

УДК 612.67. 612.017

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИОКАРДЕ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ C57BL/6 ПОСЛЕ НЕКАРДИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПЕРАЦИИ

© 2024 г. М. В. Кондашевская*, В. В. Алексанкина, К. А. Артемьева, К. А. Касабов,
член-корреспондент РАН Л. В. Кактурский

Поступило 16.08.2024 г.

После доработки 22.08.2024 г.

Принято к публикации 23.08.2024 г.

Определено, что около 10% пациентов, не имеющих сердечно-сосудистых заболеваний, перенеся некардиологическую хирургическую операцию (ХО), страдают от повреждения миокарда (ПМ) и имеют 10% риск смерти в течение 30 дней после ХО. Предоперационный стресс (ПС) повышает риск ПМ после ХО (ПМХО). Механизмы ПМХО недостаточно изучены. Последствием многих ХО является гиподинамия с развитием слабости и утомляемости. На сегодняшний день связь между ХО и изменениями морфофункционального состояния мышц в послеоперационном периоде изучена неудовлетворительно. В данном исследовании впервые обнаружено, что у мышей C57BL/6 метаболические и гормональные изменения, индуцируемые ПС+ХО, а также самой ХО, являются причинными факторами, лежащими в основе механизмов ПМХО в послеоперационном периоде. Также впервые обнаружено, что даже невысокие значения триглицерид-глюкозного индекса могут указывать на ишемические/гипоксические повреждения миокарда и скелетных мышц. Необходимы дополнительные исследования, посвященные воздействию ПС и ХО на миокард и мышечную работоспособность, а также рискам и пользе периоперационного лечения.

Ключевые слова: мыши C57Black/6, хирургическая операция, наркоз, метаболические и гормональные изменения, ишемия миокарда и скелетной мышцы

DOI: 10.31857/S2686738924060025

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире ежегодно проводится множество некардиальных операций, которые, как выяснилось, связаны с повышенной частотой неблагоприятных периоперационных сердечно-сосудистых событий. После обширного исследования, выполненного в 2014 г. коллективом медицинских сотрудников Канады, США, Швейцарии и Великобритании, появился термин “myocardial injury after non-cardiac surgery (MINS)”, относящийся к повреждению миокарда вследствие некардиальной операции [1]. Масштаб проблемы значителен. Подсчитано, что из 200 миллионов пациентов, ежегодно подвергающихся некардиальным операциям по всему миру, 8 миллионов страдают

от MINS, и, вероятнее всего, 1 миллион взрослых умрет в течение 30 дней после операции [2]. Несомненно, наличие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) обуславливает значительное число смертей [3]. Тем не менее проблема MINS касается и пациентов без ССЗ. Предполагаемыми механизмами повреждения миокарда в периоперационном периоде являются: нарушение целостности, или разрыв атеросклеротической бляшки, состояние гиперкоагуляции, повышение уровня катехоламинов, нарушение сердечного ритма, а также несоответствие потребности в кислороде его поступлению в миокард [4]. В то же время каждый из указанных механизмов имеет как клинические и экспериментальные подтверждения, так и опровержения.

В когортных рандомизированных исследованиях установлено, что почти четверть пациентов, подвергавшихся вненесердечным операциям, испытывали депрессию или тревогу перед операцией. Такие предоперационные эмоции являются существенным предиктором увеличения длительности пребывания в клинике в связи

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, Москва, Россия
*e-mail: marivladiko@mail.ru

с послеоперационными осложнениями и несознательными выраженным послеоперационными болями, обусловливающими повышение потребления транквилизаторов и анальгетиков, обладающих многочисленными негативными эффектами в отношении миокарда. Оценка кардиального риска является краеугольным камнем рационального периоперационного ведения пациентов при инвазивных хирургических вмешательствах [5]. Функциональным последствием многих разнообразностей хирургических операций является гиподинамия с развитием слабости и утомляемости. По поводу состояния скелетной мускулатуры мы можем заключить, что на сегодняшний день лишь в нескольких исследованиях изучалась связь между хирургическим вмешательством и изменениями морфофункционального состояния мышц в послеоперационном периоде [6, 7].

Цель данного исследования – охарактеризовать в послеоперационном периоде метаболическое состояние миокарда и скелетной мышцы лабораторных грызунов, подвергавшихся некардиологической хирургической операции с применением ингаляционной анестезии и моделированием предоперационного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены в осенне-зимний период на половозрелых генетически однородных самцах мышей C57BL/6 ($n=40$; питомник “Столовая”) с исходной массой тела 18–20 г. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и стандартному полноценному сухому полнорационному гранулированному комбикорму ПК-120 для лабораторных животных. Были сформированы 4 группы (по 10 особей в каждой). 1-я группа – контрольная (К); 2-я – предоперационный стресс + хирургическая операция (группа СХО) под ингаляционным наркозом (ИН, диэтиловый эфир); 3-я – хирургическая операция под ИН без стресса (группа ХО); 4-я – воздействие только ИН (группа ИН).

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под ИН на 15-й день после ХО, то есть на 25-й день от начала опыта (рис. 1). Сразу после этого производили забор необходимого для исследований материала.

Моделирование предоперационного стресса

Предоперационный стресс индуцировали, используя предаторный стресс (страх жертвы перед хищником), подвергая мышей воздействию запаха кошачьей мочи (10 мин) в течение 10 сут. На 11-е сутки животным проводили хирургическую операцию, используя ИН.



Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Процедура хирургической операции

Мышь размещали на спине, среднюю часть брюшка выбивали, с соблюдением правил асептики и антисептики, по белой линии живота наносили сквозной разрез брюшной стенки вплоть до брюшины. Длина разреза 10 ± 2 мм, контроль осуществлялся с помощью электронного штангенциркуля. Рану послойно ушивали хирургической нитью (“Ультрасорб” USP 5-0, “Линтекс”) непрерывным обвивным швом, шов обрабатывали спреем “Террамицин” (Zoetis, IGS Aerosol GmbH). Через 15 сут шов уже не обнаруживался, брюшко зарастило шерстью.

Биохимический анализ

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под ИН, брали кровь из шейных сосудов. В сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе Rendom Access A-25 (BioSystems, Испания) определяли уровень глюкозы и триглицеридов (ТГ) (BioSystems, Испания). Рассчитывали значения триглицерид-глюкозного индекса (ТГИ) по формуле: $ТГИ = \ln [\text{триглицериды натощак} \times \text{глюкоза натощак}] / 2$ [8].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Используя иммуноферментные наборы, с помощью микропланшетного иммуноферментного анализатора “ANTHOS 2010” (Австрия), в плазме крови определяли уровень кортикостерона с использованием набора регентов “IBL” (Германия).

Гистологические исследования

Для морфофункционального анализа брали образцы скелетной мышцы (*m. acromiotrapezius*) и миокарда левого желудочка, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоженные образцы заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Для определения уровня гликогена использовали метод А.Л. Шабадаша с проведением контрольных опытов с амилазой. С целью выявления зон гипоксии в неокрашенных срезах, применяли поляризационную микроскопию (поляризационные фильтры микроскопа “Axioplan 2 imaging”), кроме того, срезы окрашивали методом ГОФП по J.T. Lie. Окраска исходно разработана для выявления ишемических изменений миокарда. Название метода окраски “ГОФП” произошло от первых букв используемых красителей: гематоксилин, основной фуксин, пикриновая кислота [9, 10]. На микрофотографиях срезов, полученных с помощью микроскопа “Axioplan 2 imaging”, проводили определение оптической плотности окраски, или автофлуоресцентного свечения, используя компьютерную программу ImageJ (Fiji). Все изображения были получены при равных условиях, значения выражены в пикселях ImageJ. Измерение всех параметров производили слепым методом.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Исследуемые группы сравнивали с использованием ANOVA, критерия Крускала–Уоллиса для множественных сравнений и *U* критерия Манна–Уитни для парных сравнений. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля (25%; 75%). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ни одно из применяемых в эксперименте воздействий не провоцировало изменения внешнего вида и различий массы тела мышей в какие-либо периоды эксперимента.

В конце эксперимента у мышей групп СХО и ХО наблюдалось снижение уровня глюкозы

в крови (рис. 2). Этот процесс сопровождался возрастанием содержания триглицеридов и, самое важное, повышением триглицерид-глюкозного индекса (ТГИ, рис. 2). ТГИ был разработан в 2008 г., он проявил себя как высокочувствительный (84.0%) и специфичный тест (45.0%) для определения инсулинорезистентности и выявления пациентов с высоким риском развития диабета [8]. Достаточно скоро было установлено, что ТГИ может рассматриваться как доступный и надежный показатель для определения лиц с высоким риском развития ССЗ различного генеза [11].

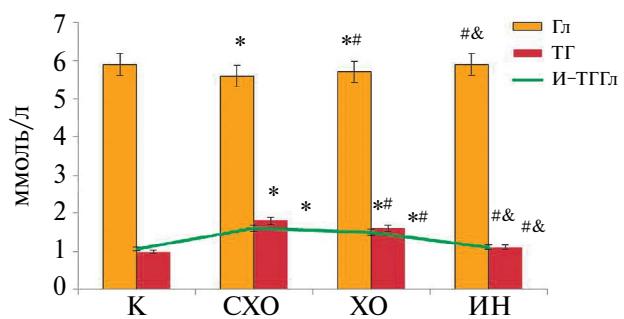


Рис. 2. Показатели уровня глюкозы и триглицеридов в крови мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде, значения триглицерид-глюкозного индекса. К – контроль, СХО – группа стресс + хирургическая операция, ХО – хирургическая операция, ИН – ингаляционный наркоз, Гл – глюкоза, ТГ – триглицериды, И-ТГГл – триглицерид-глюкозный индекс.

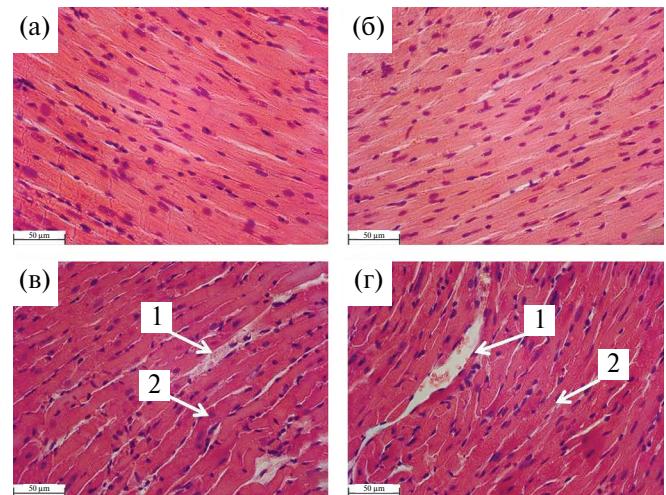


Рис. 3. Миокард мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. А – контроль, В – ингаляционный наркоз, С – стресс + хирургическая операция, Д – хирургическая операция. Окраска гематоксилин и эозин, Ув. 400. Стрелками 1 указаны кровеносные сосуды со сладжированными эритроцитами, стрелками 2 – извитость кардиомиоцитов.

В настоящее время ТГИ широко применяется как в клинической практике, так и в экспериментальных исследованиях [12].

В нашем эксперименте мыши получали обычный комбикорм, не вызывающий ожирения, гипергликемии и экспериментального диабета, в связи с этим, значения ТГИ были не столь велики, как при моделировании диабета [12]. Тем не менее, мы решили изучить морфофункциональное состояние миокарда и скелетной мышцы (*m. acromiotrapezius*) в послеоперационном периоде.

При вскрытии животных макроскопических изменений сердца не выявлено. Оценивая структуру миокарда на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, у мышей контрольной группы и группы, получавшей только ИН, было отмечено, что кардиомиоциты имели равномерную окраску цитоплазмы и ядер, все структуры сохраняли характерное гистологическое строение (рис. 3A, B). Морфология миокарда животных обеих оперированных групп, СХО и ХО, характеризовалась явлениями небольшой волнообразной деформации мышечных волокон, сладжирования эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла (рис. 3C, D). Анализ структуры мышечных волокон, окрашенных гематоксилином и эозином не выявил никаких особенностей ни у одной группы животных.

Однако с помощью поляризационной микроскопии в миокарде и скелетных мышцах были выявлены зоны аутофлуоресценции, идентифицирующие участки ишемии у групп мышей СХО и ХО (рис. 4B, C, D, рис. 5B, C, D). Следует отметить, что даже у группы ИН в мышечных волокнах определялись единичные светящиеся зоны (рис. 4B, рис. 5B).

Измерение оптической плотности аутофлуоресценции и окраски ГОФП позволило зарегистрировать статистически значимое отличие морфофункционального состояния миокарда и скелетных мышц экспериментальных групп мышей от контроля (табл. 1).

Аутофлуоресценция поперечнополосатой мускулатуры – давно известное явление, по которому судят о степени ишемического состояния, индуцирующего гипоксию. Одним из основных источников аутофлюоресценции являются нуклеотиды (пиридиновые и флавиновые), находящиеся в цитозоле и митохондриях миоцитов [13]. Накопление никотинамидадениннуклеотида (НАДН) и никотинамидадениннуклеотидфосфата (НАДФН) инициирует перекисное окисление липидов, обусловливающее продукцию активных форм кислорода в миоцитах [14]. Следовательно, применение в нашем эксперименте поляризационной микроскопии позволило установить, что в послеоперационном периоде в скелетных мышцах и миокарде мышей

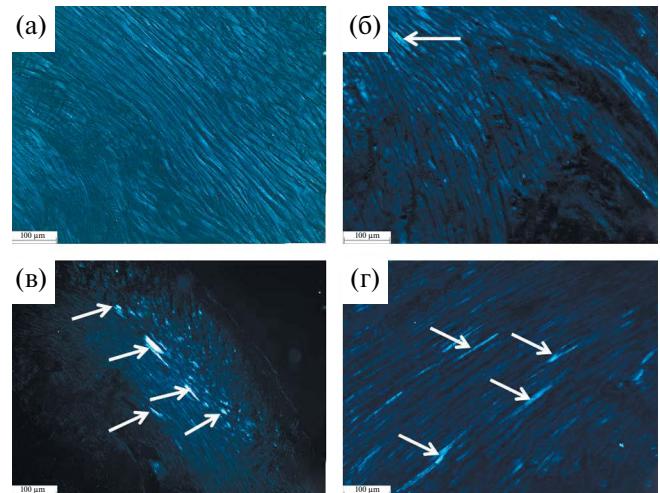


Рис. 4. Аутофлуоресценция кардиомиоцитов мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. Все обозначения те же, что и на рис. 2. Стрелками указаны зоны ишемии.

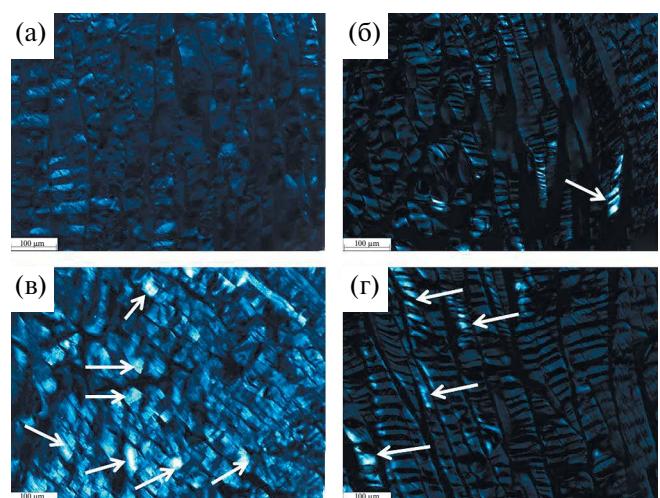


Рис. 5. Аутофлуоресценция миоцитов мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. Все обозначения те же, что и на рис. 3. Стрелками указаны зоны ишемии.

возникает состояние ишемии/гипоксии, то есть нарушение тканевого и клеточного дыхания. Дополнительным доказательством развития ишемии служила окраска гистологических срезов методом ГОФП, используемого для окрашивания в красный цвет фуксинофильного субстрата – участков повреждения миоцитов, или кардиомиоцитов (табл. 1) [9, 10].

Выявленные нами ишемия и гипоксия в скелетных мышцах и миокарде свидетельствуют о нарушении энергетического метаболизма, одним из важных компонентов которого является глюкоза.

Таблица 1. Показатели кортикостерона и оптической плотности окрашенных и неокрашенных (аутофлюоресценция) гистологических препаратов миокарда и скелетной мышцы мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде

Показатели/Группы	Органы	Контроль	СХО	ХО	ИН
ОП аутофлюо-рессценции рх	Миокард	24.1 (19.5; 29.3)	50.6* (46.8; 54.5)	41.1** (36.5; 45.5)	29.5**& (23.3; 34.5)
	Мышца	21.4 (18.3; 24.8)	46.2* (40.3; 51.5)	39.8** (36.5; 43.3)	21.5** (17.1; 25.8)
ОП ГОФП рх	Миокард	90.1 (80.5; 100.2)	171.5* (160.1; 183.8)	155.3** (143.8; 166.3)	103.6** (93.3; 112.2)
	Мышца	56.1 (48.8; 62.5)	157.3* (149.3; 166.1)	144.5** (141.5; 148.1)	53.2** (46.8; 59.1)
ОП ШИК рх	Миокард	230.3 (211.7; 244.1)	170.8* (158.3; 183.1)	184.7** (168.3; 200.1)	229.9** (214.3; 247.8)
	Мышца	193.5 (182.1; 205.3)	155.9* (145.7; 164.8)	163.4* (153.7; 172.5)	191.3** (170.1; 204.8)
Кортикостерон пг/мл	Кровь	62.3 (56.2; 67.1)	35.8 * (30.7; 41.1)	80.6 ** (74.8; 90.2)	64.6** (59.7; 68.3)

Примечание. СХО – группа стресс + хирургическая операция, ХО – хирургическая операция, ИН – ингаляционный наркоз, рх – пиксели программы ImageJ. $p<0.05$ по сравнению *с контролем, **с группой СХО, &**с группой ХО (U критерий Манна–Уитни).

На рис. 2 мы продемонстрировали небольшое, но статистически значимое снижение уровня глюкозы. Проведенная нами ШИК реакция на выявление запасов гликогена, позволила зарегистрировать снижение уровня этого полисахарида в миокарде и мышце СХО и ХО групп на 26 и 20%, 20 и 16% соответственно (табл. 1). Ранее мы указывали на сокращение ресурсов гликогена в печени при стрессе [15]. В связи с этим мы с большой долей уверенности можем считать, что в послеоперационном периоде миокард и скелетные мышцы мышей находились в состоянии дефицита энергетических ресурсов в виде углеводов. Тем не менее хорошо известно, что мышечная система обоих органов способна адаптироваться и переходить на другие резервы. Одним из них являются триглицериды, повышение содержания которых в крови мы зарегистрировали (рис. 2). Однако возрастание значений ТГИ свидетельствует о нарушении метаболизма изучаемых нами органов [11]. Кроме того, вероятно нарушается также механизм регуляции уровня глюкозы кортикостероном. Снижение содержания глюкозы в крови является стрессом для организма, антистрессорная функция глюкокортикоидов заключается в повышении уровня этого углевода. Тем не менее этого не наблюдается в нашем эксперименте ни при понижении уровня кортикостерона в крови (группа СХО, табл. 1), ни при возрастании содержания этого гормона (группа ХО, табл. 1).

Таким образом, в данном исследовании впервые обнаружено, что метаболические и гормональные изменения, индуцируемые предоперационным стрессом, а также самой хирургической операцией, являются решающими причинными факторами, лежащими в основе механизма

повреждения миокарда и скелетных мышц у мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. Также впервые обнаружено, что даже невысокие значения триглицерид-глюкозного индекса могут указывать на ишемические/гипоксические повреждения миокарда и скелетных мышц. Предоперационный стресс значительно ухудшал морфофункциональное состояние исследуемых органов. Необходимы дополнительные исследования, посвященные воздействию предоперационного стресса и некардиологической хирургической операции на миокард и мышечную работоспособность, а также рискам и пользе периоперационного лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Госзадания лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского № 1023100400015-7-3.1.9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры проводили согласно требованиям и международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения

“Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского” (протокол № 34 от 22 апреля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Botto F, Alonso-Coello P, Chan M.T. et al.* Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes // *Anesthesiology*. 2014. V. 120. № 3. P. 564–578.
2. *Vascular Events In Noncardiac Surgery Patients Cohort Evaluation (VISION) Study Investigators, Devereaux P.J., Chan M.T. et al.* Association between post-operative troponin levels and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery [published correction appears in *JAMA*. 2012. V. 307. № 24. P. 2590] // *JAMA*. 2012. V. 307. № 21. P. 2295–2304.
3. *Devereaux P.J., Xavier D., Pogue J. et al.* Characteristics and short-term prognosis of perioperative myocardial infarction in patients undergoing noncardiac surgery: a cohort study // *Ann Intern Med*. 2011. V. 154. № 8. P. 523–528.
4. *Cole G.D., Francis D.P.* Perioperative β blockade: guidelines do not reflect the problems with the evidence from the DECREASE trials // *BMJ*. 2014. V. 349. P. g5210.
5. *Üstünel F, Tura İ, Akçam AT et al.* The Effect of Pre-operative Fear of Pain on Postoperative Pain Levels and the Amount of Analgesic Consumption // *Pain Manag Nurs*. 2023. V. 24. № 6. P. 617–621.
6. *Murgia M, Brocca L, Monti E., et al.* Plasma proteome profiling of healthy subjects undergoing bed rest reveals unloading-dependent changes linked to muscle atrophy // *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023. V. 14. № 1. P. 439–451.
7. *Bautmans I, Van De Winkel N, Ackerman A. et al.* Recovery of muscular performance after surgical stress in elderly patients // *Curr Pharm Des*. 2014. V. 20. № 19. P. 3215–3221.
8. *Simental-Mendía L.E., Rodríguez-Morán M., Guerreiro-Romero F.* The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects // *Metab Syndr Relat Disord*. 2008. V. 6. № 4. P. 299–304.
9. *Lie J.T., Holley K.E., Kampa W.R. et al.* New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia // *Mayo Clin Proc*. 1971. V. 46. № 5. P. 319–327.
10. *Серов Р.А., Чекарева Г.А., Рагузин К.К. и др.* Применение окраски ГОФП – методом для выявления повреждений миокарда различного генеза // *Архив патологии*. 1977. Т. 34. Б. 5. С. 70–72.
11. *Sánchez-Íñigo L., Navarro-González D., Fernández-Montero A. et al.* The TyG index may predict the development of cardiovascular events // *Eur J Clin Invest*. 2016. V. 46. № 2. P. 189–197.
12. *Шиповская А.А., Ларина Н.А., Курбатова И.В. и др.* Значение триглицерид-глюкозного индекса в диагностике инсулинерезистентности при ранних формах неалкогольной жировой болезни печени // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтэроология*. 2021. Т. 194. № 10. С. 43–48.
13. *Theodossiou A., Hu L., Wang N. et al.* Autofluorescence Imaging to Evaluate Cellular Metabolism // *J Vis Exp*. 2021. V. 177. P. 10.3791/63282.
14. *Georgakoudi I., Quinn K.P.* Label-Free Optical Metabolic Imaging in Cells and Tissues // *Annu Rev Biomed Eng*. 2023. V. 25. P. 413–443.
15. *Kondashevskaya M.V., Mikhaleva L.M., Artem'yeva K.A. et al.* Unveiling the Link: Exploring Mitochondrial Dysfunction as a Probable Mechanism of Hepatic Damage in Post-Traumatic Stress Syndrome // *Int J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 13012. P. 2–26.

METABOLIC CHANGES IN THE MYOCARDIUM AND SKELETAL MUSCLES OF C57BLACK/6 MICE AFTER NON-CARDIOLOGICAL SURGERY

М. В. Kondashevskaya*, K. A. Artemyeva, V. V. Aleksankina, K. A. Kasabov, and Corresponding Member of the RAS L.V. Kaktursky

*Avtsyn Research Institute of Human Morphology Federal State Budgetary Scientific Institution
“Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russian Federation*

*e-mail: marivladiko@mail.ru

It has been determined that approximately 10% of patients without cardiovascular disease undergoing non-cardiac surgery (NS) suffer myocardial injury (MI) and have a 10% risk of death within 30 days after Sur. Preoperative stress (PS) increases the risk of MI after NS (MINS). The mechanisms

of MINS are not well understood. The consequence of many NS is physical inactivity with the development of weakness and fatigue. To date, the relationship between NS and changes in the morphofunctional state of muscles in the postoperative period has been poorly studied. This study reveals for the first time, that metabolic and hormonal changes induced by PS+NS, as well as NS itself and inhalational anesthesia in C57BL/6 mice, are causal factors underlying the mechanisms of MINS in the postoperative period. It was also discovered for the first time, that even low values of the triglyceride-glucose index can indicate ischemic/hypoxic damage of the myocardium and skeletal muscles. Preoperative stress significantly impaired morphofunctional state of the studied organs. More research is needed on the effects of PS and NS on myocardium and muscle performance, as well as the risks and benefits of perioperative treatment.

Keywords: C57Black/6 mice, surgery, anesthesia, metabolic and hormonal changes, myocardial and skeletal muscle ischemia