

УДК: 616.12-089.5:612.398.3

НЕЙТРОФИЛЬНАЯ ЭЛАСТАЗА И ЕЕ ИНГИБИТОРЫ ПРИ ОПЕРАЦИЯХ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Л.Г. Князькова, Т.А. Могутнова, И.С. Зыков, С.Г. Сидельников, В.В. Ломиворотов

ФГУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологий»

cpsc@meshalkinclinic.ru

Ключевые слова: нейтрофильная эластаза, протеазные ингибиторы, малоновый диальдегид, перекисное окисление липидов.

Неизбежной реакцией на хирургическую травму и искусственное кровообращение (ИК) при операциях на открытом сердце является повышение активности лейкоцитов и их протеолитических энзимов, ведущее к развитию воспалительной реакции. Согласованное действие протеаз и их ингибиторов – одна из форм поддержания гомеостаза в организме, а сложная и многокомпонентная последовательность реакций при этом рассматривается как универсальный неспецифический ответ на повреждение.

При кардиохирургических вмешательствах анестезиологическое обеспечение направлено на сохранение баланса протеолитических и антипротеазных механизмов, нарушение которого может стать пусковым моментом в развитии послеоперационной дисфункции миокарда, нарушений оксигенирующей функции легких, полиорганной недостаточности.

В связи с этим представлялось целесообразным провести оценку протеазно-ингибиторного баланса организма у больных ИБС, оперированных в условиях ИК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 16 больных ИБС в возрасте от 47 до 62 лет, оперированных в условиях нормотермического ИК, длительность которого составила $66,1 \pm 6,4$ мин, окклюзия аорты $41,7 \pm 5,6$ мин. Всем пациентам выполнялась операция аортокоронарного шунтирования (АКШ).

Вводная анестезия осуществлялась с использованием фентанила (4,0 мкг/кг), дормикума (0,06 мг/кг). После введения ардуана в дозе 0,1 мг/кг выполнялась интубация трахеи и перевод больного на искусственную вентиляцию легких в режиме умеренной гипервентиляции (ра CO_2 артерии 30–35 мм рт. ст.). Анестезия до и после перфузии поддерживалась подачей

галогенсодержащего анестетика в дыхательный контур (севоран 1,5–2,0 об%). Во время перфузии вводили дормикум (0,05–1,0 мг/(кг · ч)) и фентанил (5 мкг/(кг · ч)).

В периферической крови на этапах АКШ: перед операцией, через 30 и 120 мин после окончания ИК, а также в 1-е и 3-и сутки после кардиохирургического вмешательства – определяли уровень нейтрофильной эластазы, ее основного ингибитора – альфа1-антитрипсина (АТ), а также альфа2-макроглобулина (МГ), малонового диальдегида (МДА) и активность каталазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявлено, что у больных ИБС перед операцией АКШ уровень нейтрофильной эластазы был выше контрольных значений, зарегистрированных в норме у здоровых лиц (<35 нг/мл). Через 30 мин после окончания ИК отмечалось значительное возрастание ее уровня (табл. 1), спустя 2 ч после окончания ИК содержание эластазы несколько снизилось, но продолжало оставаться практически в 3,7 раза выше исходного ($p < 0,001$). В послеоперационном периоде отмечалось дальнейшее падение уровня этого фермента, к 3-м суткам достоверные различия по сравнению с исходным уровнем сохранялись.

Динамика содержания ингибиторов эластазы АТ и МГ в (табл. 1), свидетельствует о том, что их уровень достоверно снижался уже перед началом перфузии по сравнению с дооперационным. Наиболее низкие значения этих белков зарегистрированы через 30 мин после окончания ИК.

Через 2 ч после окончания перфузии отмечалось возрастание уровня протеазных ингибиторов. К исходу первых-третьих суток после операции уровень МГ, несмотря на возрастание, не достигал исходного уровня и продолжал ос-

таваться ниже дооперационного. В то же время содержание АТ в 1-е–3-и сутки после операции статистически достоверно превышало дооперационный уровень.

Поскольку АТ является основным ингибитором нейтрофильной эластазы, определение отношения его уровня в плазме к уровню эластазы мы использовали для оценки протеазно-ингибиторного баланса. Как оказалось, на этапах операции величина этого коэффициента к моменту окончания операции (30 и 120 мин после ИК) значительно снижалась, практически в 10 раз по сравнению с исходным (табл. 1). В 1-е сутки после операции, несмотря на достоверное снижение уровня эластазы и существенное возрастание уровня ее ингибитора – альфа-1антитрипсина, протеазно-ингибиторный коэффициент оставался сниженным по сравнению с исходным уровнем. Это свидетельствовало о преобладании протеолитической активности над антипротеазной.

К 3-м суткам после операции, несмотря на сохраняющуюся достоверно высокую концентрацию нейтрофильной эластазы в крови по сравнению с исходной, значительное возрастание уровня альфа1-антитрипсина способствовало увеличению протеазно-ингибиторного коэффициента, при этом его величина достоверно не отличалась от исходной, что указывало на восстановление баланса в системе и компенсаторных возможностей больных на 3-и–5-е сутки после операции.

Необходимо отметить, что активированные нейтрофилы, запуская физиологическую реакцию воспаления, усиленно синтезируют и секретуют в кровь активные формы кислорода (АФК), необходимые для завершенности фаго-

цитарной реакции, инициируя при этом процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Как показали результаты наших исследований, содержание перекисных метаболитов, в частности малонового диальдегида, характеризовалось достоверным увеличением концентрации именно в период наиболее высокого уровня нейтрофильной эластазы и сниженного уровня ее ингибиторов (табл. 2). При этом активность антиокислительного фермента – каталазы – существенно возрастала, причем обращает на себя внимание тот факт, что при увеличении концентрации МДА в 1,3 раза отмечалось увеличение активности каталазы в 2,3 раза.

Такое возрастание антиперекисной активности способствовало тому, что в 1-е–3-и сутки после операции активность процессов ПОЛ снижалась, о чем свидетельствовало отсутствие достоверных различий по уровню МДА по сравнению с дооперационным.

ОБСУЖДЕНИЕ

При кардиохирургических вмешательствах в условиях ИК в межклеточной среде и крови происходит накопление белков, которые, выйдя из клеток при их гибели, теряют свое функциональное значение и становятся «эндогенными патогенами», или флогогенами. Физиологическая роль протеолиза после хирургической травмы является защитной и обусловлена необходимостью деградации новообразованных полипептидных цепей с неправильной афизиологичной структурой. Известно, что удаление частиц меньше 60 кД происходит через гломерулярную мембрану нефрона, не подвергаясь каким-либо

Таблица 1

Уровень эластазы и ее ингибиторов у больных ИБС на этапах реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения

Этап	Эластаза, нг/мл	МГ, мг/дл	АТ, мг/дл	Протеазно-ингибиторный коэффициент
Исходный до операции	80,2±12,0	130,7±8,8	143,8±9,8	2,12±0,42
Перед началом перфузии	61,9±5,9	101,5±7,8*	108,0±4,6***	1,91±0,18
Через 30 мин после окончания перфузии	418,6±54,6***	77,5±4,7***	86,0±3,8***	0,29±0,06***
Через 120 мин после окончания перфузии	298,7±26,2***	97,2±7,7**	112,1±4,6**	0,41±0,036***
1-е сутки после операции	162,4±18,7***	105,0±7,6*	172,9±5,2**	1,21±0,13*
3-и сутки после операции	120,7±10,2*	111,7±14,0***	273,7±7,2***	2,53±0,31

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – различия достоверны по сравнению с исходным этапом

Таблица 2

Показатели процессов перекисного окисления липидов у больных ИБС на этапах реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения

Этап	Активность каталазы, мкат/л	Малоновый диальдегид, мкмоль/л
Исходный до операции	76,6±8,0	5,54±0,33
Перед началом перфузии	78,5±4,5	5,13±0,22
Через 30 мин после окончания перфузии	156,3±14,4***	7,69±0,52**
Через 120 мин после окончания перфузии	174,4±13,9***	7,74±0,46**
1-е сутки после операции	114,5±6,22***	6,29±0,27
3-и сутки после операции	102,0±5,13**	6,39±0,35

*** p < 0,01; *** p < 0,001 – различия достоверны по сравнению с исходным этапом*

превращениям, с последующей экскрецией с мочой, в то время как большие патогены (больше 60 кД) могут быть удалены только путем фагоцитоза функциональными фагоцитами, т. е. путем воспаления [7].

Ранее было показано, что операции на сердце сопровождаются повышением активности трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ [6].

Поскольку степень активации протеаз зависит от полноценности функционирования ингибиторного звена протеолиза, то повышение уровня нейтрофильной эластазы, регистрируемое нами на фоне снижения ее ингибитора через 30 мин после окончания ИК, следует расценивать как истощение ингибиторного потенциала оперированных больных.

Эластаза является основной протеиназой полиморфноядерных лейкоцитов и освобождается из первичных гранул этих клеток в процессе их дегрануляции, она имеет нейтральный оптимум pH и оказывает наиболее разрушительное действие на биологические структуры. Как правило, уровень эластазы в крови отражает степень активации нейтрофилов, и ее содержание возрастает при травме, сепсисе, синдроме системного воспалительного ответа [10].

Альфа1-антитрипсин – ингибитор множества протеаз, но основной мишенью является эластаза нейтрофилов, и основная физиологическая роль этого белка состоит в защите нижних отделов дыхательных путей от протеолитического повреждения лейкоцитарной эластазой.

Чрезмерная активность протеолитических ферментов нейтрофилов на фоне недостаточного потенциала ингибиторов протеиназ может приводить к разрушению тонких структур респираторного отдела легких [10, 13], вызывать

истощение сурфактанта в просвете альвеол, что является одним из ключевых звеньев в патогенезе острого повреждения легких [16]. Протеазы также, как и активные формы кислорода при свободнорадикальном окислении относятся к числу факторов деструкции. Если АФК нацелены на клеточные мембраны, то такие протеазы, как эластаза нейтрофилов, разрушают внеклеточный матрикс легочной ткани и компоненты сосудистой стенки.

Развитию тяжелых состояний и хронизации патологического процесса в легких [9, 10] может способствовать неконтролируемый протеолиз, развивающийся в результате модификации молекулы АТ химическими и биологическими окислителями или протеазами различного происхождения и связанный с потерей ингибиторного потенциала.

Анализируя появление в русле крови высоких концентраций нейтрофильной эластазы на фоне сниженных значений ее основного ингибитора через 30 мин после окончания ИК, следует отметить также и то, что в этот период повышение активности свободнорадикального окисления, о чем свидетельствует достоверное возрастание концентрации МДА, может быть одним из факторов модификации АТ реактивными метаболитами кислорода. В этих условиях его действие на лейкоцитарную эластазу становится малоэффективным, а деструктивные реакции протеаз активизируются, что в свою очередь вносит дополнительный вклад в развитие дисбаланса в системе протеолиз-антипротеолиз в сторону гиперпротеолиза.

Роль активации свободнорадикального окисления в модификации структуры белков в настоящее время не вызывает сомнений, и кро-

ме того отмечается резкое повышение чувствительности таких белков к протеолитической деградации [2], показанной в том числе и для альфа1-антитрипсина [18]. Тесты на содержание продуктов ПОЛ являются также и тестами воспаления [3].

Было показано, что клинически наиболее часто активация протеолиза проявляется нарушениями в свертывающей системе крови (гипокоагуляция) [17]. В условиях сниженной концентрации ингибитора эластазы и модифицирующего влияния на него активных форм кислорода защитная роль АТ, участвующего в подавлении активности тромбина и других протеаз системы коагуляции, ограничивается, и это может способствовать гипокоагуляционным сдвигам.

Кроме того, следует отметить также, что активация протеолиза может приводить к повреждению плазменных белков свертывающей и фибринолитической систем, а также белков так называемой контактной фазы активации гемостаза, куда входят высокомолекулярный кининоген, прекаликrein, факторы XI, XII, особенно в условиях дефицита ингибиторов протеиназ [15]. Деструктирующее влияние лейкоцитарной эластазы на высокомолекулярный кининоген, контролирующей адгезию и активность тромбоцитов, показано *in vitro* в плазме крови человека в присутствии в высокой концентрации АТ. Установлено, что очищенный препарат эластазы, выделенной из лейкоцитарной массы в количествах, соизмеримых с количеством эластазы, освобождаемой при дегрануляции полиморфноядерных лейкоцитов, сохранял свою способность расщеплять высокомолекулярный кининоген в присутствии АТ в эквимлярной и даже в 2, 4 и 5 раз превышающей ее концентрации, что свидетельствует о патогенетической роли лейкоцитарной эластазы в развитии тромбо-геморрагических осложнений при воспалительных процессах [1].

В отличие от основного ингибитора нейтрофильной эластазы – альфа1-антитрипсина, альфа2-макроглобулин не имеет какой-либо специализации и поэтому взаимодействует с большинством протеаз независимо от их происхождения. Функцией этого белка также является связывание и ингибирование протеолитических ферментов, освобождающихся из дегранулировавших лейкоцитов и других источников. С помощью уникального механизма захвата в карман МГ лишь ограничивает функции протеаз, при этом их активный центр не модифицируется, и в таком плененном состоянии

они сохраняют активность по отношению к низкомолекулярным субстратам [5]. Комплексы этого белка с активными протеазами обладают иммуномодулирующими свойствами и влияют на функциональную активность лимфо- и фагоцитов [4]. Кроме того альфа2-макроглобулин, являясь универсальным модулятором цитокинового ответа, связывает цитокины, к числу которых относятся ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО, обладающие наиболее повреждающим действием на миокард [12, 14]. Снижение уровня МГ в крови, обнаруженное на этапах кардиохирургического вмешательства и в раннем послеоперационном периоде, вносит вклад в ослабление протеазно-ингибиторного потенциала оперируемых больных.

В ряде случаев у пациентов со значительным снижением протеазно-ингибиторного коэффициента к концу операции мы регистрировали повторное возрастание в крови уровня нейтрофильной эластазы к 3-м суткам послеоперационного периода, что сопровождалось повышением уровня маркеров воспалительного ответа: в частности, лейкоцитозом, увеличением скорости оседания эритроцитов, увеличением уровня С-реактивного белка, отмечалось повышение температуры тела, что свидетельствовало об усилении воспалительной реакции. Следовательно, нарушение баланса в системе протеолиз-антипротеолиз на этапах операции может быть одним из прогностических факторов риска развития осложнений воспалительного характера в послеоперационном периоде.

Поскольку резко выраженное повышение активности протеолиза может стать основой для развития полиорганной и/или дыхательной недостаточности, а также тромбо-геморрагического синдрома, в связи с этим предпринимаются многочисленные меры профилактики осложнений, включающие такие технические методы, как использование лейкоцитарных фильтров на артериальной магистрали ИК, систем со специальным гепариновым антикоагулянтным покрытием, модифицированной ультрафильтрации, в то же время в литературе нет однозначных данных по эффективности фармакологических методов профилактики осложнений системной воспалительной реакции [8]. В связи с этим, поиск фармакологических препаратов для коррекции неспецифической воспалительной реакции, способных ингибировать гиперпротеолиз и профилактировать развитие послеоперационной дисфункции миокарда, нарушений оксигенирующей функции легких, полиорганной недостаточности остается актуаль-

ной проблемой анестезиологического обеспечения кардиохирургических вмешательств в условиях ИК.

ВЫВОДЫ

1. Операции реваскуляризации миокарда в условиях ИК сопровождаются значительным снижением содержания антипротеазных регуляторных белков на фоне возрастания уровня протеолитического фермента нейтрофилов – эластазы и активизации процессов перекисного окисления липидов.
2. Наиболее выраженное снижение протеазно-ингибиторного потенциала отмечалось через 30 мин после окончания перфузии с восстановлением баланса в системе протеолиз-антипротеолиз к 3-м суткам послеоперационного периода.
3. Исследование уровня протеаз и их баланса с ингибиторами необходимо для своевременного выявления дефицита ингибиторного потенциала и оценки риска развития осложнений в послеоперационном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Ругнес Э. и др. // *Вопр. мед. химии*. 2001. № 1. С. 55–70.
2. Дубинина Е.Б., Шугалей И.В. // *Успехи совр. биол.* 1993. Т. 113. Вып. 1. С. 71–81.
3. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. *Окислительный стресс*. МАИК. Наука/Интерпериодика. М., 2001.
4. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина М.Н. // *Иммунология*. 2004. № 5. С. 302–303.
5. Назаров П.Г. *Реактанты острой фазы воспаления*. СПб.: Наука. 2001. 423 с.
6. Партигулов С.А., Баженова Г.Е., Оглоблина О.Г. // *Анест. и реан.* 1989. № 5. С. 6–9.
7. Титов В.Н. // *Журн. Клин. лаб. диагностика*. 2004. № 5. С. 3–10.
8. Яворский А.Г., Трекова Н.А., Зюляева Т.П. и др. // *Грудная и сердечно-сосуд. хирургия* 2003. № 3. С. 53–57.
9. Ayad M.S., Knight K.R., Burdon J.G. et al. // *Respirologi*. 2003. V. 8 (2). P. 175–180.

10. Barnes P.J. // *Pharmacol. Res.* 2004. V. 56. P. 515–548.
11. Briegel J., Kellermann W., Forst H. et al. // *Clin. Investig.* 1994. V. 72. № 10. P. 782–787.
12. Deng M.C., Dasch B., Erren M et al. // *Ann. Thorac. Surg.* 1996. V. 62. P. 184–190.
13. Dhami R., Gilcs B., Xie K. et al. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000. V. 22 (2). P. 244–252.
14. Hennein H.A., Ebba H., Rodriques J.L. et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1994. V. 108. P. 626–635.
15. Jochum M., Machleidt W., Fritz H. // *In handbook of Mediators in Septic Shock*. Eds. E. Neugebauer and J.W. Holaday – CRC Press/ Boca Baton, London, Tokyo. 1993. P. 335–362.
16. Lewis J.F., Braskenbury A. // *Crit. Care Med.* 2003. V. 31. P. 324–328.
17. Royston D., Flemming J.S., Desai J.B. et al. // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1986. V. 91. № 5. P. 759–766.
18. Wasil M., Halliwell B., Hutchison D.C. S., Baum H. // *Biochem. J.* 1987. V. 243. P. 219–223.

NEUTROPHILIC ELASTASE AND ITS INHIBITORS WHEN PERFORMING MYOCARDIAL REVASCULARIZATION UNDER EXTRACORPOREAL CIRCULATION

L.G. Kniazkova, T.A. Mogutnova, I.S. Zykov,
S.G. Sidelnikov, V.V. Lomivorotov

Coronary artery bypass grafting was performed under extracorporeal circulation on 16 ischemic patients, with the protease-inhibitor balance being investigated by determining the level of neutrophilic elastase, alpha1-antitripsin, alpha2-macroglobulin and the indicators of lipid peroxidation (malonic dialdehyde and catalase activity) at different stages of the disease. It was found out that the development of the inflammatory response to surgical intervention and extracorporeal circulation was accompanied by a decrease in the protease-inhibitory potential in patients being operated against the background of a considerable increase in the level of neutrophilic elastase and activation of lipid peroxidation processes, with the proteolysis-antiproteolysis system rebalanced by the 3rd day of the postoperative period.

Key words: neutrophilic elastase, protease inhibitors, malonic dialdehyde, lipid peroxidation.