

На правах рукописи



Гвалдин Дмитрий Юрьевич

**ПРОЦЕССЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В
РАЗРАБОТКЕ ИНДИКАТОРОВ ПАТОГЕНЕЗА ИШЕМИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНИ СЕРДЦА ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО
ШУНТИРОВАНИЯ**

Специальность 03.01.04. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж - 2017

Работа выполнена в Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванова
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Южный федеральный университет»

Научный руководитель Доктор биологических наук, профессор
Внуков Валерий Валентинович

Официальные оппоненты **Максименко Александр Васильевич**
Доктор биологических наук, профессор
Институт экспериментальной
кардиологии ФГУ
«Российский кардиологический научно-
производственный комплекс»,
лаборатория биохимической
инженерии, заведующий

Сафонова Ольга Анатольевна
Кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО «ВГУ»,
медико-биологический факультет,
кафедра медицинской биохимии
и микробиологии, доцент

Ведущая организация ФГБОУ «Российский национальный
исследовательский медицинский
университет им. Пирогова» (г. Москва)

Защита диссертации состоится «26» декабря 2017 года в 13.30 часов на засе-
дании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государст-
венном университете по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1,
ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воро-
нежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан

«24» ноября 2017 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Несмотря на достижения кардиологии и кардиохирургии в плане профилактики и лечения болезней сердца, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются глобальной медико-социальной проблемой. По данным за 2013 год общая заболеваемость ишемической болезнью сердца за 10 лет выросла на 13,25% (Богачевская С.А. и др., 2015). С каждым годом увеличивается объем кардиохирургических вмешательств. По сведениям, поступившим в Научный совет по сердечно-сосудистой хирургии РАМН, в Российской Федерации стабильно растет частота применения хирургических и эндоваскулярных методов лечения больных с ишемической болезнью сердца (в 2,2 раза за последние 5 лет) (Боке-рия, 2012). Наиболее эффективными принято считать методы прямой реваскуляризации миокарда (в частности аортокоронарное шунтирование, АКШ), поскольку они значительно снижают летальность и повышают качество жизни пациента (Гелис и др., 2007). Однако помимо положительного эффекта прямая реваскуляризация несет риск развития постоперационных осложнений, одним из которых является постперикардиотомный синдром (ПКТС).

ПКТС - это специфическая форма травматического перикардита, развивающаяся в рамках системной воспалительной реакции организма (СВО) (Chien N.-C., Shen T.-C. 2006; Игольникова Л.Н., Никулина Е.Г., 2012). Триггерными механизмами, запускающими СВО, являются воздействие хирургической травмы, контакт крови с оксигенатором и аппаратом искусственного кровообращения, ишемическое и реперфузионное повреждение кардиомиоцитов. В свою очередь, реперфузионные повреждения миокарда ассоциируются с интенсификацией свободнорадикального окисления (СРО) и сверхпродукцией провоспалительных цитокинов (Сидоров Р.В. и др., 2011; Гелис Л.Г. и др., 2007).

Необходимо отметить, что к настоящему моменту остаются не ясны многие патогенетические аспекты ПКТС, и что не менее важно - не до конца определен спектр возможных маркеров, способных предупредить развитие данного синдрома и таких жизнеопасных осложнений, как тампонада сердца.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось исследование роли окислительного стресса и воспаления в механизмах развития постперикардиотомного синдрома

у больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда, и оценка возможности использования отдельных компонентов прооксидантной, антиоксидантной систем и провоспалительных медиаторов в качестве биомаркеров и предикторов развития ПКТС.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить интенсивность свободнорадикального окисления и содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, шиффовы основания) в крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование.

2. Исследовать активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и глутатион-S-трансфераза), оксидазную активность церулоплазмينا и уровень восстановленного глутатиона и пероксиредоксина-1 в крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование.

3. Оценить состояние эритроцитарных мембран по уровню внеэритроцитарного гемоглобина и суммарной пероксидазной активности в плазме крови больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование.

4. Определить активность миелопероксидазы и арилэстеразную активность параоксоназы в плазме и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование.

5. Исследовать содержание стабильных метаболитов оксида азота нитритов/нитратов, асимметричного диметиларгинина и активность аргиназы в крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование.

6. Определить уровень провоспалительных цитокинов - интерлейкина-1 β , -6 и -8 в плазме и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование.

Научная новизна

Впервые проанализированы интенсивность СРО и изменение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при развитии ПКТС. Обнаружен дисбаланс в работе антиоксидантных ферментов в крови и перикардиальной жидкости больных, перенесших аортокоронарное шунтирование. Впервые показано снижение активности каталазы в эритроцитах, оксидазной активности це-

рулоплазмина (ЦП) в плазме и перикардиальной жидкости, активности глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах и уровня пероксиредоксина-1 (Prx-1) у пациентов с ПКТС. Установлена напряженность в работе тиолдисульфидной системы на ранних сроках развития ПКТС. Впервые показано увеличение активности аргиназы в эритроцитах и уровня асимметричного диметиларгинина (ADMA) в плазме крови после прямой реваскуляризации миокарда. Установлены глубокие изменения активности и уровня медиаторов эндотелиальной дисфункции. Впервые показана обратная корреляционная взаимосвязь между активностью аргиназы в эритроцитах и арилэстеразной активностью параоксоназы (PON) в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. Обнаружено ингибирование арилэстеразной активности PON в перикардиальной жидкости пациентов с ПКТС. Впервые показаны изменения активности МПО в плазме и перикардиальной жидкости при ПКТС. Впервые определена обратная корреляционная взаимосвязь между активностями МПО и PON в плазме крови пациентов с ПКТС. Доказано, что изменения активности аргиназы, МПО и арилэстеразной активности PON могут служить прогностическими маркерами развития ПКТС. Исследовано содержание провоспалительных цитокинов в перикардиальной жидкости больных ИБС в послеоперационный период. Впервые установлена прямая корреляционная взаимосвязь между концентрациями интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и Prx1 в плазме крови пациентов с ПКТС.

Практическая значимость

Исследование роли окислительного стресса и воспаления в развитии ПКТС после прямой реваскуляризации миокарда вносит определенный вклад в понимание патогенетических механизмов данного осложнения и позволяет определить мишени для превентивной терапии. Разработаны эффективные прогностические тесты для оценки риска развития ПКТС. В работе показано, что соотношение активности МПО и арилэстеразной активности PON в плазме и перикардиальной жидкости, а также соотношение активности аргиназы в эритроцитах и арилэстеразной активности PON в плазме крови могут служить предикторами развития исследуемого синдрома. Определены биомаркеры окислительного стресса и воспаления, которые позволяют оценить тяжесть протекания постоперационного периода у больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены в виде доклада на VI Международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015 г.), в виде тезисов на XIII, XIV, XV межвузовской биохимической научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2014, 2015, 2016 гг.), V Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины" (Ростов-на-Дону, 2014 г.), 8-й национальной научно-практической конференции с международным участием (Смоленск, 2014 г.), II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов (Нижний Новгород, 2015 г.), V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), а также на конкурсах инновационных стартап-проектов: УМНИК от Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, RussianStartupTour 2015 (Ростов-на-Дону, 3-4 февраля 2015 г.), Startup Tour 2016 (г. Таганрог, 17-18 марта 17-18 марта 2016 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе в изданиях ВАК - 5 статьи (из них в БД Scopus – 3 статьи). Получен патент РФ на изобретение - Сидоров Р.В., Милютин Н.П., Гвалдин Д.Ю., Щетко В.Н., Лихачев-Мищенко О.В., Внуков В.В. "Способ прогнозирования постперикардотомного синдрома у больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование" № 2619218 от 12 мая 2017 г. Оформлена патентная заявка - «Способ прогноза развития постперикардотомного синдрома у больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование» №2016129678 от 13.10.16.

На защиту выносятся следующие положения:

1. В крови и перикардальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование, отмечена интенсификация свободнорадикального окисления и накопление продуктов перекисного окисления липидов. Аортокоронарное шунтирование сопряжено с дестабилизацией эритроцитарных мембран и повышением суммарной пероксидазной активности и уровня внеэритроцитарного гемоглобина.

2. Проведение аортокоронарного шунтирования сопровождается дисбалансом в функционировании супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах, напряженностью в работе глутатион-зависимых ферментов, ингибированием оксидазной активности церулоплазмينا и снижением уровня пероксиредоксина-1, что в дальнейшем обуславливает глубокие редокс-нарушения.

3. В плазме и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование, установлены активация миелопероксидазы и подавление арилэстеразной активности параоксоназы. Соотношение активности миелопероксидазы и арилэстеразной активности параоксоназы в плазме и перикардиальной жидкости служит предиктором развития постперикардиотомного синдрома. Повышение активности аргиназы в эритроцитах и уровня асимметричного диметиларгинина в плазме крови свидетельствует об эндотелиальной дисфункции у больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование. Соотношение активности аргиназы в эритроцитах и арилэстеразной активности параоксоназы служит предиктором развития постперикардиотомного синдрома.

4. Проведение аортокоронарного шунтирования сопряжено с запуском системного воспалительного ответа и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов. Изменения уровня ИЛ-6 и -8 в плазме крови в ранние послеоперационные сроки могут свидетельствовать о быстрой форме развития постперикардиотомного синдрома.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 197 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (5 глав), заключения, выводов, списка литературы (376 источников). Иллюстративный материал включает 15 таблиц и 43 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические группы

В исследование было включено 76 больных ИБС, перенесших АКШ в отделении кардиохирургии ГБОУ ВПО «Ростовского государственного медицинского университета» Минздрава РФ за 2013-15 гг. Пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 66 пациентов без ПКТС, вторую – 10 пациентов с ПКТС.

Получение биологического материала

Биохимические и иммунологические показатели исследовались в динамике: в момент операции, на 1-е, 3-е, 5-е, 7-е и 10-е сутки послеоперационного периода. Определение биохимических и иммунологических показателей проводили в эритроцитах и плазме крови, а также в перикардиальной жидкости. Забор крови производили утром натощак из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали КЗЭДТА. Для получения плазмы центрифугировали цельную кровь при 3000 об/мин 10 мин. Перикардиальная жидкость отбиралась интраоперационно, затем центрифугировалась (10 мин при 3000 об/мин). Для исследований использовался супернатант. Плазма и перикардиальная жидкость для иммуноферментного анализа хранилась в пробирках типа эппендорф при -20°C . Для получения 1% гемолизата эритроциты лизировали дистиллированной водой в соотношении 1:100, а 10% гемолизата – в соотношении 1:10, энергично встряхивая и затем инкубируя при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

Биохимические методы исследования

Уровень NO оценивали, измеряя содержание стабильных метаболитов оксида азота, нитритов/нитратов (NOx) на основе реакции с реактивом Грисса (Голиков, 2004). Получение хлороформного экстракта для определения молекулярных продуктов ПОЛ осуществлялось по методу, описанному Bligh и Dyer (Bligh E.G., Dyer W.J., 1959). Диеновые конъюгаты (ДК) определяли в хлороформном экстракте спектрофотометрическим методом (Стальная И.Д., 1977). Содержание шиффовых оснований (ШО) определяли флуоресцентным методом (Bidlack W.R., Tappel A.L., 1973). Уровень малонового альдегида (МДА) оценивали с помощью колориметрического метода (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977). Определение активности МПО основано на спектрофотометрическом методе (Саидов М.З., Пинегин Б.В., 1991). Активность супероксиддисмутазы/супероксидустрояющую активность (СОД/СУА) определяли спектрофотометрическим методом (Сирота Т.В., 1999). Активность каталазы/скорость утилизации гидропероксида ($V_{\text{H}_2\text{O}_2}$) определяли по методу Королюка М.А. (Королюк М.А. и др., 1988). Оксидазную активность церулоплазмينا оценивали спектрофотометрическим методом (Камышников В.С., 2015). Для определения содержания восстановленного глутатиона (GSH) использовался метод Ellman Q.L (Ellman Q.L., 1959). Активность ГПО определяли спектрофотометрическим ме-

тодом (Моин В.М., 1986). Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли методом Юсуповой Л.Б (Юсупова Л.Б., 1989). Определение активности глутатион-S-трансферазы (GST) основано на спектрофотометрическом методе (Nabig W.H. et al., 1974). Активность аргиназы определяли колориметрическим методом (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982). Для определения концентрации мочевины использовался колориметрический метод (Меньшиков В.В., 1987). Арилэстеразную активность PON оценивали по скорости образования фенола при гидролизе фенилацетата (Kilic S.S. et al., 2005). Концентрацию общего белка в плазме и перикардальной жидкости определяли биуретовым методом с помощью тест-набора производства «ЭКО сервис». Количество гемоглобина определяли колориметрически с помощью стандартного клинического набора реактивов Ольвекс Диагностиум (Россия). Суммарную пероксидазную активность (СПА) внеклеточных пероксидаз определяли по интенсивно окрашенным продуктам при окислении бензидина (Лукаш А.И. и др., 1996). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США). Содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 определяли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа фирмы Вектор-Бест (Россия). Концентрацию ADMA определяли с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа фирмы Immundiagnostik AG (Германия). Концентрацию Ptx-1 определяли с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа фирмы AbFrontier (Республика Корея). Результаты ИФА оценивали на спектрофотометре StatFax 2100, США.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA10.0 и SPSS Statistics 17.0. Нормальность распределения в исследуемых выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для оценки различий между сравниваемыми группами, в случае несоответствия типа распределения выборок нормальному, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$, при $0,05 < p < 0,1$ рассматривали тенденцию к изменениям. При $p > 0,1$ различия считали недостоверными. Результаты представляли в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом (25-75-й процентиль). Для определения возможных корреляционных связей использовали непараметрический ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Силу

корреляционной связи оценивали как сильную при $|R| \geq 0,75$, как умеренную – при $0,25 < |R| < 0,75$, как слабую – при $|R| \leq 0,25$ (при уровне достоверной значимости $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Свободнорадикальное окисление и продукты ПОЛ в крови и перикардиальной жидкости у больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование

Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня продуктов ПОЛ в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. Содержание ДК в плазме крови в течение всего периода наблюдения повышалось на 209-646% у больных без ПКТС, на 176-1248% у больных с синдромом. Уровень ДК во 2-й группе на 3-и послеоперационные сутки выше на 337%, чем в 1-й группе.

Уровень МДА возрастал в плазме крови обеих групп больных. В плазме крови больных без ПКТС в течение всего периода наблюдения содержание МДА повышалось на 79-139%, в плазме крови больных с синдромом прирост МДА составлял 73-145% по сравнению с донорами.

В момент операции установлено повышение уровня МДА на 38% в перикардиальной жидкости пациентов с ПКТС по сравнению с контрольной группой. Содержание МДА во 2-й группе пациентов выше на 61%, чем в 1-й. Уровень МДА в эритроцитах обеих групп больных увеличивался после АКШ. В эритроцитах пациентов без ПКТС повышение содержания МДА составляло 16-23% на 3-10-е послеоперационные сутки, у пациентов с синдромом - 24-28% на 5-10-е сутки относительно доноров.

Наблюдается повышение уровня конечных продуктов ПОЛ в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. Содержание ШО в плазме крови пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения увеличивалось на 48-164%, тогда как прирост уровня ШО в эти же сроки после операции в группе пациентов с синдромом составлял 492-626% по сравнению с донорами. Во 2-й группе пациентов уровень ШО выше на 148-303%, чем в 1-й группе на 1-10-е послеоперационные сутки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об интенсификации СРО и накопления продуктов ПОЛ в эритроцитах, плазме и перикардиальной жидкости пациентов, перенесших АКШ. Следует отметить, что для пациен-

тов с ПКТС характерна более высокая интенсивность перекисного окисления в отличие от пациентов без диагностированного синдрома, у которых концентрация первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ значительно ниже.

Активность антиоксидантных ферментов и содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови и перикардиальной жидкости

Активность СОД/СУА в эритроцитах и плазме крови обеих групп больных после АКШ существенно возрастала. Активность СОД в эритроцитах повышалась на 99-328% у пациентов без ПКТС и на 85-302% у пациентов с синдромом в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой.

Установлено повышение СУА в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. В плазме крови пациентов без ПКТС уровень СУА возрастал на 84-157% в течение семи послеоперационных суток, в плазме пациентов с ПКТС прирост СУА составил 132-428% в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. Максимальный прирост показателя в обеих группах наблюдался на 3-е послеоперационные сутки. На 1-е, 3-е, 7-е и 10-е послеоперационные сутки СУА была выше во 2-й группе на 109%, 105%, 147% и 549%, соответственно, чем в 1-й группе.

Активность каталазы снижалась в эритроцитах крови пациентов обеих исследованных групп в течение всего периода наблюдения. Активность фермента снижалась на 17-38% в эритроцитах больных без ПКТС и на 9-35% в эритроцитах пациентов с синдромом. Активность каталазы во 2-й группе пациентов на 10-е послеоперационные сутки была на 16% выше, чем в 1-й группе.

Установлено повышение $V_{H_2O_2}$ в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. В плазме пациентов без ПКТС $V_{H_2O_2}$ повышалась на 59-103%, в плазме пациентов с синдромом - на 46-93% в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. $V_{H_2O_2}$ в момент операции во 2-й группе на 51% ниже, чем в 1-й.

Оксидазная активность ЦП уменьшалась в плазме крови обеих групп больных после АКШ. Активность ЦП снижалась на 27-40% и на 21-54% в плазме крови пациентов без ПКТС и в группе больных с синдромом, соответственно, в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. Во второй группе больных активность ЦП в момент операции и 5-е послеоперационные сутки ниже на 33% и 21%, чем в первой группе.

В момент операции установлено снижение активности ЦП в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС и пациентов с синдромом на 42% и 50%, соответственно, по сравнению с контрольной группой.

Наблюдалась напряженность в функционировании компонентов глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Содержание GSH повышалось на 30-50% в эритроцитах пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Значительный прирост концентрации GSH (на 33-64%) отмечен в эритроцитах пациентов с синдромом. Содержание GSH во 2-й группе больных в момент операции на 18% выше, чем в 1-й группе.

Установлено снижение активности ГПО на 20-29% в эритроцитах пациентов без ПКТС по сравнению с контрольной группой течение всего периода наблюдения. Активность ГПО в эритроцитах пациентов с синдромом снижалась на 17%, 28% и 34% в момент операции, на 1-е и 5-е послеоперационные сутки, соответственно.

Изменения активности ГПО в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ, отличается положительной направленностью. Активность фермента в плазме крови пациентов без ПКТС повышалась на 20-24% в 1-е, 5-е, 7-е и 10-е послеоперационные сутки по сравнению с донорами. В плазме крови пациентов с синдромом активность ГПО повышалась на 21-63% в момент операции, на 1-е, 5-е и 7-е послеоперационные сутки относительно доноров. Активность ГПО во 2-й группе больных в момент операции и на 1-е сутки послеоперационного периода была выше на 40% и 31%, чем в 1-й группе.

Изменения содержания P_{гх}-1 в плазме больных ИБС, перенесших АКШ, отличались отрицательной направленностью. Содержание P_{гх}-1 в плазме крови пациентов без ПКТС снижалось на 49%, 43% и 33% в 1-е, 3-е и 5-е послеоперационные сутки по сравнению с контрольной группой. Уровень P_{гх}-1 в плазме крови пациентов с синдромом уменьшался на 62% и 49% в момент операции и 3-е послеоперационные сутки, соответственно, относительно нормы. В группе пациентов с ПКТС концентрация P_{гх}-1 в момент операции была ниже на 56%, чем в группе пациентов без синдрома.

Уровень P_{гх}-1 был выше на 251% в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС по сравнению с контролем. В перикардиальной жидкости пациентов с синдромом содержание P_{гх}-1 было выше на 137% по сравнению с контрольной

группой. Значения исследуемого показателя на 33% ниже в перикардиальной жидкости больных 2-й группы, чем в 1-й группе.

На фоне на снижения уровня P_{rx}-1, активность ГР и GST возрастала в эритроцитах обеих групп больных. Активность ГР повышалась на 300-361% в эритроцитах пациентов без ПКТС, тогда как активность фермента в эритроцитах пациентов с синдромом возрастала на 431-633% в течение всего периода наблюдения по сравнению с нормой. По сравнению с 1-й группой активность ГР во 2-й группе была выше в момент операции, на 1-е, 3-е, 5-е и 10-е послеоперационные сутки на 33%, 23%, 59%, 23% и 39%, соответственно.

Установлено повышение на 138-216% активности GST в эритроцитах пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. Активность фермента возрастала на 151-529% в эритроцитах крови пациентов с синдромом. Активность GST на 7-е послеоперационные сутки была выше на 165% во 2-й группе, чем в 1-й группе.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нарушениях в работе антиоксидантной системы. Особенно следует отметить, дисбаланс в функционировании СОД/каталазы и ГПО/ГР в эритроцитах больных ИБС, перенесших АКШ. Такие изменения сопряжены с нарушением редокс-гомеостаза и дестабилизацией эритроцитарных мембран. Снижение уровня P_{rx}-1 в сочетании с дисбалансом и напряженностью в работе антиоксидантных ферментов может сдвигать равновесие в системе прооксиданты↔антиоксиданты в сторону прооксидантных процессов и усиления воспалительного ответа.

Содержание внеэритроцитарного гемоглобина и суммарная пероксидазная активность в плазме крови

Уровни ВЭГ и СПА существенно возросли в плазме крови обеих групп больных. Содержание ВЭГ в плазме повышалось на 112-165% в группе пациентов без ПКТС и на 134-166% у пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами.

В послеоперационном периоде СПА в плазме крови повышалась на 170-208% в группе пациентов без ПКТС и на 115-249% у пациентов с синдромом в течение всех сроков наблюдения по сравнению с контрольной группой.

Полученные результаты могут свидетельствовать о нарушении стабильности мембран эритроцитов и высвобождении гемоглобина в плазму крови. Высо-

кое содержание ВЭГ обуславливает снижение биодоступности оксида азота и может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции (Rother et al., 2005). ВЭГ способен легко окисляться, и его производные усиливают воспалительную реакцию эндотелиальных клеток сосудов, что, в конечном итоге, может стать причиной различных сердечно-сосудистых осложнений (Kaniyas, Acker, 2009).

Активность миелопероксидазы и арилэстеразная активность параоксоназы в плазме и перикардиальной жидкости

В плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ, отмечены колебания активности МПО. В плазме крови пациентов без ПКТС активность МПО повышалась в 1-е послеоперационные сутки на 20% и снижалась в 7-е послеоперационные сутки на 16% по сравнению с контролем. Активность МПО возрастала также в 1-е послеоперационные сутки на 27% в плазме крови пациентов с синдромом и снижалась в 3-е послеоперационные сутки на 22%.

В момент операции в перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших АКШ, активность МПО повышалась по сравнению с контрольной группой. Активность фермента была выше в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС на 98% по сравнению с контролем. Значения показателя существенно повышались в перикардиальной жидкости пациентов с синдромом, что составило 171% относительно нормы. Активность МПО во 2-й группе была выше на 37%, чем в 1-й. В настоящем исследовании установлена прямая корреляционная взаимосвязь между активностью МПО в плазме и перикардиальной жидкости ($R=0,9$, $p<0,05$) пациентов без ПКТС, а также для пациентов с синдромом ($R=0,71$, $p<0,05$).

Полученные результаты свидетельствовали о снижении арилэстеразной активности PON в плазме крови обеих групп больных. Арилэстеразная активность PON снижалась на 74-80% в плазме крови пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Арилэстеразная активность фермента уменьшалась на 61-85% в плазме крови пациентов с синдромом. Минимальных значений исследуемый показатель достигал в обеих группах в 1-е послеоперационные сутки.

В момент операции арилэстеразная активность PON снижалась на 52% в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС по сравнению с контролем, у

пациентов с синдромом – на 76%. Во 2-й группе больных арилэстеразная активность PON была ниже на 49%, чем в 1-й группе. В настоящем исследовании определена корреляционная взаимосвязь между арилэстеразной активностью PON в плазме и перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС ($R=0,8$, $p<0,05$) и пациентов с синдромом ($R=0,87$, $p<0,05$).

В настоящем исследовании установлена обратная корреляционная зависимость между арилэстеразной активностью PON и активностью МПО в плазме крови ($R=-0,9$, $p<0,05$) пациентов без ПКТС и для пациентов с синдромом ($R=-1,0$, $p<0,05$). Определена корреляционная зависимость между активностью МПО и арилэстеразной активностью PON в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС ($R=-0,8$, $p<0,05$) и пациентов с синдромом ($R=-0,6$, $p<0,05$). На основе данных показателей был разработан тест для прогнозирования развития ПКТС. В ходе исследования был рассчитан коэффициент для плазмы крови, характеризующий отношение активности МПО к арилэстеразной активности PON в 1-е послеоперационные сутки. Установлено, если у пациента в 1-е сутки послеоперационного периода данный коэффициент превышает 5,19, тогда с вероятностью 70% возможно развитие ПКТС после перенесенной реваскуляризации миокарда. Для перикардиальной жидкости такой коэффициент равен 4,27. Если соотношение активностей МПО/PON в перикардиальной жидкости у пациента будет выше 4,27, вероятность развития ПКТС составит 71,4%. Для исследуемого соотношения активностей ферментов у больных ИБС, перенесших АКШ, установлена высокая прямая корреляционная зависимость между плазмой (1-е послеоперационные сутки) и перикардиальной жидкостью (момент операции), коэффициент корреляции Спирмена составил 0,71 ($p<0,05$). Для оценки эффективности прогностических методов были построены графики ROC-кривой (рис. 1). Чувствительность описанного способа для плазмы равна 87,5%, специфичность - 75%, общая точность – 80%. Для перикардиальной жидкости критерии теста равны 71,4%, 80% и 71,4%, соответственно. AUC (Area Under Curve, площадь под ROC-кривой) теста для плазмы составила 0,875 (95%-ДИ: 0,76-0,951), для перикардиальной жидкости – 0,779 (95%-ДИ: 0,505-0,951).

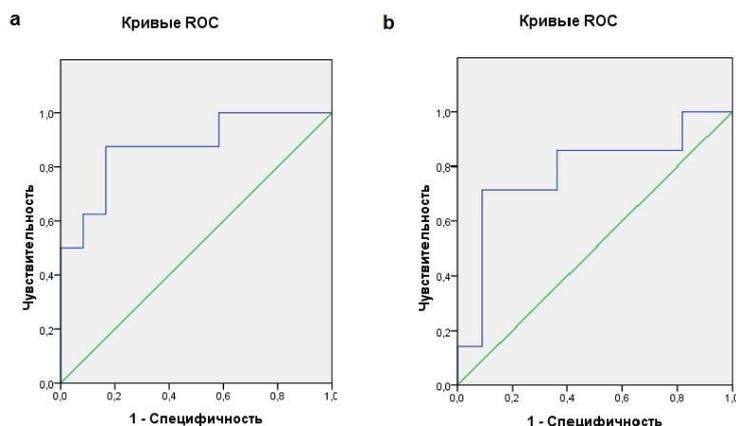


Рис. 1. ROC-кривая теста, предназначенного для прогнозирования ПКТС в плазме (а) и перикардиальной жидкости (б).

Результаты исследования свидетельствуют о нарушении функционирования параоксоназы, а, следовательно, о существенном снижении его противовоспалительного эффекта как в плазме, так и в перикардиальной жидкости. Известно, что соотношение концентраций МПО и PON может использоваться в качестве предиктора развития атеросклероза и острого коронарного синдрома (Haraguchi et al., 2014; Emami Razavi et al., 2013). Разработанный тест позволит оценивать вероятность развития синдрома уже на ранних послеоперационных сроках и выделить группу риска пациентов для целенаправленной терапии.

Уровень нитритов/нитратов и медиаторов эндотелиальной дисфункции в плазме и эритроцитах

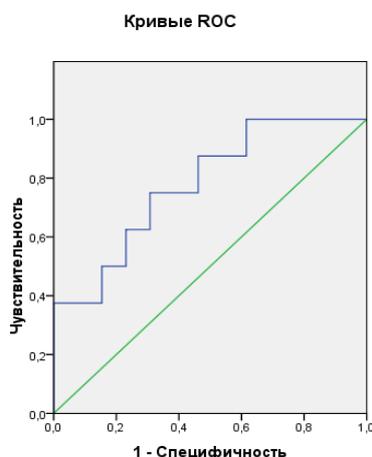
Содержание NOx, ADMA и активность аргиназы возрастали в плазме и эритроцитах крови обеих групп больных. Уровень NOx повышался на 73-83% в плазме крови пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Содержание NOx возрастало на 67-104% в плазме крови пациентов с синдромом. Максимальных значений исследуемый показатель достигал в момент операции в обеих группах больных.

Наблюдалось повышение на 48-174% активности аргиназы в эритроцитах пациентов без ПКТС в течение 10-ти послеоперационных суток по сравнению с контролем. В эритроцитах пациентов с синдромом активность аргиназы возрастала на 70-220% в течение всего периода наблюдения. Максимальных значений исследуемый показатель достигал в 1-й группе больных на 7-е послеоперационные сутки, во 2-й группе – в 1-е сутки послеоперационного периода. Во 2-й группе больных активность аргиназы была выше в момент операции на 27%, в 1-е послеоперационные сутки на 71%, на 3-и сутки на 25%, чем в 1-й группе.

Установлено повышение уровня ADMA в плазме крови пациентов без ПКТС в 1-е, 3-и и 5-е послеоперационные сутки на 24%, 27% и 67% по сравнению с контрольной группой. Содержание ADMA заметно возрастало в плазме крови пациентов с синдромом в момент операции, 3-и и 5-е послеоперационные сутки (на 54%, 39% и 76%) по сравнению с контролем. Значения исследуемого показателя были выше во 2-й группе в момент операции на 26% и в 3-и послеоперационные сутки на 9%, чем в 1-й группе. Установлена обратная корреляционная взаимосвязь между активностью аргиназы в эритроцитах и арилэстеразной активностью PON в плазме больных 1-й группы ($R=-0,87$, $p<0,05$) и больных 2-й группы ($R=-1,0$, $p<0,05$).

Нами был разработан тест для прогнозирования развития ПКТС. В ходе исследования был рассчитан коэффициент, характеризующий отношение активности аргиназы к арилэстеразной активности PON, в 1-е послеоперационные сутки. Установлено, если у пациента в первые сутки послеоперационного периода данный коэффициент превышает 0,39, тогда с вероятностью 67% возможно развитие ПКТС после перенесенной реваскуляризации миокарда. Для оценки эффективности прогностического метода был построен график ROC-кривой (рис. 2). Чувствительность описанного способа прогнозирования постперикардотомного синдрома равна 75%, специфичность – 69,2%, общая точность – 75%. Площадь под ROC-кривой составила 0,779 (95% ДИ 0,579-0,981), что свидетельствует о высоком качестве описываемого способа.

Рис. 2. ROC кривая теста, предназначенного для прогнозирования ПКТС.



Разработанный в ходе исследования тест позволяет существенно сократить сроки прогнозирования ПКТС и выделить группу риска для целенаправленной терапии.

Уровень провоспалительных цитокинов в плазме и перикардиальной жидкости

Изменения уровня ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ, имели разнонаправленную динамику. Содержание ИЛ-1 β повышалось в плазме крови пациентов без ПКТС, также наблюдалось повышение уровня ИЛ-6 и ИЛ-8, в то время как концентрация ИЛ-1 β у пациентов с синдромом снижалась. Уровень ИЛ-1 β повышался в плазме крови пациентов без ПКТС по сравнению с контрольной группой в 3-и послеоперационные сутки на 30%, в 5-е послеоперационные сутки – на 11%. Содержание цитокина существенно снижалось в плазме крови пациентов с синдромом - в момент операции на 63%, в 1-е послеоперационные сутки - на 54%. Уровень ИЛ-1 β был ниже во 2-й группе в момент операции на 59%, в 1-е послеоперационные сутки – на 51%, в 3-и послеоперационные сутки – на 34%, чем в 1-й группе.

Содержание ИЛ-6 в плазме крови пациентов без ПКТС повышалось на 91-4048% в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Уровень цитокина в плазме крови пациентов с синдромом существенно возрастал (на 238-6048%) относительно доноров. Значения исследуемого показателя во 2-й группе больных были выше в момент операции на 77%, в 1-е послеоперационные сутки - на 48%, на 5-е послеоперационные сутки - на 191%, чем в 1-й группе.

В момент операции уровень ИЛ-6 в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС и пациентов с синдромом был выше на 3554% и 3566%, чем в контрольной группе.

Уровень ИЛ-8 повышался в плазме крови пациентов без ПКТС в 1-е послеоперационные сутки на 28%, на 3-и послеоперационные сутки - на 129%, на 5-е послеоперационные сутки – на 143%, по сравнению с контрольной группой. Содержание цитокина существенно возросло в плазме крови пациентов с синдромом на 3-и послеоперационные сутки на 96%, на 5-е послеоперационные сутки – на 198%.

В момент операции наблюдалось повышение уровня ИЛ-8 в перикардиальной жидкости 1-й группы больных на 607%, во 2-й группе – на 635% по сравнению с контролем.

Таким образом, для обеих групп больных характерно развитие системного воспалительного ответа и избыточная продукция провоспалительных цитокинов. Исключением является снижение уровня ИЛ-1 β в плазме крови больных с ПКТС, что может быть обусловлено, с одной стороны, высоким содержанием окисленных ЛПНП и накоплением продуктов ПОЛ, а с другой - экспрессией антагониста рецептора ИЛ-1. Дисбаланс в продукции противовоспалительных и провоспалительных цитокинов с сопутствующими редокс-нарушениями вызывают дисрегуляцию транскрипционных факторов и обуславливает апоптотическую гибель кардиомиоцитов (Чечина О.Е. и др., 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено двум взаимосвязанным кардиопатологиям - ишемической болезни сердца и постперикардитомному синдрому. Известно, что обе патологии развиваются на фоне окислительного стресса и воспаления. Нами было показано, что аортокоронарное шунтирование у больных ИБС сопровождается сверхпродукцией провоспалительных цитокинов и нарушением клеточного редокс-гомеостаза. Накопление продуктов ПОЛ и дисрегуляция антиоксидантной системы способствуют развитию окислительного стресса, системного воспалительного ответа, нарушению стабильности эритроцитарных мембран, апоптотической гибели кардиомиоцитов и увеличению объема перикардиального экссудата.

Полученные результаты могут свидетельствовать о быстрой форме ПКТС, характеризующейся развитием патологии в течение 7 послеоперационных суток. Разработанные биохимические предикторы риска развития ПКТС позволят существенно сократить сроки клинических исследований и своевременно скорректировать курс терапии. Настоящее исследование позволило раскрыть особенности взаимосвязи свободнорадикальных процессов, компонентов редокс-регулирующей системы, медиаторов воспаления и факторов эндотелиальной дисфункции у больных ИБС после прямой реваскуляризации миокарда. На основе результатов исследования и литературных данных была построена интегральная гипотетическая схема (рис. 3).

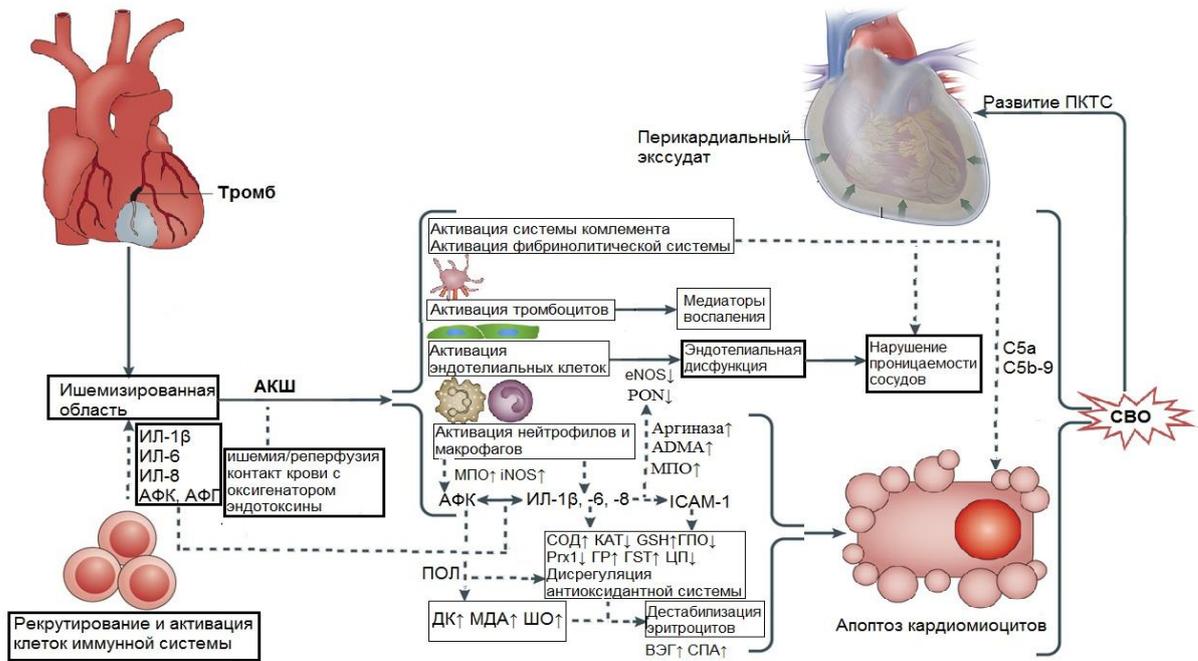


Рис. 3. Гипотетическая схема, отражающая роль продуктов ПОЛ, антиоксидантных, прооксидантных ферментов, медиаторов эндотелиальной дисфункции и провоспалительных цитокинов в механизмах развития постперикардотомного синдрома. КАТ - каталаза; iNOS - индуцибельная NO-синтаза; ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) - молекула клеточной адгезии; c5a и c5b-9 - субкомпоненты системы комплемента.

ВЫВОДЫ

1. В плазме и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших АКШ, наблюдалось увеличение уровня продуктов ПОЛ. Наиболее выраженные изменения концентрации ДК и МДА выявлены в плазме и перикардиальной жидкости пациентов с ПКТС.

2. В эритроцитах крови обеих групп больных обнаружен дисбаланс в работе антиоксидантных ферментов. Однонаправленный рост активности СОД/СУА и $V_{H_2O_2}$ в плазме сопровождается снижением активности каталазы в эритроцитах крови пациентов, перенесших АКШ. Для исследованных групп пациентов характерны редокс-нарушения, связанные с активацией ГР, GST, приростом уровня GSH в эритроцитах и снижением активности ГПО в эритроцитах и концентрации Ргх-1 в плазме. Установлено ингибирование оксидазной активности ЦП в плазме крови обеих групп больных. Данные изменения характерны для первых 5-и послеоперационных суток у пациентов с ПКТС.

3. Обнаружено нарушение стабильности мембран эритроцитов у больных ИБС, перенесших АКШ. Отмечено повышение уровня ВЭГ и СПА в плазме крови обеих групп больных. Уровень СПА в перикардальной жидкости пациентов с ПКТС был значительно выше по сравнению с пациентами без синдрома.

4. Активация МПО сопровождается ингибированием арилэстеразной активности PON в плазме и перикардальной жидкости больных ИБС, перенесших АКШ. Соотношение активности МПО и арилэстеразной активности PON в плазме и перикардальной жидкости служит предиктором развития ПКТС.

5. Обнаружено повышение уровня и активности медиаторов эндотелиальной дисфункции, ADMA и аргиназы, в эритроцитах и плазме крови больных ИБС после АКШ. Причем, активность аргиназы и концентрация ADMA выше в эритроцитах и плазме крови пациентов с ПКТС по сравнению с пациентами без синдрома. Установлена обратная корреляционная взаимосвязь между активностью аргиназы и арилэстеразной активностью параоксоназы. Соотношение активности аргиназы и PON может быть использовано для прогнозирования развития ПКТС. Установлено повышение концентрации стабильных метаболитов оксида азота, нитритов и нитратов, в плазме крови обеих групп больных.

6. После проведения аортокоронарного шунтирования наблюдается сверхпродукция провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8. Концентрация ИЛ-1 β повышалась в плазме крови пациентов без ПКТС, но снижалась в плазме крови пациентов с синдромом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гвалдин Д.Ю. Свободнорадикальное окисление и глутатион-зависимая антиоксидантная система в крови больных ИБС, перенесших хирургическую реваскуляризацию миокарда // Известия Высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион». - 2014 г. - Т. 181. - №3. - С. 56-60.

2. Гвалдин Д.Ю. Состояние глутатион-зависимой антиоксидантной системы в крови больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда / Внуков В.В., Сидоров Р. В., Милютин Н.П., Закревский Ю.Н., Поспелов Д.Ю., Щетко В.Н. // Врач-аспирант. - 2016. - Т. 75. - №2. - С. 4-9.

3. Гвалдин Д.Ю. Роль свободнорадикальных и воспалительных процессов в развитии постперикардиотомного синдрома у больных ИБС, перенес-

ших аортокоронарное шунтирование / Внуков В.В., Сидоров Р.В., Милютина Н.П., Поспелов Д.Ю., Щетко В.Н. // Клиническая медицина. - 2016. - Т. 11. - №94. - С. 827-831.

4. Гвалдин Д.Ю. Содержание провоспалительных цитокинов, пероксиредоксина 1 и активность глутатионпероксидазы в плазме крови больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование / Внуков В.В., Сидоров Р.В., Милютина Н.П., Ананян А.А., Сагакянц А.Б., Шлык И.Ф., Талалаев Е.П. // Успехи геронтологии. 2017. - Т. 30 - №2. - С. 269-275.

5. Gvaldin D. Yu. Der funktionalen Zusammenhang zwischen Myeloperoxidase und Paraoxonase in der Mechanismen der Pathogenese des Postperikardiotomie-Syndroms bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die Koronararterien-Bypass unterzogen wurden / Sidorov R.V., Milyutina N.P., Shlyk S.V., Ananyan A.A., Shlyk I.F., Shchetko V.N., Vnukov V.V. // Journal für Kardiologie. - 2017. - №24. - S.1-7.

6. Гвалдин Д.Ю. Свободнорадикальное окисление и роль антиоксидантной системы в нарушениях редокс-статуса в крови больных, перенесших аорто-коронарное шунтирование / Внуков В.В., Сидоров Р.В., Ананян А.А., Милютина Н.П., Даниленко А.О., Черных Е.С., Ковалева А.В. // Сборник материалов 8-й национальной научно-практической конференции с международным участием.-2014 г.- Смоленск.-С. 47-48.

7. Гвалдин Д.Ю. Окислительно-нитрозильный стресс в механизмах постперикрдиотомного синдрома у больных ИБС, перенесших хирургическую реваскуляризацию миокарда. / Гвалдин Д.Ю., Карапетьян О.Ш., Даниленко А.О., Дзряян В.А. // Материалы II Всероссийской XIII межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов “Современные решения актуальных научных проблем в медицине”.-2015 г.-Нижний Новгород.-С.342-343.

8. Гвалдин Д.Ю. Нитрозильный стресс и состояние антиоксидантной системы у больных ИБС, перенесших хирургическую реваскуляризацию миокарда. / Внуков В.В., Сидоров Р.В., Ананян А.А., Милютина Н.П., Карапетьян О.Ш., Даниленко А.О., Дзряян В. А., Шахвердян Э.В. // Материалы XIV межвузовской биохимической научно-практической конференции с международным

участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении».-2015 г. - Ростов-на-Дону - С. 34-35.

9. Гвалдин Д.Ю. Свободнорадикальное окисление и стабильность мембран эритроцитов у больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда / Внуков В.В., Сидоров Р.В., Милютин Н.П., Барвенко Д.А. // Материалы XIV межвузовской биохимической научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении». - 2016 г. - Ростов-на-Дону. - С. 46-47.

Статьи № 1-5 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.