

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В КРОВИ ПРИ ОПЕРАЦИЯХ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Л.Г. Князькова, С.Г. Сидельников, Т.А. Могутнова, В.В. Ломиворотов, В.Н. Ломиворотов, А.В. Бобошко, А.М. Чернявский

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

Изучение динамики содержания нейронспецифических белков в периферической крови у 34 больных ИБС после операций коронарного шунтирования показало, что нарастание уровня S100b и HSE, выявленное непосредственно после окончания операций с использованием ИК, обусловлено одновременным воздействием гипоксии и окислительного стресса на проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Эти данные представляют клинический интерес в связи с проблемами применения фармакологических препаратов центрального действия, связанными с преодолением ГЭБ.

Контроль за состоянием различных структурных элементов нервной ткани, а также поиск чувствительных методов диагностики повреждения мозга при операциях на сердце в условиях искусственной перфузии по-прежнему остается актуальным. Несмотря на совершенствование методов обеспечения операций на открытом сердце в послеоперационном периоде, сохраняется высокий риск развития церебральных осложнений. Одним из патогенетических факторов структурно-функционального повреждения нервной ткани может быть неконтролируемая активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Среди биохимических маркеров повреждения мозга известно определение уровня нейронспецифических белков (НСБ) в периферической крови. Поскольку большинство этих белков является аутоантигенами, их попадание в кровоток может сопровождаться появлением аутоантител, которые, проникая из кровеносного русла в мозг, могут приводить к морфологическим изменениям в нервной ткани и деструктивным процессам в нейронах.

Цель работы – исследовать сывороточный уровень и динамику содержания в крови нейронспецифической енолазы (HSE) и белка S100b, а также оценить влияние гипоксии и оксидативного стресса на уровень биохимических маркеров повреждения мозговой ткани при операциях коронарного шунтирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 34 больных ишемической болезнью сердца в возрасте от 30 до 70 лет на

этапах аортокоронарного шунтирования (АКШ). В обследование включались только больные без неврологических нарушений. Длительность искусственного кровообращения (ИК) составила $81,1 \pm 3,6$ мин, время ишемии миокарда – $47,4 \pm 2,3$ мин, температурный уровень перфузии – $34,1 \pm 0,4$ °С. Определение уровня специфических белков нервной ткани – S100b и HSE, а также содержание лактата, пирувата, малонового диальдегида (МДА), церулоплазмина, активность каталазы в крови яремной вены осуществляли на этапах: перед началом перфузии, через 30 и 120 мин после ИК, а также в 1-е, 3-и и 10-е сутки после операции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание НСБ в периферической крови больных ИБС перед началом ИК не выходило за рамки диапазона нормальных значений. Через 30 мин после прекращения перфузии отмечалось достоверное повышение концентрации обоих белков (табл. 1), однако уже через 2 ч после операции их содержание снижалось, оставаясь выше исходного. В 1-е сутки после операции уровень HSE достоверно не отличался от дооперационного, в то время как содержание белка S100b было выше исходного ($p < 0,001$). Оба белка в крови на этом этапе регистрировались в диапазоне нормальных значений.

Как показали результаты исследования, наиболее высокие значения НСБ в крови регистрировались через 30 и 120 мин после окончания перфузии, свидетельствуя о повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Таблица 1

**Содержание нейронспецифических белков в крови
на этапах коронарного шунтирования в условиях ИК**

Этап	Нейронспецифическая енолаза, мкг/л	Белок S100b, мкг/л
Исходный перед ИК	7,55±0,86	0,065±0,007
После перфузии, мин		
30	15,9±1,53***	1,25±0,15***
120	12,4±0,86***	0,45±0,056***
Сутки после операции		
1-е	9,47±1,20	0,12±0,008***
3-и–5-е	12,4±2,41	0,085±0,009
10–12-е	8,75±1,29	0,050±0,005

*** $p < 0,001$ различия достоверны по сравнению с исходным этапом

Белок S100b, обнаруживаемый в астроцитах, глиальных и швановских клетках, наиболее лабильный и чувствительный к изменениям кальциевого гомеостаза, одним из первых реагирует на острую ишемию мозга. Его нарастание по срокам соответствует разворачиванию реакций глутамат-кальциевого каскада. Особый интерес к этому белку связан также с наличием у него ростовых и нейротрофических свойств, что позволяет предположить участие этого белка в процессах регенерации мозговой ткани после ишемических нарушений [1].

Быстрое нарастание концентрации НСЕ отмечали при нарушениях мозгового кровообращения, гипоксии, инсультах, травмах головного мозга и других патологических состояниях, сопровождающихся структурно-функциональными изменениями мозговой ткани [1, 6, 7]. Нейронспецифическая енолаза, являясь внутриклеточным ферментом, катализирует обратимую реакцию отщепления воды от 2-фосфо-D-глицерата с образованием макроэргического соединения фосфоенолпирувата. Некоторые авторы используют в качестве диагностически значимых изменений не концентрацию, а степень ее увеличения для обоих белков.

На сегодняшний день общепризнано, что ишемия является универсальным патогенным механизмом негативного влияния перфузии. Несмотря на поддержание удовлетворительной перфузии, избежать центральной ишемии обычно не удается. Поскольку сочетание высокого уровня метаболической активности и низкого запаса кислорода, а также небольшого резерва высокоэнергетических фосфатов и углеводов составляют основные особенности головного мозга, в механизмах повреждения такие

факторы, как лактацидоз и нарушение свободнорадикального окисления, считаются церебральными, в то время как к числу важнейших экстрацеребральных факторов относят системную интоксикацию, нарушения гемореологии и эндокринного баланса [3].

Исследование содержания лактата в крови, оттекающей от мозга при операциях АКШ, выявило аналогичную НСБ динамику. Как следует из табл. 2, наиболее высокие значения лактата в крови зарегистрированы через 30 и 120 мин после окончания перфузии. Повышение уровня пирувата, наряду с возрастанием концентрации лактата, может свидетельствовать о снижении активности ферментов цикла трикарбоновых кислот и активации анаэробного пути окисления глюкозы, компенсаторные механизмы которого включаются при развитии дефицита кислорода в клетках.

При длительном сохранении высокой концентрации лактата и других недоокисленных продуктов поддерживается высокая концентрация водородных ионов внутри клеток, что может приводить к повреждению митохондрий и, следовательно, затруднять восстановление биоэнергетики нервных клеток. Кроме того, на фоне накопления свободных водородных ионов и снижения содержания макроэргических соединений происходит существенное увеличение концентрации возбуждающих нейромедиаторов в межклеточном пространстве, активация образования свободных радикалов и ПОЛ, открытие ионселективных каналов, а также увеличение концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток мозга с последующей активацией кальцийзависимых протеаз, эндонуклеаз, липаз. Ранее нами было показано, что приме-

Таблица 2

**Содержание лактата и пирувата в крови яремной вены
на этапах коронарного шунтирования в условиях ИК**

Этап	Лактат, ммоль/л	Пируват, ммоль/л
Исходный перед ИК	1,45±0,065	0,26±0,010
После перфузии, мин		
30	3,87±0,25***	0,37±0,019***
120	3,67±0,28***	0,39±0,023***
Сутки после операции		
1-е	1,25±0,06	0,26±0,009
3-и–5-е	1,39±0,10	0,27±0,011
10–12-е	1,44±0,11	0,25±0,01

*** $p < 0,001$ различия достоверны по сравнению с исходным этапом

нение блокаторов кальция, прерывающих кальциевый поток в клетку, приводило к уменьшению продукции мозгом перекисных метаболитов [4].

Исследование содержания МДА выявило его значительное увеличение после окончания ИК, свидетельствующее об активации ПОЛ в реперфузионном периоде. Высокая активность перекисных процессов регистрировалась и через 2 ч после окончания ИК, несмотря на сохранение высокого уровня активности каталазы и тенденцию к увеличению содержания церулоплазмينا.

На этом этапе на фоне высоких значений концентрации МДА и лактата содержание НСБ в крови снижалось, однако исходные значения не достигались ($p < 0,01$).

Известно, что токсические продукты ПОЛ способны повреждать белковые молекулы в мембранах, ингибировать активность белков-ферментов, в том числе и цикла Кребса, и тем самым вносить вклад в нарастание лактатемии. Кроме того нарушение трансмембранного ионного обмена при активации процессов перекисидации может сопровождаться повышением уровня внутриклеточного кальция и приводить к запуску глутамат-кальциевого каскада повреждения нервной ткани.

К первым суткам после операции мы регистрировали снижение концентрации МДА до нормальных значений, однако к 3-м суткам после операции отмечалось увеличение содержания этого метаболита, связанное с другими механизмами активации ПОЛ в послеоперационном периоде и прежде всего с развитием воспалительного ответа на хирургическое вмешательство. Источником свободных радикалов и

увеличения активности перекисных процессов при развитии системного воспалительного ответа являются активированные нейтрофилы и макрофаги.

Исследование состояния некоторых звеньев системы антиоксидантной защиты выявило одновременно с возрастанием уровня МДА увеличение активности фермента каталазы, разрушающего перекись водорода, и снижение церулоплазмينا (табл. 3), обладающего антирадикальными свойствами в плазме, подобно супероксиддисмутазе в клетках, и выполняющего роль тушителя свободных радикалов.

Особенно важна известная роль церулоплазмينا как феррооксидазы, окисляющей Fe^{2+} (катализатора свободнорадикального окисления), в Fe^{3+} при искусственной перфузии, когда имеет место гемолиз. Снижение уровня церулоплазмينا в плазме может быть связано как с уменьшением его синтеза в печени, так и с ингибированием его активности под влиянием свободных радикалов, к которым чувствительна молекула церулоплазмينا.

В раннем послеоперационном периоде мы регистрировали снижение активности антиперекисного звена системы АОЗ и возрастание роли антирадикального звена в ингибировании процессов ПОЛ. Увеличение уровня церулоплазмينا к 3-м суткам после операции на фоне нормализации активности каталазы не сдерживало активности ПОЛ, о чем свидетельствовало накопление МДА.

Следует отметить, что усиление ПОЛ в послеоперационном периоде на фоне развития системного воспалительного ответа не сопровождалось нарастанием уровня НСБ в крови. По-видимому, для увеличения проницаемости

Таблица 3

**Динамика показателей перекисного окисления липидов
на этапах коронарного шунтирования в условиях ИК**

Этап	МДА, Мкмоль/л	Церулоплазмин, г/л	Активность каталазы, мкат/л
Исходный перед ИК	6,14±0,3	0,35±0,013	83,7±4,9
После перфузии, мин			
30	8,22±0,35***	0,22±0,09***	150,2±5,9***
120	8,17±0,32***	0,28±0,014***	142,9±5,8***
Сутки после операции			
1-е	5,87±0,20	0,32±0,014	109,6±3,8***
3-и-5-е	7,36±0,28**	0,41±0,015**	89,8±3,6
10-12-е	6,51±0,24	0,48±0,015***	87,3±5,4

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

ГЭБ необходим комплекс патофизиологических изменений, включающих развитие гипоксии, хирургического и оксидативного стресса, регистрируемых в реперфузионном периоде.

Повышенное содержание S100b после сердечной хирургии, по мнению S. Jensen [10], связано с влиянием ИК, причем пик концентрации приходится на окончание экстракорпоральной циркуляции и затем уменьшается в неосложненных случаях. У пациентов с нарушениями функций мозга, по данным этих авторов, выход белка продолжается и в послеоперационном периоде. Считается, что содержание S100b в крови более 0,5 мкг/л через 2 дня после хирургического вмешательства может указывать на наличие у пациента неврологических осложнений [11].

Следует подчеркнуть, что у обследованных нами больных подобный уровень S100b не регистрировался, признаки послеоперационных психоневрологических нарушений не отмечались. Достоверные корреляции между содержанием НСБ и длительностью перфузии выявлены как для НСЕ ($r = 0,43$), так и S100b ($r = 0,51$).

Повышение уровня НСБ в периферической крови непосредственно после перфузии может быть связано с кратковременным увеличением проницаемости ГЭБ под влиянием активации процессов гликолиза и свободнорадикального окисления в мозге. В пользу этой точки зрения свидетельствуют результаты применения антиоксидантов для блокирования перекисных процессов и уменьшения повреждений мозга, возникающих при ишемии-реперфузии [12]. Кроме того известно, что во время ИК повреждение астроглии может быть обусловлено воздействием воспалительных цитокинов, образую-

щихся во время перфузии [5]. По некоторым экспериментальным данным, нарушение функций ГЭБ коррелирует с уровнем образования фактора некроза опухоли и значительно уменьшается при введении антител к этому фактору [13].

Нельзя исключить и вклад свободнорадикального окисления в ингибирование синтеза вазодилаторных факторов, продуцируемых эндотелием, и в частности оксида азота, что может приводить к снижению мозгового кровотока и возникновению вазоспазма церебральных сосудов, ведущего к ограничению доступности для нейронов кислорода, а следовательно, и к усугублению биоэнергетических нарушений. Кроме того, к повышенной проницаемости нейронов и эндотелия сосудов может приводить снижение Ph внутри- и внеклеточной среды, оказывающее влияние на физико-химические свойства мембран.

Выявленное нами нарастание в крови уровня S100b и НСЕ после операций с использованием ИК связано с обратимым повышением проницаемости клеточных мембран мозговых барьеров. Это представляет интерес в связи с проблемами преодоления ГЭБ, поскольку большинство экзогенных соединений не способно проникать в головной мозг. Открытие ГЭБ создает условия для проникновения лекарственных средств из системного кровотока в мозг и может быть использовано для применения фармакологических препаратов центрального действия.

Одной из причин возрастания проницаемости сосудистых и клеточных мембран, по нашему мнению, может быть повышение активности свободнорадикальных процессов и накопление продуктов перекисаации липидов,

которые оказывают модифицирующее влияние на структурные элементы клеточных мембран и в том числе приводят к изменениям кальциевого гомеостаза.

Быстрая нормализация уровня НСБ и отсутствие послеоперационных неврологических осложнений могут быть связаны с защитной ролью белков теплового шока, синтез которых усиливается в ответ на многие виды стресса, в том числе и гипоксического. Обладая цитопротекторными свойствами, эти белки способны защищать липидные компоненты клеточных мембран от повреждающих эффектов, вызванных избытком кальция и детергентным действием жирных кислот [2, 8].

Таким образом, в изменение физико-химических свойств мембран и повышение проницаемости ГЭБ, следствием которого является выход НСБ в кровь, вносит вклад в развитие гипоксии, о чем свидетельствует лактатемия и пируватемия, а также усиление ПОЛ и ослабление антирадикальной защиты, на что указывает возрастание концентрации МДА и снижение уровня церулоплазмينا через 2 ч после перфузии.

Поскольку содержание НСБ к исходу первых суток после операции не превышает верхнего предела контрольных значений, это может свидетельствовать о непродолжительном повышении проницаемости ГЭБ. За это время, по-видимому, не успевают нарабатываться антитела к НСБ, и, следовательно, нет условий для их аутоагрессии, ведущей к вторичному повышению проницаемости ГЭБ и развитию деструктивных процессов в нейронах. Следует отметить, что снижение уровня этих белков в крови происходит в более ранние сроки после операции, чем нормализация активности процессов перекисного окисления липидов.

ВЫВОДЫ

1. Одной из причин повышения проницаемости ГЭБ и выхода в кровь специфических белков нервной ткани при операциях коронарного

шунтирования является одновременное воздействие гипоксии и окислительного стресса, наиболее выраженное в реперфузионном периоде. 2. Определение уровня НСБ в периферической крови, наряду с клиническими и нейрофизиологическими методами, позволяет осуществлять динамическое наблюдение за состоянием ГЭБ и является одним из критериев оценки полноценности восстановления функций мозга после операций в условиях ИК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. 325 с.
2. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. М.: Медицина, 2001.
3. Семченко В.В., Степанов С.С., Алексеева Т.В. Постаноксическая энцефалопатия. Омск, 1999. 448 с.
4. Шунькин А.В., Ломиворотов В.Н., Цветовская Г.А. и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2002. № 2. С. 23–27.
5. Ashart S., Bhattacharya K., Than J., Watterson K. // Eur. J. Cardiovasc. Surgery. 1999. V. 16, № 1. P. 32–37.
6. Barone F.C., Clerk R.K., Price W.J. et al. // Brain Res. 1993. V. 1. P. 71–82.
7. Bonhomme V., Hans P. // J. Neurosurg. Anesthesid. 1993. V. 2. P. 9–22.
8. Burdon R.H. The human heat-shock proteins: their induction, possible intracellular functions // Schlessinger M.F. (Eds) Heat shock: From bacteria to man, 1982. 435 p.
9. Georgiadis D., Berger A., Kowatschev E. et al. // J. Thoracic and Cardiovasc. Surgery. 2000. V. 119, № 1. P. 138–147.
10. Jensen S., Sandstrom K., Andreasson S., Nilsson K. // Pediatr. Anaesthesia. 2001. V.10, № 3.
11. Johnsson P. // J. Cardiothorac. Vase Anesth. 1996. V. 10, № 1. P. 120–126.
12. Lhen R., Wentiang D., Zhaonang R et al. // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1994. V. 108, № 1. P. 126–133.
13. Yang C. Y., Gong C., Qin Z. et al. // Brain Res. Mol. Brain Res. 1999. V. 69, № 1. P. 135–143.