НОВЫЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

В. В. Мороз¹, А. Б. Салмина², А. А. Фурсов^{2,3},
С. В. Михуткина², К. А. Линева³, С. В. Шахмаева⁴

¹ ГУ НИИ общая реаниматология РАМН, Москва

² ГОУ ВПО «Красноярская государственная медицинская академия,
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»,

³ КГУЗ «Краевая клиническая больница», Красноярск

⁴ ЦВКГ им. А. А. Вишневого Минобороны России, Красноярск

Development of Systemic Inflammatory Reaction after Aortocoronary Bypass Surgery: New Aspects

V. V. Moroz¹, A. B. Salmina², A. A. Fursov^{2,3}, S. V. Mikhutkina², K. A. Lineva³, S. V. Shakhmayeva⁴

¹ Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

² Krasnoyarsk State Medical Academy, Federal Agency for Health Care and Social Development;

³ Krasnoyarsk Territory Hospital;

⁴ A. A. Vishnevsky Central Military Hospital, Ministry of Defense of Russia, Krasnogorsk

Цель исследования. Оптимизировать диагностику системной воспалительной реакции (СВР) после операций аортокоронарного шунтирования (АКШ) в условиях искусственного кровообращения (ИК) путем изучения реакции плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови на оперативное вмешательство. **Материал и методы.** Обследовали 83 больных ишемической болезнью сердца (ИБС), которым выполняли АКШ. Исследование состояния плазматической мембраны лимфоцитов осуществляли перед операцией и на 1, 2, 3, 7-е сутки послеоперационного периода. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина $\rho=1.077$ (Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden). Выделенные клетки изучали методом фазово-контрастной микроскопии (увеличение 1×900). **Результаты исследований.** Обнаружили, что у больных ИБС в периоперационный период регистрируют изменения состояния плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови (блеббинг), генез которых определяется нарушением мембран-цитоскелетных взаимодействий. Усиление изменений плазматической мембраны происходило в течение всего послеоперационного периода, при этом максимум изменений регистрировали на 1-е сутки, что соответствовало пику увеличения концентрации интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей- α . **Заключение.** Динамические изменения клеточных мембран, проявляющиеся блеббингом лимфоцитов периферической крови, отражают развитие СВР при АКШ в условиях ИК. Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов у больных ИБС имеет различную выраженность: от начальной до терминальной. Определение блеббинга лимфоцитов периферической крови позволяет не только регистрировать СВР, но и оценивать ее динамику. **Ключевые слова:** блеббинг лимфоцитов, системная воспалительная реакция, аортокоронарное шунтирование, искусственное кровообращение.

Objective: to optimize the diagnosis of a systemic inflammatory reaction (SIR) after aortocoronary bypass surgery (ACBS) under extracorporeal circulation (EC), by examining the reaction of the peripheral blood lymphocytic plasma membrane to surgery. **Subjects and methods.** Eighty-three patients with coronary heart disease (CHD) who had undergone ACBS were examined. The lymphocytic plasma membrane was studied before and 1, 2, 3, and 7 days after surgery. Lymphocytes were derived on the ficoll-verografin (Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden) density gradient ($\rho=1.077$). The isolated cells were investigated by phase contrast microscopy ($900\times$). **Results.** The patients with CHD were found to have perioperative peripheral lymphocytic plasma membrane changes (blebbing), the genesis of which was determined by impaired membrane-cytoskeleton interactions. More plasma membrane changes occurred throughout the postoperative period, with their maximum being recorded on day 1, which corresponded to the increase peak in the concentrations of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **Conclusion.** The follow-up cell membrane changes appearing as peripheral lymphocytic blebbing reflect the development of SIR during ACBS under EC. In patients with CHD, the lymphocytic plasma membrane blebbing is of varying degrees: from early to terminal. The determination of peripheral lymphocytic blebbing allows one not only to record SIR, but also to assess its time course of changes. **Key words:** lymphocytic blebbing, systemic inflammatory reaction, aortocoronary bypass surgery, extracorporeal circulation.

Современная сердечно-сосудистая хирургия возможна без применения искусственного кровообращения (ИК), обеспечивающего поддержание жизни

больного во время коррекции внутрисердечной патологии. В последние годы во всем мире, в том числе и в России, увеличивается количество операций аортокоронарного шунтирования.

нарного шунтирования (АКШ) по поводу ишемической болезни сердца (ИБС), наиболее часто выполняемых в условиях ИК. Применение мембранных оксигенаторов, новых полимерных материалов для магистралей и канюль, а также разработка специальных покрытий обеспечили уменьшение травматизации форменных элементов крови. Тем не менее, ИК остается крайне нефизиологичным состоянием, на которое организм реагирует однотипно: развивается централизация кровообращения — филогенетически древний механизм, имеющий определенные временные характеристики. Кроме того, ИК способствует ряду побочных эффектов в послеоперационный период, в том числе системной воспалительной реакции (СВР). Развитие СВР обусловлено действием различных факторов, в частности, контактом крови с небиологическими поверхностями, пребыванием ее в нефизиологичных условиях. Кроме того, в патогенез СВР после кардиохирургических операций свой вклад вносят хирургическая травма, ишемия и реперфузия миокарда.

Каскад СВР может быть запущен многими стимулами, а в защитной реакции организма участвуют несколько взаимосвязанных систем. Таким образом, патогенез СВР представляет собой сложную комбинацию активации провоспалительной и противовоспалительной систем, оценку которых в клинических условиях выполнить довольно сложно. До настоящего времени остается нерешенной проблема согласованности результатов лабораторной диагностики и методов оценки клинических проявлений СВР. Известны несколько способов диагностики СВР, в том числе по температурной реакции, лейкоцитозу, динамике респираторных и сердечно-сосудистых параметров [1], уровню маркеров воспаления в периферической крови (С-реактивный белок, цитокины, прокальцитонин) [2–7]. Вместе с тем, каждый из этих методов обладает определенными ограничениями и недостатками.

Клетки периферической крови одними из первых реагируют на развитие СВР, а также сами являются непосредственными участниками патогенеза, вовлекаясь в секрецию про- и противовоспалительных медиаторов, различные межклеточные взаимодействия, развитие эндотелиальной дисфункции и иммунного ответа. Важным компонентом событий, происходящих при активации и повреждении клеток, являются структурно-функциональные изменения клеточных мембран и/или их взаимодействия с белками цитоскелета, которые опосредуют как оптимизацию эффекторных механизмов при стимуляции клеточных сигнальных систем, так и прямое повреждающее действие патогенных факторов на клеточные мембраны. Как при физиологической стимуляции некоторых клеток (иммунокомпетентные клетки, нейроны), так и при повреждении многих видов клеток развивается феномен блеббинга плазматической мембраны. Он проявляется образованием на клеточной поверхности пузырькоподобных выпячиваний, в генезе которых играют роль нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий, примембранный энергетический и ион-

ный дисбаланс, окислительный стресс, активация ряда сигнальных каскадных внутриклеточных путей [8, 9]. Блеббинг — универсальный биологический феномен, одно из основных начальных проявлений гибели клетки (в том числе при апоптозе и некрозе), а также морфологическое проявление повреждения клетки, не приводящего к клеточной гибели (вызванного гипоксией, интоксикацией, действием вирусов) [10]. Блеббинг плазматической мембраны — потенциально обратимое состояние [11–14]. Возможными последствиями блеббинга являются восстановление исходной структуры мембраны и ее контактов с цитоскелетом, «слущивание» пузырей с поверхности клеток, компартментализация цитоплазмы и формирование апоптотических телец, а также лизис клетки при образовании крупных пузырей.

Представляется весьма вероятным, что динамические изменения клеточных мембран, обусловленные изменением мембран-цитоскелетных взаимодействий и проявляющиеся блеббингом в клетках периферической крови, могут отражать характер развития СВР, в том числе при кардиохирургических вмешательствах.

Цель исследования — оптимизировать диагностику СВР после АКШ в условиях ИК путем изучения реакции плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови на оперативное вмешательство.

Материалы и методы

Обследовали 83 пациентов (79 мужчин и 4 женщины) с ИБС. Основной диагноз: ИБС, стабильная стенокардия, постинфарктный кардиосклероз, II–III функциональный класс по NYHA. Один острый инфаркт миокарда (ОИМ) перенесли 53,5% больных. У 1 пациента количество ОИМ составило 9. В 19,3% наблюдений после перенесенного ОИМ прошло более 1 года. У 10,8% больных после ОИМ прошло менее 6 месяцев. Сопутствующая патология: гипертоническая болезнь 3, риск 4 у 74-х (89,2%) пациентов; дисциркуляторная энцефалопатия у 31 (37,3%) пациента, причем в 4 наблюдениях данная патология была обусловлена предшествующим острым нарушением мозгового кровообращения, а у остальных — атеросклеротическим поражением сосудов головного мозга. У 26,4% больных диагностировали 2 и более сопутствующих заболевания. Один пациент был ранее оперирован по поводу коарктации аорты.

Основной этап оперативных вмешательств выполняли в условиях ИК при температуре 36–34°C. Время ИК составило 89,5±0,07 мин, пережатия аорты — 54,9±2,1 мин.

Исследование состояния плазматической мембраны лимфоцитов выполняли перед операцией и на 1, 2, 3, 7-е сутки послеоперационного периода. Выделение лимфоцитов осуществляли на градиенте плотности фиколл-верографина $\rho=1.077$ (Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden). Выделенные клетки оценивали методом фазово-контрастной микроскопии (увеличение 1×900). По морфологии выделяли следующие виды лимфоцитов: 1 — интактные клетки (с визуально неизменной плазматической мембраной, круглой, ровной поверхностью); 2 — клетки в состоянии начального блеббинга (мелкие везикулы на мембране — до 1/3 радиуса клетки); 3 — клетки в состоянии терминального блеббинга (крупные пузыри мембраны — более 1/3 радиуса клетки); 4 — некротизированные лимфоциты (с разрушенной мембраной).

Уровень интерлейкина-6 (ИЛ-6) определяли иммуноферментным методом с помощью наборов «БИОХИМ-МАК» (Россия) у 19 больных; фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) — иммуноферментным методом с помощью наборов «ВЕКТОР — БЕСТ» (Россия) у 18 больных.

Показатели блеббинга лимфоцитов периферической крови и уровня цитокинов на этапах исследования

Этапы исследования	Значения показателей на этапах исследования			
	начальный блеббинг лимфоцитов, %	терминальный блеббинг лимфоцитов, %	ФНО- α , пкг/мл	ИЛ-6, пкг/мл
До операции	13,4 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 0,5	1,85 $\pm$ 0,37	13,91 $\pm$ 4,03
1-е сутки после операции	22,3 $\pm$ 0,5**	12,6 $\pm$ 0,6**	45,8 $\pm$ 8,96*	146 $\pm$ 21,6*
2-е сутки после операции	15,9 $\pm$ 0,7**	8,6 $\pm$ 0,4**	29,25 $\pm$ 10,1*	96,84 $\pm$ 14,65*
3-и сутки после операции	14,0 $\pm$ 0,5**	8,4 $\pm$ 0,4	—	—
7-е сутки после операции	14,6 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,3	—	—

Примечание. * — различия достоверны относительно исходных значений в группе до операции АКШ при $p < 0,001$ Mann-Whitney.

** — различия достоверны относительно исходных значений в группе до операции АКШ при $p < 0,001$ Wilcoxon.

Рис. 1. Лимфоциты периферической крови в состоянии начального блеббинга.

Рис. 2. Лимфоциты периферической крови в состоянии терминального блеббинга.

Статистический анализ данных включал методы статистического описания и проверки статистических гипотез. В пределах каждой выборки определяли среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение, ошибку среднего. При условии соответствия нормальному распределению оценку достоверности различий осуществляли с использованием t -критерия Стьюдента и Т-теста с помощью программ SPSS Sigma Stat 3.5, SPSS 13.0 и в электронных таблицах Excel.

Результаты и обсуждение

Обнаружили, что до операции и в послеоперационный период у больных ИБС регистрируют изменения состояния плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови (см. таблицу) — это свидетельствовало о развитии феномена начального (рис. 1) и терминального (рис. 2) блеббинга плазматической мембраны. Максимальную частоту изменений плазматической мембраны лимфоцитов регистрировали в 1-е сутки после операции, что соответствовало пику увеличения концентрации ИЛ-6 и ФНО- α . На 2-е сутки после операции частота блеббинга уменьшалась параллельно с некоторым снижением уровня цитокинов.

Дальнейший анализ результатов исследования показал, что частота блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов еще до операции выше у пациентов старше 65 лет, по сравнению с обследованными в возрасте до 50 лет. Так, частота начального блеббинга составила 14,7 $\pm$ 1,8 и 9,7 $\pm$ 1% ($p < 0,05$). Аналогичная тенденция была характерна для частоты терминального блеббинга: 7,8 $\pm$ 1,7 и 4,7 $\pm$ 0,9%. После операций изменения плазматической мембраны лимфоцитов перифери-

ческой крови в виде терминального блеббинга в выделенных возрастных группах были однонаправленны, но более выражены у больных в возрасте до 50 лет: с 4,7 $\pm$ 0,9 до 11,0 $\pm$ 2,2% ($p < 0,05$), что составило увеличение на 57,3% от исходного уровня, принятого за 100%. В группе пациентов старше 65 лет терминальный блеббинг проявлял тенденцию к приросту с 7,8 $\pm$ 1,7 до 11,9 $\pm$ 2,2%, что составило 33,6% от исходного уровня.

Далее отметили, что при частоте начального блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов до операции менее 8% послеоперационный койко-день составил 13,2 $\pm$ 1,3 суток, а при частоте свыше 15% — 16,1 $\pm$ 1,2 сут. Аналогичным образом при исходной частоте терминального блеббинга менее 4% реанимационный койко-день составил 2,5 $\pm$ 0,2 суток, а при частоте свыше 12% — 4,75 $\pm$ 0,9 сут.

Повышенная частота блеббинга плазматической мембраны у кардиохирургических больных ИБС свидетельствует об изменениях в лимфоцитах периферической крови и нарушении мембранных процессов, которые могут неблагоприятно влиять на течение послеоперационного периода. Выраженность данного процесса индивидуальна и, возможно, зависит от выраженности атеросклеротического процесса, наличия мультифокального поражения сосудов, наличия нестабильных атеросклеротических бляшек, нестабильной стенокардии, сопутствующей патологии, а также объема оперативного вмешательства.

Блеббинг клеточной мембраны — одно из ключевых проявлений апоптоза. Вместе с тем, блеббинг может развиваться и на начальных этапах некроза. Он также

является морфологическим свидетельством повреждения клетки, не приводящего к клеточной гибели, вызванного гипоксией, интоксикацией, действием вирусов [15]. Поверхностная структура клеток регулируется динамическими взаимодействиями между белками цитоскелета и мембраной. Непосредственное повреждение этих компонентов (окисление белков, формирование межбелковых сшивок, изменение белково-липидных взаимодействий, перекисное окисление липидов) индуцирует блеббинг. В этих процессах ключевыми событиями являются нарушения контактов между актином и миозином, дезагрегация микротрубочек, локальная деполимеризация актина, изменение фосфорилирования белков цитоскелета митоген- и стресс-активируемыми протеинкиназами, а также киназой легкой цепи миозина [16–18]. Следствием разрушения контактов между плазматической мембраной и белками цитоскелета является компартментализация цитоплазмы.

Патофизиологическое значение блеббинга определяется не только возможным разрушением клеток, но и попаданием во внеклеточное пространство мембранных микрочастиц, представляющих собой фрагменты клеточных везикул, и обеспечивающих, по современным представлениям, межклеточные взаимодействия, в том числе между клетками крови и эндотелиоцитами при развитии эндотелиальной дисфункции и СВР [14, 19, 20]. Патофизиологические последствия блеббинга связаны с увеличением периферического сосудистого

сопротивления (в случае блеббинга эндотелиальных клеток), обструкцией канальцев почек (при блеббинге клеток канальцев) [21, 22]. Все это определяет интерес к процессам, протекающим в плазматической мембране клеток, и межклеточным взаимодействиям при развитии СВР, осложненной органной дисфункцией.

Выделение лимфоцитов периферической крови по градиенту плотности, определение повреждения плазматической мембраны при фазово-контрастной микроскопии и регистрация выраженности нарушений мембран-цитоскелетных взаимоотношений может явиться достаточно чувствительным методом диагностики СВР при критических состояниях.

К достоинствам предлагаемой методики можно также отнести возможность диагностики и оценки динамики СВР без использования крайне дорогостоящего оборудования и расходных материалов.

Заключение

Динамические изменения клеточных мембран, проявляющиеся блеббингом лимфоцитов периферической крови, отражают развитие СВР при АКШ в условиях ИК. Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов у больных ИБС имеет различную выраженность: от начальной до терминальной. Определение блеббинга лимфоцитов периферической крови позволяет не только регистрировать СВР, но и оценивать ее динамику.

Литература

1. «Consensus conference of American college of chest physicians/society critical care medicine (ACCP/SCCM)» Crit. Care Med. 1992; 20: 864–874.
2. Гельфанд Б. Р., Филимонов М. И., Бражник Т. Б. и соавт. Прокальцитонин: новый лабораторный диагностический маркер сепсиса и гнойно-септических осложнений в хирургии. Вестн. интенс. терапии 2003; 1 (2).
3. Мороз В. В., Лукач В. Н., Шифман Е. М. и соавт. Сепсис. Петрозаводск; 2004.
4. Руднов В. А. Сепсис: современный взгляд на проблему. Клиническая антимикробная химиотерапия 2000; 1: 2–7.
5. Савельев В. С., Гельфанд Б. Р. Сепсис в современной медицине. Рекомендации по классификации, диагностике, профилактике и лечению сепсиса. В кн.: Сепсис в начале XXI века. М.: Литтерра; 2006.
6. Rothenburger M., Markewitz A., Lenz T. et al. Detection of acute phase response and infection. The role of procalcitonin and C-reactive protein. Clin. Chem. Lab. Med. 1999; 37 (3): 275–279.
7. Reinhart K., Meisner M., Hartog C. et al. Diagnosis of sepsis: novel and conventional parameters. Advances in Sepsis 2001; 1 (2): 42–51.
8. Domina L. V., Ivanova O. Y., Pletushkina O. Y. et al. Marginal blebbing during the early stages of TNF-induced apoptosis indicates alterations in actomyosin contractility. Cell Biol. Int. 2004; 28 (6): 471–475.
9. Corp van M. A. R. Broers J. L. V., Reutelingsperger Ch. P. M. et al. Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis. AJR Cell Physiology 1999; 277 (1): 20–28.
10. Hagmann J., Burger M. M., Dagan D. Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. J. Cell Biochem. 1999; 73: 488–499.
11. Михуткина С. В., Салмина А. Б., Сычев А. В. и соавт. Блеббинг плазматической мембраны тимоцитов и апоптоз связаны с нарушением емкостного входа Ca^{2+} в клетки. Бюл. эксперим. биологии и медицины 2004; 137 (6): 628–632.
12. Ghibelli L., Nosseri C., Coppola S. et al. The increase in H_2O_2 -induced apoptosis by ADP-ribosylation inhibitors is related to cell blebbing. Exp. Cell Res. 1995; 221 (2): 470–477.
13. Dai J., Sheetz M. P. Membrane tether formation from blebbing cells. Biophys. J. 1999; 77 (6): 3363–3370.
14. Sims P. J., Wiedmer T., Esmon C. T. et al. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. J. Biol. Chem. 1989; 264 (29): 17049–17057.
15. Gores G. J., Herman B., Lemasters J. J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. Hepatology 1990; 11 (4): 690–698.
16. Huot J., Houle F., Rousseau S. et al. SAPK2/p38-dependent F-Actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. J. Cell Biol. 1998; 143: 1361.
17. Mills J. C., Stone N. L., Erhardt J., Pittman R. N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. J. Cell Biol. 1998; 140 (3): 627–636a.
18. Mitchison T. J., Cramer L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell 1996; 84 (3): 371–379.
19. Forlow S. B., McEver R. P., Nollert M. U. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. Blood 2000; 95 (4): 1317–1323.
20. VanWijk M. J., VanBavel E., Sturk A., Nieuweland R. Microparticles in cardiovascular diseases. Cardiovas. Res. 2003; 59: 277–287.
21. Gores G. J., Herman B., Lemasters J. J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. Hepatology 1990; 11 (4): 658–670.
22. Miyoshi H., Umeshita K., Sakon M. et al. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. Gastroenterology 1996; 110 (6): 1897–1904.

Поступила 19.09.08