциальном давлении кислорода активность цитохром оксидазы в действительности может оказаться лимитирующим фактором, что и было показано. 75-й процентиль активности комплекса IV у умерших в стационаре пациентов составил 2,87 МЕ/г (табл. 2). Активность комплекса IV ниже этого уровня может указывать на повышенный риск неблагоприятного исхода ОИМ. Активность комплекса II–III была снижена у всех умерших пациентов с острым ИМ ($p < 0,05$)

Таблица 2
Уровень активности комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов
у пациентов с ОИМ, выписанных из стационара с летальным исходом и без такового (60–97 лет) Md [Q25–75]

Параметр, единицы измерения (МЕ/г белка)	Пациенты с летальным исходом в период госпитализации (n = 36)	Пациенты, выписанные из стационара без летального исхода (n = 64)	Уровень значимости p
Комплекс I	9,6 [8,28–10,77]	9,74 [8,25–11,74]	0,385
Комплекс I–III	1,94 [1,63–2,27]	2,15 [1,87–2,43]	0,035
Комплекс II–III	4,81 [3,93–5,78]	5,14 [4,35–5,89]	0,347
Комплекс IV	2,29 [1,73–2,87]	2,87 [2,18–3,29]	0,045

Таблица 3.
Активность ЛДГ, СОД и каталазы и концентрация лактата в лимфоцитах крови
в группе сравнения (60–74 лет) и у пациентов с ОИМ (60–97 лет) Md [Q25–75]

Параметр, единицы измерения	Группа лиц возрастом 60–74 лет (n = 80)	Пациенты с ОИМ (60–90 лет) (n = 100)	Уровень значимости p
Лактат, ммоль/г белка	0,20 [0,13–0,26]	0,25 [0,19–0,31]	< 0,001
СОД, Е/г белка	18,03 [14,60–22,61]	16,32 [12,41–20,22]	0,006
Каталаза, Е/г белка	26,27 [19,86–31,22]	21,42 [15,28–28,62]	0,016
ЛДГ, МЕ/г белка	348,77 [294,95–412,56]	443,77 [306,86–544,48]	< 0,001

в сопоставлении с группой сравнения, но эти показатели достоверно не отличались от показателей всей группы пациентов с ОИМ ($p = 0,347$) (табл. 2).

Подобное изменение исследуемых показателей указывает на дисфункцию дыхательной цепи в лимфоцитах крови. Увеличение активности комплекса I, в отсутствии значимого изменения активности комплекса I–III, при снижении активности комплекса II–III косвенно позволяет предположить, что транспорт электронов по цепи переноса электронов митохондрий лимфоцитов у пациентов с острым ИМ осуществляется преимущественно через комплексы I, III, IV.

Практически двухкратное увеличение отношения активности ЛДГ к активности последнего (IV) комплекса митохондриальной цепи переноса электронов по отношению к группе сравнения позволяет судить об усугублении митохондриальной энергетической дисфункции. При этом активность ЛДГ и концентрация лактата находились в пределах референтных интервалов (табл. 3), из чего можно сделать вывод, что вклад анаэробных окислительно-восстановительных процессов в синтез АТФ находится на максимально возможном в данных условиях уровне, а интенсивность аэробных окислительно-восстановительных процессов падает.

В лимфоцитах крови пациентов с острым ИМ активность СОД и каталазы не выходила за границы РИ. Этот может указывать на то, что активность СОД и каталазы остается достаточной

даже при снижении эффективности работы дыхательной цепи с увеличением возможных утечек электронов. Вместе с тем возможно, что активность этих ферментов первой линии антиоксидантной защиты находится на максимальном уровне и они не справляются со своей функцией на фоне образования значительного количества АФК при дисфункции дыхательной цепи.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что, несмотря на проводимое лечение, при остром ИМ клетки организма испытывают дефицит АТФ. Вероятно, это может быть связано с: 1) усугублением гипоксии вследствие нарушения гемодинамики; 2) воздействием свободных радикалов, образование которых усиливается при дисфункции дыхательной цепи; 3) побочными эффектами длительного применения лекарственных препаратов, влияющих в том числе на дыхательную цепь (например, β -адреноблокаторы и статины ингибируют синтез CoQ_{10} , а также активность комплекса III дыхательной цепи); 4) разрушением митохондрий или их повреждением; 5) возрастными изменениями и недостаточностью эссенциальных метаболически активных веществ (в первую очередь CoQ_{10}), вследствие чего развивается полисистемная митохондриальная дисфункция. В любом случае митохондриальный энергодефицит, вне зависимости от его этиологии, утяжеляет как сам патологический процесс, так и репарацию поврежденных клеток, тканей и органов [4, 8]. Вследствие

этого возрастает и вероятность неблагоприятного исхода. В наших исследованиях внутрибольничная летальность среди пациентов со сниженной в три и более раза активностью комплекса IV составила 83 %, в то время как среди всех остальных не превышала 20 %. Однако достоверные отличия активности комплексов дыхательной цепи у пациентов с разными сроками внутрибольничной летальности не были обнаружены. Из этого можно заключить, что ограничение тканевого дыхания при ОИМ в результате потери цитохромоксидазной активности либо напрямую, либо опосредованно может обусловить большую внутрибольничную летальность. В ранее проведенных исследованиях К.Г. Куликова (2013) было показано, что самый большой процент сердечно-сосудистых осложнений и летальности отмечался у больных с острым ИМ и низкими показателями сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах (среднее значение $14,89 \pm 1,04$ у.е. (цитохимический метод) (активность других комплексов дыхательной цепи не определяли), что свидетельствует о неблагоприятном исходе заболевания у этих пациентов [4].

Заключение

Суммируя изложенные факты, необходимо отметить, что ограничение тканевого дыхания в лимфоцитах крови в результате прямой или опосредованной дисфункции комплексов дыхательной цепи может быть ключевым лабораторным маркером при диагностике МД. Это

подтверждает высказывание Chacko и соавт., что циркулирующие лимфоциты и моноциты могут являться «канарейкой в угольной шахте» [8], и выступать в качестве ранних лабораторных маркеров или предиктивных биомаркеров митохондриальной дисфункции в условиях метаболического стресса.

Однако чувствительность дыхательной цепи к воздействию терапии зависит от исходного состояния энергетического метаболизма у пациентов с ОКС, и у пациентов с выраженным изменением энергетического обмена изменения показателей клеточного энергообмена после проведенного лечения минимальны [4]. Поэтому определение активности всех комплексов дыхательной цепи может иметь большое значение при индивидуальном подборе митохондриальной терапии. Дополнение терапии ОИМ препаратами компонентов дыхательной цепи и другими энерготропными препаратами может усиливать ее эффективность [3, 4, 10].

Выводы

У пациентов с острым инфарктом миокарда выявлена дисфункция митохондриальной цепи передачи электронов с достоверным снижением активности комплексов II–III и IV на фоне увеличения активности комплекса I. Установлено, что снижение активности комплекса IV дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов ниже 2,87 МЕ/г белка указывает на повышенный уровень клинического риска у пациентов с острым инфарктом миокарда во время пребывания в стационаре.

Список литературы

1. Атаханов Ш.Э., Духова З.Н., Катосова Л.К., др. Корреляция активности дегидрогеназ лимфоцитов и внутренних органов // Медицинский журнал Узбекистана. — 1982. № 5. — С. 63–68.
2. Васюк Ю.А. [и др.] Вторичная митохондриальная дисфункция при остром коронарном синдроме // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. — 2007. № 1. — С. 41–47.
3. Каленикова Е.И. [и др.] Сравнение кардиопротекторной эффективности коэнзима Q₁₀ и мексикора при экспериментальной ишемии миокарда // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2015. — Т. 78, № 6.
4. Куликов К.Г. Роль митохондриальной дисфункции в патогенезе и прогнозе острого коронарного синдрома и возможности ее медикаментозной коррекции: Автореф. диссертации на соискание ученой степени д-ра мед. наук. — Москва: ГБОУ ВПО МГМСУ имени А.И. Евдокимова Минздрава России, 2013. — С. 48.
5. Нарциссов Р.П. Диагностические и прогностические возможности клинической цитохимии в педиатрии // Вестник Гиппократ. — 1998. № 1. — С. 10–26.
6. Путилина Ф.Е., Галкина О.В., Ещенко Н.Д., и др. Под ред. Ещенко Н.Д. Практикум по свободнорадикальному окислению: Учеб.-метод. пособие. — СПб: С.-Петерб. гос. ун-т, 2006. — 108 с.
7. Удалов Ю.Д., Куликов К.Г., Панкратова В.В., Быков В.Н. Исследование митохондриальной дисфункции у больных с инфарктом миокарда после хирургических вмешательств на органах брюшной полости // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2014. № 1 (45). — С. 71–74.
8. Chacko B.K. [и др.] Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood // Lab Invest. — 2013. — Jun. — Т. 93, № 6. — С. 690–700.
9. Shinde S., Pasupathy K. Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: preliminary study // Neurol India. — 2006. — Dec. — Т. 54, № 4. — С. 390–3.
10. Zhu B.Q. [и др.] Comparison of pyrroloquinoline quinone and/or metoprolol on myocardial infarct size and mitochondrial damage in a rat model of ischemia/reperfusion injury // J Cardiovasc Pharmacol Ther. — 2006. — Jun. — Т. 11, № 2. — С. 119–28.

Для цитирования. Мишура Л.Г., Гайковая Л.Б., Родионов Г.Г., Дадали В.А. Активность комплексов дыхательной цепи мононуклеаров периферической крови как маркер митохондриальной дисфункции при острой сердечно-сосудистой патологии // Медицинский алфавит. Серия «Неотложная медицина и кардиология». — 2019. — Т. 2. — 31 (406). — С. 16–19.

XI Международная конференция «Жизнеобеспечение при критических состояниях»

**15 ноября НИИ общей реаниматологии имени В. А. Неговского проводит
XI Международную конференцию «Жизнеобеспечение при критических состояниях».**

Во время мероприятия состоится «освежающий» курс лекций в рамках федерального пилотного проекта по непрерывному медицинскому образованию (НМО).

Основные вопросы для обсуждения

1. Механизмы развития критических состояний.
2. Травма, кровопотеря, шок.
3. Острая дыхательная недостаточность, ИВЛ, экстракорпоральная оксигенация.
4. Острые расстройства гемодинамики, вспомогательное кровообращение.
5. Структурно-функциональные и метаболические изменения ЦНС при критических состояниях.
6. Инфекционные осложнения в реаниматологии, сепсис.
7. Экстракорпоральные методы детоксикации в реаниматологии.
8. Анестезиология-реаниматология в специализированных областях (педиатрия, акушерство и гинекология, сердечно-сосудистая хирургия, нейрохирургия...).
9. Проблема гемостаза в анестезиологии-реаниматологии.
10. Генетические и молекулярные механизмы критических состояний.
11. Экспериментальные исследования в анестезиологии-реаниматологии.
12. Образовательные технологии в анестезиологии-реаниматологии.
13. Организационные и правовые вопросы анестезиологии-реаниматологии.

Запланированы сателлитные симпозиумы и совместные заседания с Обществом по изучению шока, Национальным советом по реанимации.

Оригинальные работы будут опубликованы в журнале «Общая реаниматология» (Scopus).

Участие в работе конференции возможно в формах тезисов и устного доклада, а также публикации тезисов без доклада. Количество тезисов от участника — не более трех.

Для участия в научной программе конференции обращайтесь в оргкомитет по тел. (495) 650-96-77 и электронной почте niiorrarnn@niiorrarnn.ru.