

УДК 616.98:579.861

©Коллектив авторов

ЭЛАСТАЗА ЛЕЙКОЦИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ И ЕЁ РОЛЬ В НАРУШЕНИИ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В.Л. ДОЦЕНКО¹, А.Я. СПИРИНА², А.И. МАКИНСКИЙ², Е.А. НЕШКОВА¹,
Ю.Е. ЁРШИКОВА¹, Г.А. ЯРОВАЯ¹

¹ Российская Медицинская Академия Последипломного образования,
ул. Баррикадная, 2, Москва 123836, тел/факс (095) 945-24-15.
Эл. почта : acadbio@orc.ru

² НИИ фтизиопульмонологии, ММА им. И.М.Сеченова, ул. Достоевского, 4,
Москва 103030, тел. (095) 281-96-03.

Исследованы 53 больных туберкулезом легких, разделенных на 3 группы по интенсивности и форме заболевания. В крови больных определены лейкоцитарная эластаза, количество катионных белков в нейтрофилах, уровни активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина. У 28 больных из этих групп произведена тромбоэластография, определены показатели активности свертывающей и фибринолитической систем, в том числе активность антитромбина (АТ) III. Исследования показали высокий уровень эластазы (в 6 раз выше нормального) в плазме крови больных в 1-й группе с наиболее острым течением туберкулезного процесса. В этой же группе наблюдалась выраженная внутрисосудистая активация системы гемостаза, происходящая на фоне значительного (до 60% от нормы) понижения активности АТ III. Полученные результаты свидетельствуют о том, что, количество лейкоцитарной эластазы в плазме крови больного характеризует остроту туберкулезного процесса в легких, а дегрануляционная активность нейтрофилов и освобождение эластазы в плазму крови являются причиной антитромбиновой недостаточности и повышения внутрисосудистой свертываемости крови.

Ключевые слова: лейкоцитарная эластаза, туберкулез, активация нейтрофилов, воспаление, дефицит АТ III, тромбо-геморрагические осложнения.

ВВЕДЕНИЕ. Механизм активации эффекторных фагоцитарных клеток при туберкулезе до сих пор не до конца исследован. Показано, что при микобактериальном заражении в бронхоальвеолярном лаваже повышается концентрация медиаторов воспаления: фактора некроза опухоли ($\text{TNF}\alpha$) и

увеличивается концентрация нейтрофильной эластазы. замечено, что в экссудате при туберкулезе легких повышение концентрации лейкоцитарной эластазы коррелирует с концентрацией IL-8 и, по всей вероятности, именно этот интерлейкин ответственен за активацию и дегрануляцию нейтрофилов [2,3]. В то же время процессы хемотаксиса и активирования нейтрофилов, а также их способность к фагоцитозу и метаболическому взрыву, при туберкулезе отличаются от соответствующих клеточных характеристик в контроле. Это может быть связано с уменьшением количества рецепторов к IL-8 (IL-8RA и IL-8RB) на мембранах нейтрофилов больных [4,5]. Роль активных нейтрофилов в уничтожении микобактерий туберкулеза особенно велика, если принять во внимание данные нескольких лабораторий об индукции макрофагального апоптоза данной бактериальной флорой [6-8].

Однако дегрануляционная активность нейтрофилов приводит не только к уничтожению микобактерий [2,9], но и к значительному повреждению ткани легких [10], а также к инаktivации и деградации ключевых белков, регулирующих процессы свертывания в крови больного (см. [11] и приведенную там литературу).

Учитывая сказанное выше, мы поставили целью изучить, во-первых, дегрануляционную активность нейтрофилов (по активности лейкоцитарной эластазы в плазме крови больных) при различных формах туберкулеза легких и, во-вторых, выявить степень и возможные причины нарушений процессов свертывания крови, определяющих тромбогеморрагические осложнения у фтизиохирургических больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Обследованы 53 больных с различными формами туберкулеза без выявленных заболеваний воспалительного характера. Больные были разделены на 3 группы в зависимости от особенностей течения туберкулезного процесса. Первую группу составили больные (21 человек) с процессами преимущественно экссудативного характера при остром и подостром течении заболевания. При этом у 9 больных этой группы имел место фиброзно-кавернозный туберкулез легких в фазе инфильтрации, у 12 - инфильтративный туберкулез в фазе распада. Вторую группу составили 22 больных с процессами преимущественно продуктивного характера с торпидным течением заболевания. В этой группе признаки туберкулезной интоксикации были минимальны. Рентгенологически в легких определялись очаги, туберкулемы или незначительные по протяженности инфильтративные изменения ткани легких с признаками отграничения. В данную группу вошли нелеченные больные очаговым туберкулезом легких (7 человек), туберкулемами (4 человека), инфильтративным туберкулезом легких (11 человек). У 7 из 22 больных была выявлена в легких небольшая полость распада ткани. Третью группу составили 10 больных, обследованных после 5-6-месячной комплексной терапии. До лечения у 8 человек из этой группы был выявлен остroteкущий инфильтративный туберкулез легких, у 2 пациентов - фиброзно-кавернозный туберкулез в фазе инфильтрации. На момент обследования у больных отсутствовала интоксикация, наблюдалась нормализация гемограммы при значительном рассасывании инфильтративных изменений в легочной ткани и ликвидации деструктивных очагов.

Об активности лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) в плазме крови больных судили при помощи двух методов, позволяющих осуществить частичный или полный доступ субстрата *терт*-бутоксикарбонил-Ала-пара-нитрофенилового

эфира (BOC-Ala-ONp) к активному центру фермента, находящегося в комплексе с α_1 -протеиназным ингибитором (α_1 -ПИ), и определение скорости его расщепления. Первый метод был предложен Visser и Blout в 1972 году для определения активности очищенной лейкоцитарной эластазы [12] и затем применен Парфенковой с соавт. в 1989 году для определения так называемой «эластазоподобной» активности в плазме крови [13]. Второй метод предложен соавторами данной статьи - сотрудниками кафедры биохимии, ЦОЛИУ врачей (в настоящее время РМА последиplomного образования) в 1994 году для полного выявления активности лейкоцитарной эластазы, находящейся в комплексе с α_1 -ПИ [14].

Содержание в нейтрофилах катионных белков, реализующих бактерицидное действие при воспалении, определяли, окрашивая их зеленым прочным с последующим измерением оптической плотности образцов нейтрофилов.

Активность сывороточных α_1 -ПИ и α_2 -макроглобулина (α_2 -М) определяли энзиматическим методом Нартиковой и Пасхиной [15].

Активность системы гемостаза оценивали следующими унифицированными методами: тромбоэластографией (ТЭГ) цитратной крови, определением концентрации фибриногена, выполнением этанолового теста, определением концентрации продуктов деградации фибрина и фибриногена (ПДФ) с помощью иммуноферментной тест-системы ЦНИИ вакцин и сывороток. Активность АТ III определяли с помощью Antithrombin- kit Behring (Германия).

За норму приняты результаты использования упомянутых выше методов при обследовании 16 практически здоровых людей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования образцов крови показали, что у больных туберкулезом с процессами преимущественно экссудативного характера и острым или подострым течением заболевания (1-я группа больных) имело место примерно шестикратное повышение активности лейкоцитарной эластазы в сыворотке крови (табл. 1). При этом «эластазоподобная» активность увеличивалась только в 1,3 раза. О значительном повышении активности нейтрофилов свидетельствовало и количество катионных белков, выявленное внутри клеток (с 4 до 27 усл.ед.).

У больных с процессами преимущественно продуктивного характера (2-я группа) степень активации нейтрофилов была значительно ниже, чем у больных 1-й группы: активность ЛЭ превышала нормальную лишь в 3,4 раза. Количество катионных белков в нейтрофилах этой группы ниже, чем у больных 1-й группы (11,0 по сравнению с 27 усл.ед.), что свидетельствовало о их более низкой бактерицидной активности.

У больных 3-й группы дегрануляционная и бактерицидная (по количеству катионных белков) активность нейтрофилов была значительно ниже, чем у больных 1-й и 2-й групп. Активность ЛЭ лишь в 2,8 раза превышала нормальную, а «эластазоподобная» практически не отличалась от нормальных значений. Количество катионных белков в нейтрофилах также заметно уменьшалось и составляло лишь 8 усл.ед.

Уровень активности основного ингибитора ЛЭ - α_1 -ПИ, в плазме крови практически не отличался от нормального во всех трех группах больных, хотя возможно, что определяемый уровень являлся результатом высокого потребления ингибитора эластазой и другими протеолитическими ферментами плазмы крови и клеток при значительном приросте его концентрации в плазме

как белка острой фазы. Повышение среднего уровня активности α_1 -ПИ в плазме крови больных 3-й группы с относительно низкой активностью ЛЭ косвенно подтверждает это предположение.

Таблица 1. Бактерицидные белки нейтрофилов и ингибиторы эластазы сыворотки крови у больных туберкулезом легких.

Показатели	Группы обследованных			
	Здоровые лица (n=16)	1 группа (n=21)	2 группа (n=22)	3 группа (n=10)
Эластаза нейтрофилов в сыворотке крови (Ед/мл)	$1,99 \pm 0,17$	$12,4 \pm 0,82^*$	$6,8 \pm 1,17^{**}$	$5,6 \pm 0,47^{**}$
Эластазоподобная активность сыворотки (МЕ/мл)	$160 \pm 5,85$	$209 \pm 15,52^*$	$261 \pm 9,37^*$	$179 \pm 12,41$
Катионные белки в нейтрофилах (усл.ед.)	$4,0 \pm 0,21$	$27,0 \pm 2,22^*$	$11 \pm 0,67^{**}$	$8,0 \pm 0,36^{**}$
α_1 -ПИ (ИЕ/мл)	$29,0 \pm 0,28$	$33,3 \pm 2,78$	$25,1 \pm 2,34$	$34,7 \pm 2,38^*$
α_2 -М (ИЕ/мл)	$4,8 \pm 0,10$	$4,3 \pm 0,46$	$4,1 \pm 0,33^*$	$3,9 \pm 0,31^*$

Примечание: n — число обследованных; * — достоверные изменения по сравнению с нормой, ** — достоверные изменения по сравнению с показателями больных 1 группы. Различия считали статистически достоверными при $P < 0,05$.

Уровень активности второго ингибитора протеолитических ферментов, α_2 -М, падал во всех трех группах больных, что являлось следствием высокой концентрации активных протеолитических ферментов как плазменного, так и клеточного происхождения в крови больных туберкулезом.

Таким образом, наиболее выраженная воспалительная реакция с высокой дегрануляционной активностью нейтрофилов наблюдалась у больных 1-й группы с экссудативными процессами в легких и острым или подострым течением заболевания.

Характер дегрануляционных процессов у больных 2-й группы менее активен, чем в 1-й группе, что обуславливает появление в плазме лишь 50% активности ЛЭ, зарегистрированной в 1-й группе. По прошествии 5-6 месяцев лечения воспалительная реакция в легочной ткани сохранялась, хотя уровень ЛЭ падал более, чем в 2 раза, по сравнению с ЛЭ в 1-й группе (Табл. 1).

Изменения уровня «эластазоподобной» активности в плазме крови больных имели, в основном, ту же тенденцию снижения в 3-й группе, что и активность эластазы. При этом процент выявления активности фермента методом Visser и Blout колебался от 1,6 до 7% её действительной активности, выявленной методом Доценко и соавт. [14].

Высокая дегрануляционная активность и высокая концентрация ЛЭ (в комплексе с α_1 -ПИ) в плазме крови больных при тяжелых травмах, перитоните и сепсисе, по данным многих исследователей, коррелирует с возникновением диссеминированного внутрисосудистого свертывания и полиорганной

недостаточности (см. в [11] и приведенные там ссылки). Предполагают, что это связано с нарушением регуляции тромбообразования и фибринолиза, вследствие инактивации ключевых факторов регуляции агрегатного состояния крови [16,17].

Таблица 2. Показатели системы гемостаза и активность эластазы нейтрофилов в сыворотке крови у больных туберкулезом легких.

Показатели	Группы обследованных			
	Здоровые лица (n=16)	1 группа (n=9)	2 группа (n=9)	3 группа (n=10)
Показатели ТЭГ:				
г (мин)	7,2±0,29	5,3±0,27*	6,5±0,46	5,8±0,39*
к (мин)	4,2±0,20	2,3±0,26*	2,9±0,31*	3,0±0,15*
mA (мм)	41,3±1,72	55,6±4,12*	48,0±3,61	44,4±3,28
Сi (усл.ед.)	3,6±0,20	7,6±0,83*	5,45±0,67*	5,2±0,49*
Е (усл.ед.)	73,2±4,80	148,8±26,61*	99,6±11,95*	85,2±11,76
ИТП (усл.ед.)	18,3±1,41	80,9±20,34*	41,8±9,22*	29,5±4,91*
Фибриноген (г/л)	2,4±0,08	4,2±0,56*	2,59±0,14	2,14±0,14
ЭП(%)	—	66,7	11,1	33,3
ПДФ(мкг/мл)	23,7±2,11	63,3±6,98*	25,0±1,62	25,6±2,37
АТ	99,3±3,66	61,2±2,94*	85,6±3,23*	84,5±3,71*
III (%)				
Эластаза нейтрофилов в сыворотке крови (ЕД/мл)	1,99±0,17	12,1±0,91*	6,5±0,56*	5,2±0,36*

Примечание: г - время реакции; к - время свертывания; mA-максимальная амплитуда; Сi- индекс коагуляции; Е-коэффициент эластичности сгустка; ИТП-индекс тромбодинамического потенциала; ЭП- частота положительных этаноловых проб; * -достоверные изменения ($P<0,05$) по сравнению с нормой; n - число обследованных.

Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о повышении активности процессов свертывания у больных всех 3-х обследованных групп. При этом наибольшие сдвиги в тромбоэластограмме отмечались у первой группы больных с наиболее высокой активностью лейкоцитарной эластазы. Из таблицы 2 видно, что у больных 1-й группы имело место резкая интенсификация процессов тромбообразования. Об этом свидетельствовало значительное уменьшение времени реакции и времени свертывания на ТЭГ, что сочеталось с повышением «структурной» свертываемости крови и подтверждалось достоверным повышением константы mA. Описанные изменения показателей обеспечили у больных данной группы резкое повышение сводных индексов (Сi, Е, ИТП). О повышении свертывания свидетельствовало также и появление в крови растворимых фибрин-мономерных комплексов (у 66,7 % больных) на фоне повышения концентрации фибриногена как белка острой фазы. Повышение свертывания происходило при значительном увеличении активности фибринолитических процессов: количество ПДФ у больных 1-й группы в 2,5 раза превышало соответствующий показатель у здоровых лиц.

Эти изменения в активности свертывания-фибринолиза, в большей мере выраженные у больных 1-й группы, могут быть охарактеризованы как признаки подострого синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Подтверждением этому выводу служит снижение активности АТ III до 61,2 %.

У больных 2-й группы (пациенты с процессами преимущественно продуктивного характера и торпидным характером заболевания) и у больных 3-й группы (обследованных через 5-6 месяцев эффективной терапии) внутрисосудистая активация системы гемостаза была менее выраженной при относительно высокой антитромбиновой активности (85,6 и 84,5 % во 2-й и 3-й группах, соответственно) (табл. 2). В отличие от больных 1-й группы не отмечено повышения «структурной» свертываемости крови. Не отличались от нормальных и уровни ПДФ у этих больных, значительно реже наблюдались положительные этаноловые пробы. Следует обратить внимание, что эти группы больных характеризовались значительно более низкой активностью эластазы в плазме крови.

На основании полученных результатов было показано, что между активностями эластазы и АТ III имеется высокая обратная корреляционная зависимость. Коэффициент корреляции между этими показателями составил $-0,84 \pm 0,12$.

Таким образом, высокая дегрануляционная активность нейтрофилов при всех исследованных формах туберкулеза легких приводит к появлению в плазме крови больных высокой концентрации комплекса лейкоцитарной эластазы с α_1 -ПИ. О присутствии комплекса в плазме крови больных мы судили по результатам двух методов, позволяющих обеспечить частичный или полный доступ субстрата к активному центру фермента и измерить скорость его расщепления. «Эластазоподобная» активность в плазме крови больных, измеренная методом, обеспечивающим неполный доступ субстрата к активному центру, составила не более 10% от активности, определенной вторым методом, позволяющим измерить полную активность эластазы [14]. При высоком содержании комплекса ЛЭ- α_1 -ПИ и полном отсутствии свободного фермента в плазме крови обследованных больных, тем не менее, отмечается инактивация основного регулятора процессов свертывания крови - антитромбина III. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты исследования тромбогеморрагических нарушений при тяжелых септических поражениях [11,18]. Как утверждает ряд исследователей, АТ III - это белок, быстро инактивируемый лейкоцитарной эластазой в условиях *in vitro*. Более того, процесс инактивации ускоряется в системе, содержащей гепарин [19,20].

Причины инактивации и/или деградации белков плазмы крови лейкоцитарной эластазой *in vivo* при нормальной или повышенной активности α_1 -ПИ до настоящего времени не до конца исследованы. Возможно, что в крови, в присутствии высокой концентрации плазменных белков, скорость ингибирования лейкоцитарной эластазы α_1 -ПИ во много раз снижается вследствие конкурентных взаимоотношений с другими белками за активный центр фермента. Это может обуславливать более длительный контакт свободной эластазы, освобождающейся при дегрануляции нейтрофила, с белками плазмы крови и их инактивацию. Недавно мы показали, что высокомолекулярный кининоген плазмы крови человека - один из компонентов контактной фазы свертывания крови, расщепляется лейкоцитарной эластазой в присутствии

концентрации α_1 -ПИ, в несколько раз превышающей молярную концентрацию эластазы [21].

Итак, на основании полученных результатов можно заключить: 1) у больных туберкулезом легких имеет место высокая дегрануляционная активность нейтрофилов, что приводит к значительному повышению в плазме крови концентрации эластазы в виде комплекса с α_1 -ПИ; 2) уровень плазменной эластазы отражает остроту туберкулезного процесса; 3) антитромбиновая недостаточность и инициируемый ею процесс внутрисосудистого свертывания у больных туберкулезом является прямым следствием инактивирующего действия лейкоцитарной эластазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamazaki Y., Kubo K., Sekiguchi M., Honda T. (1998) Eur. Respir. J., 11, 1227-1231.
2. Segura R.M., Alegre J., Varela E., Marti R. et al. (1998) Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157(5 Pt 1), 1565-1572.
3. Meddows T.S., Martin D.J., Tiemessen C.T. (1999) Clin. Diagn. Lab. Immunol., 6, 345-351.
4. Meddows T.S., Martin D.J., Tiemessen C.T. (1998) J. Infect. Dis., 177, 921-930.
5. Shalekoff S., Tiemessen C.T., Gray C.M., Martin D.J. (1998) Clin. Diagn. Lab. Immunol., 5, 41-44.
6. Bermudez L.E., Petrofsky M., Stevens P. (1998) Immunology, 94, 297-303.
7. Majeed M., Perskvist N., Ernst J.D., Orselius K., Stendahl O. (1998) Microb. Pathol., 24, 309-320.
8. Kornfeld H., Mancino G., Colizzi V. (1999) Cell Death Differ., 6, 71-78.
9. Borelli V., Banfi E., Perrotta M.G., Zabucchi G. (1999) Infect. Immunol., 67, 4149-4152.
10. Saunders B.M., Frank A.A., Cooper A.M., Orme I.M. (1998) Infect. Immun., 66, 5508-5514.
11. Jochum M., Machleidt W., Fritz H. (1993) In: Handbook of Mediators in Septic Shock. (A. Neugebauer, J.W. Holaday, H. Fritz, Eds.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp.335-361.
12. Visser L., Blout E.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 268, 257-260.
13. Парфенкова Г.А., Оглоблина О.Г., Домба Г.Ю. (1989) Кардиология, 29, 94-96.
14. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Яровая Г.А. (1994) Вопр. мед. химии, 40 (3), 20-25.
15. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. (1979) Вопр. мед. химии, 25, 499-502.
16. Schramm W., Spannagl M. (1991) In: Posttraumatic Acute Respiratory Distress Syndrome. (Ed. Sturm J.A.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 75-83.
17. Machovich R., Owen W.G. (1990) Blood Coag. Fibrinol., 1, 79-85.
18. Seitz R., Wolf M., Egbring R., Radtke K.P., et al. (1987) Eur. J. Haematol., 38, 231-237.
19. Jordan R.E., Nelson R.M., Kilpatrick J., Newgren J.O., Esmon P.C., Fournel M.A. (1989) Am. J. Med., 87 (Suppl. 3 B), 19-23.

20. Jochum M., Lander S., Heimbürger N., Fritz H. (1981) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **362**, 103-110.
21. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Ругнес Э., Йохансен Х., Яровая Г.А. (2000) Вopr. мед. химии, **46**, в печати.

Поступила 21.06.99

LEUKOCYTE ELASTASE IN PLASMA OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS AND ITS PART IN BLOOD COAGULATION DISTURBANCES

V.L. DOTSENKO¹, A.YA. SPIRINA², A.I. MAKINSKY², E.A. NESHKOVA¹, YU.E. YORSHIKOVA¹, G.A. YAROVAYA¹

¹ Russian Medical Academy for Postgraduate Education, Dept. of Biochem., Barrikadnaya, 2, Moscow 123836. Tel/fax: (095) 945 24 15, e-mail: acadbio@orc.ru

² Research Institute for Phthisiopulmonology, Moscow Medical I. Sechenov's Academy, ul. Dostoyevsky, 4, Moscow 103030.
Tel: (095) 281 96 03

53 patients with lung tuberculosis were divided in 3 groups in accordance with severity of disease. Leukocyte elastase, cationic proteins in neutrophils, activities of α_1 -proteinase and α_2 -macroglobulin were determined in patients' plasma. Thromboelastographic, coagulating, fibrinolytic indices, and antithrombin III activity were also determined in 28 patients of all 3 groups.

Results demonstrated the high level of leukocyte elastase (6-fold more than normal) in plasma of patients with acute tuberculosis process. This group of patients demonstrated activation of intravascular coagulation proceeded on the background of significant decrease (up to 60%) of AT III activity. **Conclusion:** Acuity and severity of tuberculosis process in lung may be characterized by high activity of leukocyte elastase. Degranulating activity of neutrophils and releasing of elastase are the reason of AT III deficiency and increasing of intravascular coagulating activity in tuberculosis patients.

Key words: leukocyte elastase, tuberculosis, activation of neutrophils, inflammation, AT III deficiency, thrombohaemorrhage complications