

УДК 612.018:616.37–06:611.41–089

ИЗУЧЕНИЕ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ И АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОМОЙ СЕЛЕЗЁНКИ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ

© 2012 г. Е.М. Франциянц, Л.С. Козлова, А.А. Маслов, Н.Д. Ушакова, С.А. Малинин

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
14 линия, 63, г. Ростов н/Д, 344037,
rnoi@list.ru

Rostov Research Cancer Institute,
14 line, 63, Rostov-on-Don, 344037,
rnoi@list.ru

Изучались трипсиновые протеиназы, в том числе компоненты калликреин-кининовой системы, и альфа-2-макроглобулин в плазме крови больных лимфомой селезенки при стандартном лечении гордоксом и экстракорпоральной фармакотерапии с использованием гордокса. Результаты свидетельствуют о том, что риск развития осложнения послеоперационного периода (острого послеоперационного панкреатита) значительно уменьшается при использовании экстракорпоральной фармакотерапии с гордоксом по сравнению с традиционным лечением.

Ключевые слова: лимфома селезенки, острый послеоперационный панкреатит, трипсиновые протеиназы.

Trypsin-like proteinases, including KKS components, and α -2-macroglobulin have been studied in blood plasma of patients with spleen lymphoma at standard treatment with gordox and extracorporeal pharmacotherapy with gordox use. Judging by the results, the risk of complicated postoperative period (development of acute postoperative pancreatitis) is significantly reduced at use of extracorporeal pharmacotherapy with gordox in comparison with traditional treatment.

Keywords: spleen lymphoma, acute postoperative pancreatitis, trypsin proteinases.

Ранний послеоперационный период после спленэктомии может осложниться острым послеоперационным панкреатитом (ОПП). Одной из основных причин ОПП считается ишемия поджелудочной железы (ПЖ) вследствие системных или регионарных расстройств кровообращения во время операции или в раннем послеоперационном периоде [1].

Такие процессы, как гемостаз, водно-солевой обмен в органах и тканях, многие функции полых и паренхиматозных органов могут нарушаться, являясь мишенями воспаления и боли, при этом центральным событием является активация калликреин-кининовой системы (ККС) и образование брадикинина [2, 3 и др.]. Вмешательство в функции этой системы может оказаться перспективным в плане нормализации процессов гемостаза микроциркуляторного русла периферических органов, в данном случае – поджелудочной железы. По данным литературы, α -2-макроглобулин, α -1-антихимотрипсин, интер- α -ингибитор трипсина и α -1-протеиназный ингибитор контролируют развитие всех воспалительных процессов [4–7]. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляет альфа-2-макроглобулин (α -2М), так как он является белком, saniрующим биологические среды организма [4, 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния трипсиноподобных протеиназ, в том числе ККС плазмы крови, у больных лимфомой селезенки до операции и в раннем послеоперационном периоде после экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазме, обогащенной лейкоцитами.

Материалы и методы

Исследована плазма крови больных с диагнозом лимфома селезенки, поступивших в отделение urgent-

ной онкологии ФГУ «РНИОИ» Минздравсоцразвития России и подвергнутых операции по удалению опухоли. Основная группа пациентов подвергалась специальному лечению – экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазме, обогащенной лейкоцитами. Лечение заключалось в следующем: за сутки до оперативного вмешательства проводили процедуру лейкоцитофереза с использованием плазмосепаратора крови «Hemonetics» (США), во время которой в стерильную емкость отбирали 150 мл аутоплазмы, обогащенной лейкоцитами, соединяли её с гордоксом в дозе 200 тыс. ЕД и 2 мл 1%-го раствора АТФ, смесь инкубировали при температуре 24–25 °С в течение 45 мин, после чего реинфузировали внутривенно, капельно. Процедуру проводили предоперационно, а также в первые сутки послеоперационного периода. При увеличении показателей ферментативной активности вторные введения осуществлялись на 3 и 7-е сут. Исследования осуществляли в динамике раннего послеоперационного периода: в 1 и 7-е сут, результаты сопоставляли с фоновыми (до операции) и данными, полученными при изучении плазмы крови контрольной группы больных с традиционным лечением (т.е. внутривенным введением гордокса по стандартной методике). В цитратной плазме крови проведено определение общей активности трипсиноподобных протеиназ (ОАТП), активности трипсиновых протеиназ без учета калликреина (АТП) и компонентов ККС: активности калликреина (К), содержания прекалликреина (ПК), активности кининразрушающего фермента – карбоксипептидазы N (КОПН) [8]. Активность универсального ингибитора протеолиза α -2М исследовалась унифицированным методом В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной [9].

Все результаты сравнивали с данными, полученными при исследовании плазмы крови 22 практически

здоровых доноров. Достоверность различий между количественными показателями оценивали с использованием t-критерия Стьюдента [10].

Результаты и их обсуждение

Обследование больных до операции (фон) показало значительные изменения практически всех изучаемых показателей в плазме крови по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1). Активность ОАТП и АТП в плазме крови обеих групп была выше, чем у

доноров, в среднем в 2 раза, активность К была повышена в контроле в 2,8 раза и в основной группе – в 2,6, наблюдалось практически одинаковое снижение содержания ПК – в 2,1 и 2 раза соответственно. Активность КОПН и α -2М в плазме крови больных контрольной группы снижена одинаково: в 2,1 раза, а у больных основной группы – в 2,5 и 2,6 раза соответственно. Наши результаты согласуются с данными об общей активации протеолиза и снижении ингибиторной активности при неопластическом процессе, полученными ранее в эксперименте и клинике [6, 7, 11].

Таблица 1

Трипсиноподобные протеиназы, компоненты ККС и α -2М в плазме крови больных после спленэктомии и внутривенного введения аутоплазмы, обогащенной лейкоцитами и инкубированной с гордоксом

Показатель	Здоровые доноры	До операции		1-е сут		7-е сут	
		Контрольная группа (фон)	Основная группа (фон)	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа
АТП, мЭЕ/мл	292,0 $\pm$ 13,08	635,7 $\pm$ 25,43 ¹	545,0 $\pm$ 21,63 ¹	695,3 $\pm$ 31,15 ¹	434,8 $\pm$ 19,48 ^{1,2,3}	528,4 $\pm$ 23,67 ^{1,2}	318,0 $\pm$ 14,26 ^{2,3}
ОАТП, мЭЕ/мл	353,4 $\pm$ 17,62	759,0 $\pm$ 37,94 ¹	660,0 $\pm$ 25,67 ¹	802,0 $\pm$ 35,93 ¹	560,3 $\pm$ 25,10 ^{1,2,3}	612,0 $\pm$ 27,43 ^{1,2}	401,0 $\pm$ 17,98 ^{2,3}
К, мед/мл	47,79 $\pm$ 3,41	133,3 $\pm$ 6,26 ¹	125,7 $\pm$ 5,94 ¹	106,7 $\pm$ 5,01 ^{1,2}	125,4 $\pm$ 5,89 ^{1,3}	83,63 $\pm$ 4,92 ^{1,2}	113,5 $\pm$ 5,31 ^{1,3}
ПК, мед/мл	352,0 $\pm$ 14,41	168,5 $\pm$ 7,54 ¹	181,0 $\pm$ 8,11 ¹	140,6 $\pm$ 6,32 ^{1,2}	239,6 $\pm$ 10,37 ^{1,2,3}	127,3 $\pm$ 5,74 ^{1,2}	245,6 $\pm$ 11,37 ^{1,2,3}
КОПН, мкМ/мл	0,806 $\pm$ 0,01	0,376 $\pm$ 0,02 ¹	0,327 $\pm$ 0,02 ¹	0,373 $\pm$ 0,03 ¹	0,411 $\pm$ 0,03 ^{1,2}	0,432 $\pm$ 0,03 ¹	0,405 $\pm$ 0,03 ^{1,2}
α -2М, ИЕ/мл	4,232 $\pm$ 0,12	2,020 $\pm$ 0,09 ¹	1,642 $\pm$ 0,13 ¹	1,938 $\pm$ 0,09 ¹	2,188 $\pm$ 0,09 ^{1,2}	2,048 $\pm$ 0,11 ¹	2,869 $\pm$ 0,12 ^{1,2,3}

¹ – изменения достоверны по сравнению с донорами ($p < 0,01$); ² – показатель достоверно отличается от такового до операции ($p < 0,01$); ³ – различия достоверны по отношению к контрольной группе ($p < 0,01$).

Различия между изучаемыми показателями крови больных основной и контрольной группами были обнаружены уже в первые сутки послеоперационного (п/о) периода. В плазме крови пациентов основной группы наблюдалось достоверное снижение ОАТП и АТП (табл. 1). Различия по отношению к контролю у больных после спленэктомии составили 43,1 и 60 % соответственно, в пользу контрольной группы. Изменения кининообразующего звена: стабильная активность К и повышение содержания ПК на 32,4 % в плазме крови больных основной группы и, наоборот, понижение обоих показателей на 25 и 20 % у пациентов контрольной группы, что свидетельствовало об их истощении. Различия между указанными группами составили 17,5 и 70,4 % соответственно в пользу основной группы. Активность КОПН увеличилась в плазме крови основной группы на 25,7 % по сравнению с предоперационным периодом (при отсутствии изменений у пациентов контрольной группы). Активность универсального ингибитора α -2М увеличилась только в плазме крови больных основной группы на 33,3 % по отношению к фону (табл. 1). Следует отметить, что α -2М является не только полифункциональным белком, способным связывать широкий спектр цитокинов и протеиназ, но и эволюционно неизменным звеном врожденной иммунной системы [5]. В связи с этим снижение его активности, зарегистрированное нами в плазме крови при фоновом обследовании больных, может свидетельствовать не только о нарушении протеиназо-ингибиторного баланса, но и об угнетении защитных способностей организма. Применение экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазме, обогащенной лейкоцитами, способствовало достоверному повышению активно-

сти α -2М плазмы крови уже в 1-е сут у пациентов основной группы. Изменения трипсиноподобных протеиназ, показателей состояния ККС и универсального ингибитора в крови больных основной группы в первые сутки п/о периода могли быть связаны только с воздействием проводимого специального лечения, поскольку до операции различий между группами не наблюдалось. Снижение активности трипсиноподобных протеиназ и повышение активности α -2М в плазме крови больных основной группы, наблюдаемые уже в первые сутки п/о периода, были направлены на восстановление протеиназо-ингибиторного равновесия и могли свидетельствовать о благоприятном влиянии экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазму, обогащенную лейкоцитами, на состояние органа-мишени – ПЖ – в этот срок.

Исследования плазмы крови на 7-е сут п/о периода показали сохранение и углубление различий между основной и контрольной группами. ОАТП и АТП достоверно снижались в обеих группах (табл. 1), но указанная активность в плазме крови больных контрольной группы превышала таковую в основной группе на 52,6 и 66,2 % соответственно, что подтверждалось и более высоким коэффициентом ОАТП/К (табл. 2). Состояние кининообразующего (К и ПК) и кининразрушающего (КОПН) звеньев у больных обследованных групп в этот срок можно было бы называть стабильным, однако прослеживалась отчетливая тенденция к снижению ПК в контрольной группе ($p = 0,05$) по отношению к предыдущему сроку при уменьшении активности К на 27,6 %, что подтверждалось соответствующими коэффициентами (табл. 1, 2). Снижение количественных показателей звена ПК–К в плазме крови больных контрольной группы

расценивалось как истощение ККС, с ним было связано уменьшение коэффициентов К/КОПН и К/ α -2М, и это считалось неблагоприятным признаком. Активность α -2М в плазме крови больных основной группы при сравнении с предыдущим сроком достоверно увеличивалась на 31,1 %, что было на 40,1 % выше, чем в контрольной группе. Рост активности универсального ингибитора протеолиза в плазме крови в раннем по-

слеоперационном периоде мог способствовать ограничению активности калликреина и остальных трипсиноподобных протеиназ, что расценивалось как благоприятный признак, поскольку согласовывалось с клинической картиной. Эти результаты могут служить весомым подтверждением эффективности экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазме, обогащенной лейкоцитами.

Таблица 2

Коэффициенты баланса трипсиноподобных протеиназ, компонентов ККС и α -2М в плазме крови больных после спленэктомии и внутривенного введения аутоплазмы, обогащенной лейкоцитами и инкубированной с гордоксом

Взаимосвязь показателей	Здоровые доноры	До операции		1-е сут		7-е сут	
		Контрольная группа (фон)	Основная группа (фон)	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа
ОАТП/К	7,4±0,32	6,1±0,25 ¹	5,9±0,26 ¹	8,9±0,40 ^{1,2}	5,2±0,23 ^{1,3}	6,3±0,49 ²	3,8±0,17 ^{1,2,3}
ПК/К	7,4±0,41	1,3±0,07 ¹	1,4±0,08 ¹	1,4±0,07 ¹	2,02±0,11 ^{1,2,3}	1,5±0,08 ¹	2,4±0,15 ^{1,3}
К/КОПН	59,3±4,95	408±22,64 ¹	437±26,41 ¹	315±18,42 ^{1,2}	378±21,51 ^{1,2} (p<0,05), ³	194±16,27 ^{1,2}	324±17,56 ^{1,2,3}
К/ α -2М	11,3±0,75	76,7±6,21 ¹	76,8±5,12 ¹	64,4±4,29 ^{1,2}	56,2±3,74 ^{1,2}	40,8±2,91 ^{1,2}	44,2±2,76 ^{1,2}
ОАТП/ α -2М	83,5±6,71	376±18,8 ¹	402±19,1 ¹	414±19,7 ¹	256±13,4 ^{1,2,3}	299±15,7 ^{1,2}	140±7,8 ^{1,2,3}

¹ – изменения достоверны по сравнению с донорами (p<0,01); ² – показатель достоверно отличается от такового до операции (p<0,01); ³ – различия достоверны по отношению к контрольной группе (p<0,01).

В настоящее время контактная система активации (включающая ККС) рассматривается как триггерный механизм, запускающий активацию всех пяти протеолитических систем плазмы крови: свертывания, фибринолиза, комплемента, а также калликреин-кининовую (реципрокно) и ренин-ангиотензиновую, кооперативное действие которых обеспечивает процессы адаптации и защиты организма [2, 3]. У больных с фоновой готовностью ПЖ к патологическому процессу уже повышена активность кининовой системы крови [1], а в наших исследованиях – вплоть до её истощения (контрольная группа) с пониженной активностью α -2М, что снижает порог запуска патогенетических механизмов развития ОПН. В подобных случаях достаточно воздействия даже невысокой интенсивности для поворота процесса в неблагоприятном направлении. Согласно теории самопереваривания, протеолитические ферменты ПЖ активируются в протоках самой железы. Активные панкреатические ферменты, пептиды, продукты протеолиза, являясь первичными факторами агрессии, вызывают ферментную токсемию, так как действуют не только местно, но и из-за затрудненного оттока выходят за пределы паренхимы железы – в окружающие железу ткани, полость брюшины, печень, циркулирующую кровь [1, 12, 13]. Сообщается, что не только трипсиноподобные ферменты, но и большинство других при панкреатитах активируются в присутствии трипсина [1]. В качестве «противоядия» патологической активации ККС А.А. Коротковым и соавт. [14] применялся ингибитор ККС (контрикал), подавляющий активацию ККС в острой стадии инфаркта миокарда. На фоне введения контрикала наблюдалось улучшение клинической картины, однако из приведенных данных следует, что восстановление коронарного кровотока не гарантирует благоприятного исхода заболевания. При спленэктомиях и возможном интраоперационном травмировании ПЖ, возникновении ишемии и некроза процесс во многом зависит от пришед-

ших клеток – макрофагов и лейкоцитов. Воспалительная реакция включает фагоцитоз и высокую активность гидролитических ферментов, в том числе трипсинового типа, что наблюдалось в проведенном исследовании (табл. 1) и благодаря чему облегчается элиминация шлаков [2]. Это соответственно должно вести к повышению скорости деградации белков и в конечном итоге активации рефлекторных путей репарации, заживлению и торможению провоспалительных сигнальных путей. Однако установленное фоновое глубокое нарушение протеиназо-ингибиторного баланса, патологическая активация ККС в крови у всех пациентов (табл. 2) не способствовали положительной направленности метаболических процессов раннего послеоперационного периода. Одновременная активация трипсина, ККС и связанных с ней систем при недостаточном ингибиторном контроле в микроциркуляторном русле ПЖ могла приводить к изменению реологических свойств крови, углублению локальных нарушений метаболизма в паренхиме железы, увеличению отека, развитию диссеминированных тромбозов и гипоксии. Установленная нами резко сниженная фоновая и послеоперационная активность эндогенного универсального ингибитора протеолиза (α -2М) в плазме крови контрольной группы не контролировала синтез и секрецию ферментов ПЖ, в связи с чем начавшийся панкреатический процесс прогрессировал. Информацию о протеиназо-ингибиторном балансе более наглядно демонстрирует динамика коэффициента ОАТП/ α -2М, приведенная в табл. 2. Из таблицы видно, что указанный коэффициент в контрольной группе был на 61,7 % выше, чем в основной, уже в первые сутки после операции. В дальнейшем на 7-е сут это различие усиливалось, и разница составляла уже 2,1 раза в пользу контрольной группы. Из 24 пациентов контрольной группы ОПН развился у 6, причем у одной больной лимфомой селезенки – в тяжелой форме, отчего пациентка скончалась на 4-е сут после спленэктомии.

По-видимому, существует прямая зависимость между длительной активацией протеолиза, истощением кининообразующего, кининразрушающего и ингибиторного звеньев важнейших систем регуляции и защиты организма и развитием у больных признаков ОПП в нашем исследовании, что согласуется с данными литературы [1, 13, 15]. Управляемое подавление или активация одного из этих путей с помощью экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазме, обогащенной лейкоцитами, может вести к различным полезным реакциям, опосредуемым изменением метаболической активности клеток.

Таким образом, способ экстракорпоральной фармакотерапии гордоксом на аутоплазме, обогащенной лейкоцитами, применялся с учетом значения панкреатических протеиназ в генезе ОПП, возможности естественной миграции лейкоцитов к органу-мишени и необходимости подавления активности ПЖ. Сопоставление постоперационной динамики изучаемых показателей и баланса взаимосвязанных компонентов с клинической картиной показало значительные улучшения количественных значений, коэффициентов их баланса (табл. 1, 2) и состояния больных в основной группе наблюдения.

Обобщая результаты проведенного исследования, можно утверждать, что у онкологических больных после спленэктомии естественная миграция лейкоцитов, инкубированных с гордоксом, к органу-мишени способна положительно влиять на сохранение равновесия в активированной кининовой системе и её баланса с α -2М. Своевременная компенсация содержания прекалликреина, рост активности КОПН и α -2М, нормализация активности трипсиноподобных протеиназ под влиянием применяемого лечения могли способствовать сохранению, усилению и распространению защитных реакций, в которых участвуют все протеолитические системы крови [2, 3]. Восстановление протеиназо-ингибиторного равновесия обеспечивало развитие нормальных физиологических процессов защиты от развития ОПП, включающих возобновление и стабилизацию кровообращения в микроциркуляторном русле ПЖ и запуск эндогенных противовоспалительных регуляторных механизмов.

Выводы

1. В плазме крови всех обследованных пациентов высокая фоновая активность трипсиноподобных протеиназ не уравновешена достаточной активностью ингибитора α -2М.

2. Сохранение патологически изменённого баланса трипсиноподобных протеиназ и α -2М в раннем постоперационном периоде может сопровождаться развитием острого послеоперационного панкреатита.

3. Применяемый способ лечения мог способствовать увеличению способности как эндогенных ингибиторов, так и калликреина (при восстановлении баланса с прекалликреином), стимулировать капиллярное русло, улучшать ретроградный кровоток, уменьшать ишемию органа и предотвращать развитие необ-

ратимых изменений в поджелудочной железе путем снижения и стабилизации протеолитической активности в раннем постоперационном периоде.

Литература

1. Острый послеоперационный панкреатит / Ю.С. Полушин [и др.]. СПб., 2003. 160 с.
2. Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Неикова Е.А. Контактная система. Новые представления о механизмах активации и биорегулирующих функциях: обзор // Биохимия. 2002. Т. 67, вып. 1. С. 16–29.
3. Yousel G.M., Diamandis E.P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease // *Endocr. Rev.* 2001. Vol. 22. P. 184 – 204.
4. Взаимодействие ингибиторов протеиназ плазмы крови с иммобилизованным на диальдегидцеллюлозе протеолитическим комплексом из гепатопанкреаса краба / А.А. Белов [и др.] // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2003. Т. 44, № 1. С. 16–19.
5. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль белков семейства макроглобулинов в регуляции воспалительных реакций // *Биомедицинская химия.* 2006. Т. 52, № 3. С. 229 – 238.
6. Total proteolytic activity and levels of the main proteinases inhibitors in blood plasma of mice bearing Lewis lung carcinoma upon development of resistance to cisplatin / V.F. Chekhun [et al.] // *Exp. Oncol.* 2005. Vol. 27, № 4. P. 286–289.
7. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion / K. Wolf // *Nature Cell Biol.* 2007. Vol. 9, № 8. P. 893–904.
8. Пасхина Т.С., Кринская А.В. Упрощенный метод определения калликреиногена и калликреина в сыворотке (плазме) крови человека в норме и при некоторых патологических состояниях // *Вопросы мед. химии.* 1974. Т. 20, вып. 6. С. 660–663.
9. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека // *Вопросы мед. химии.* 1979. Т. 25, вып. 4. С. 494–500.
10. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. М., 1990. 127 с.
11. Сидоренко Ю.С., Мусиенко Н.В., Франциянц Е.М. Некоторые показатели активности протеолитической системы в ткани злокачественной опухоли при различных локализациях рака // *Вестн. Южн. науч. центра.* 2008. Т. 4, № 2. С. 93 – 98.
12. Костюченко А.Л., Филин В.И. Неотложная панкреатология. СПб., 2000. 480 с.
13. Early diagnosis and prediction of severity in acute pancreatitis using the urine trypsinogen-2 dipstick test: a prospective study / E. Kamer [et al.] // *World J. Gastroenterol.* 2007. Vol. 14. P. 6208–6212.
14. Ингибиторы кининовой системы – единственный и эффективный способ предотвращения реперфузионных повреждений при тромбозе в острой стадии инфаркта миокарда. / А.А. Коротков [и др.]. URL: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=37691> (дата обращения: 20.03.11).
15. Функциональная гетерогенность поврежденного гастродуоденального комплекса / О.А. Шевелев [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2007. Т. 143, вып. 2. С. 149–151.