

УДК 616.24-001-008+616-092

Л. В. Анисимова

ГУ «Крымский государственный
медицинский университет имени С.И.
Гергиевского МОЗ Украины»

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОТЕИНАЗ- ИНГИБИТОРНОМ БАЛАНСЕ БРОНХО- АЛЬВЕОЛЯРНОГО СМЫВА КАК МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СИНДРОМА ПОЛИОРГАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Ключевые слова: полиорганная недостаточность, синдром острого повреждения легких, протеиназ-ингибиторная система, патогенез

Резюме. Проведенные экспериментальные исследования показали, что характерной реакцией на развитие патологии в легких в процессе формирования полиорганной недостаточности является дисбаланс в протеиназ-ингибиторной системе бронхоальвеолярного смыва независимо от этиологического фактора. Таким образом, характер и степень выраженности локальных изменений протеиназ и их ингибиторов в легких можно использовать в качестве эффективного прогностического маркера не только развития синдрома острого повреждения легких, но и формирования синдрома полиорганной недостаточности в целом.

Введение

Впервые термин “полиорганная недостаточность” применен A.S. Baue в 1975 г. В своей статье он сформулировал это состояние так: «Множественная, прогрессирующая, или последовательная органная недостаточность: синдром 1970-х годов» [8]. В настоящее время под термином синдром полиорганной недостаточности (СПОН) понимают универсальное поражение всех органов и тканей агрессивными медиаторами критического состояния с преобладанием симптомов той или иной органной недостаточности.

Как правило, формирование СПОН оценивают по нарушению функционального состояния в шести ключевых органах и системах: легкие, сердечно-сосудистая система, почки, печень, свертывающая система и центральная нервная система. При СПОН поражение систем органов происходит одновременно, однако клинические проявления имеют определенную последовательность.

Согласно данным современных исследований, при критических состояниях одним из первых органов-мишеней, которые поддаются повреждению, являются легкие с развитием синдрома острого повреждения легких (СОПЛ) [7]. СОПЛ имеет многофакторный характер патогенеза и многокомпонентность нарушений структуры и функций легких, полиморфную клиническую симптоматику с отсутствием четких диагностических критериев. Одной из основных причин СОПЛ считают не прямое повреждение альвео-

лярной мембраны в результате нарушений микроциркуляции [3]. При этом именно сдвиги баланса вазоактивных веществ, которые влияют на микроциркуляцию в легких, имеют первостепенное значение [6].

Таким образом, можно предположить, что степень выраженности системных проявлений в процессе формирования СПОН во многом зависит от местных изменений. В связи с этим интересно проследить, как активность компонентов неспецифической протеиназ-ингибиторной системы влияет на развитие СОПЛ.

Цель исследования

Сравнить реакцию неспецифических протеиназ и их ингибиторов в бронхоальвеолярном смыве в процессе формирования СПОН при действии различных этиологических факторов.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проведены на 56 белых крысах-самцах линии “Wistar” массой 180-210 г в соответствии с принципами биоэтики.

Формирование СПОН проводили путем моделирования двух экстремальных клинических состояний: синдрома ишемии-реперфузии (СИР) и острого разлитого перитонита (ОРП). СИР моделировали путём наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 часов. Ширина пережатия тканей составила 2-3 мм. Показателем правильности

наложения жгута являлось отсутствие отёка конечностей и бледность их окраски. Реваскуляризация производилась одномоментно путём рассечения жгутов через 6 часов после их наложения [1]. ОРП вызвали путем внутрибрюшинного введения в брюшную полость 1 мл 10% гомогенной каловой суспензии на 100г массы тела животного [4].

Эвтаназию животных осуществляли под тиопенталовым наркозом путём декапитации через 12 и 24 часа после реперфузии (n=12), и через 24 и 48 часов после введения каловой суспензии (n=10). В качестве контроля служила группа интактных животных (n=12).

Бронхо-альвеолярный смыв (БАС), получали путем трехкратного промывания легких через трахею физиологическим раствором [2].

Определение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы в БАС проводили с использованием энзиматических методов [5] на спектрофотометре "Biomat 5» (Великобритания). Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N-6-Benzoil-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE) (Sigma). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата Boc-L-alanine-4-nitrophenil ester (Boc-Ala-ONp) (Sigma). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ (АТА) проводили на основании торможения расщепления трипсином BAEE. Аналогично определялась активность кислотостабильных ингибиторов (КСИ) после предварительной подготовки сыворотки путём прогревания в кислой среде. Общий белок исследовали спектрофотометрическим методом по Лоури.

Статистическая обработка полученных данных проведена с применением методов вариационной статистики с вычислением средних вели-

чин (M), оценкой вероятности расхождений (m), оценкой достоверности изменений с использованием t-критерия Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при $p < 0,05$.

Обсуждение результатов исследования

При развитии СПОН в ткани легких у всех экспериментальных животных через 24 часа определялись ранние гистологические признаки диффузного альвеолярного повреждения легких.

В группе экспериментальных животных с моделированием СИР превалировали признаки нарушения кровообращения в виде полнокровия сосудов разного калибра, явлений стаза и сладжа, очагами периваскулярных и внутриальвеолярных кровоизлияний. Часто обнаруживались фибриновые тромбы в альвеолярных капиллярах и легочных артериолах. Стенки альвеолярных капилляров при этом утолщенные, с наличием фибриноидного набухания. Наблюдался выраженный интраальвеолярный и интерстициальный отек. В некоторых альвеолах наблюдались формирующиеся гиалиновые мембраны, локализующиеся частично вдоль базальной мембраны альвеолярных перегородок с повреждением альвеолярного эпителия. В просвете альвеол отмечали десквамированные альвеолоциты и альвеолярные макрофаги. В интерстиции альвеолярных перегородок также обнаруживали редкие инфильтраты, состоящие преимущественно из лимфоцитов и макрофагов.

В группе экспериментальных животных с ОРП признаки диффузного альвеолярного повреждения были менее выражены с очаговыми проявлениями интраальвеолярного отека. Гемодинамические расстройства характеризовались полнокровием, явлениями стаза и сладжа. Однако фибриновые тромбы в легочных капиллярах отсутствовали. Фибриноидное набухание в стенках

Таблица

Изменение протеиназ-ингибиторной системы в БАС при экспериментальном СИР и ОРП (M±m)

Группа животных	ТПА	ЭПА	АТА	КСИ
	мкМ/мг*мин		мИЕ/мг	
Контроль N=12	12,52±1,09	45,64±3,58	141,5±14,02	110,15±2,12
СИР 12 часов N=12	28,12±2,15*	68,98±3,30*	108,15±1,93**	33,21±2,1**
СИР 24 часа N=12	19,00±1,45*	77,34±5,16*	98,51±7,24*	38,28±2,64**
ОРП 24 часа N=10	13,74±0,28	55,01±3,99	89,98±3,03**	143,93±5,3**
ОРП 48 часов N=10	15,37±1,64	62,47±1,2*	91,8±1,76**	126,98±8,2**

Примечание. звёздочками отмечена достоверность различий показателей (p) по отношению к контрольной группе животных (*p<0,01, ** p<0,01)

сосудов обнаруживались редко. Вокруг таких сосудов отмечалась геморрагическая и лимфоцитарная инфильтрация.

Таким образом, описанные морфологические изменения ткани легких в обеих экспериментальных группах, характеризовали наличие диффузного альвеолярного повреждения. Тем не менее, наиболее выраженные гемодинамические нарушения и некротические процессы в ткани легких наблюдались при развитии СИР, где органом-мишенью является хорошо васкуляризированная легочная ткань

Изучение и сопоставление состояния показателей протеиназ-ингибиторной системы при развитии СИР и ОРП позволило выявить некоторые особенности и закономерности. Исследование протеазной активности БАС выявило, что при моделировании СИР у животных через 12 часов после восстановления кровотока уровень ТПА был выше на 125% ($p < 0,001$), а через 24 часа - всего на 52% ($p < 0,001$) чем в группе контроля, которую составляли интактные животные (табл.). В то же время ЭПА в БАС у животных через 12 часов после восстановления кровотока увеличилась на 51% ($p < 0,001$). А через 24 часа уровень ЭПА был уже на 70% выше ($p < 0,001$) чем в группе интактных животных.

При моделировании ОРП ТПА в БАС также увеличивалась. Так в группе, которую составили животные с моделью ОРП после 24 часов от момента введения каловой суспензии, ТПА превышала на 10% контрольные значения, а уже через 48 часов ее уровень был выше на 23%, однако эти изменения были статистически недостоверны. ЭПА в БАС также увеличивалась при моделировании ОРП. Так у животных с моделью ОРП после 24 часов от момента введения каловой суспензии, ЭПА превышала на 20% контрольные значения, однако эти изменения были статистически недостоверны, а после 48 часов - на 37% ($p < 0,001$).

Таким образом, ЭПА в БАС прогрессивно увеличивалась относительно группы интактных животных в зависимости от продолжительности действия повреждающего фактора. ЭПА в БАС максимально увеличивалась в группе животных с СИР через 24 часа от момента начала восстановления кровотока ранее ишемизированных конечностей. Максимальный уровень ТПА наблюдался у животных, СИР через 12 часов после реперфузии и превышал контрольную группу более чем в 2 раза

Следует отметить, что рост активности протеиназ сопровождался снижением ингибиторного потенциала. Исследования антипротеазной ак-

тивности в БАС при моделировании СИР показали, что у экспериментальных животных через 12 часов после восстановления кровотока уровень АТА снизился на 23,6% ($p < 0,001$), а через 24 часа - на 30,4% ($p < 0,01$) относительно контрольной группы (табл. 1). Также снижалась активность КСИ. Так в группе животных с СИР через 12 часов после реперфузии КСИ в БАС снизились на 70% ($p < 0,001$), а через 24 часа - на 65% ($p < 0,001$) относительно интактной группы животных.

При моделировании ОРП у экспериментальных животных после 24 часов от момента введения каловой суспензии АТА в БАС уменьшилась относительно контроля на 36,4% ($p < 0,001$), а через 48 часов - на 35% ($p < 0,001$). В то же время КСИ в БАС относительно контрольной группы увеличились у животных после 24 часов от момента введения каловой суспензии на 31% ($p < 0,001$), а после 48 часов - на 15% ($p < 0,001$).

Исследование ингибиторной активности БАС показали, что АТА у животных с ОРП через 24 и 48 часов от момента введения каловой суспензии была практически одинакова.

Изменение активности КСИ в БАС у животных с моделями СИР и ОРП имело разнонаправленную динамику, что, по-видимому, зависело от этиологического фактора. Так при моделировании СИР наблюдалось снижение КСИ в БАС максимальное угнетение их активности относительно контроля выявлено у животных, которые перенесли шестичасовую ишемию, осложненную двенадцатичасовой реперфузией. При моделировании ОРП активность КСИ в БАС увеличивалась относительно контрольной группы, ее максимальный уровень наблюдался у животных через 24 часа от момента введения каловой суспензии.

Как видно из представленных данных характерной реакцией на развитие патологии в легких в процессе формирования СПОН является выраженной прогрессирующее повышение эластазоподобных протеиназ БАС, обладающих высоким деструктивным потенциалом, и угнетением антитриптической активности независимо от этиологического фактора. Снижение антитриптической активности говорит об угнетении протекторной антипротеиназной функции и неспособности компенсировать агрессивное деструктивное действие протеиназ, что может быть одним из важных факторов повреждения легких в процессе развития СОПЛ способствует повреждению легочной ткани.

Таким образом, характер и степень выраженности локальных изменений протеиназ и их ингибиторов в легких можно использовать в каче-

стве эффективного прогностического маркера не только развития СОПЛ, но и формирования синдрома полиорганной недостаточности в целом.

Выводы

1. Прогрессирующее повышение ЭПА в БАС на фоне параллельного угнетения антитриптической активности отражает степень вовлечения легких в процесс формирования СПОН. 2. Развивающийся дисбаланс протеиназ-ингибиторной системы в БАС может свидетельствовать о тяжести течения патологии в легких и указывать на степень деструктивных повреждений. 3. Определение показателей активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в БАС может быть эффективным маркером формирования СПОН независимо от этиологического фактора.

Литература. 1. Алиев Л.Л. Патоморфологические изменения в органах крыс при моделировании реперфузионного синдрома / Л.Л. Алиев, В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, И.И. Фомочкина // Загальна патологія та патологічна фізіологія. - 2010. - Т. 5, № 3. - С.144-150. 2. Биркун А. А. Сурфактант легких / А. А. Биркун, Е. Н. Нестеров, Г. В. Кобозев. - Киев: Здоров'я, 1981. - 160 с. 3. Войтковская К. С. Синдром острого повреждения легких: определение, патогенез, экспериментальные модели и роль мезенхимальных стволовых клеток при лечении животных / К.С. Войтковская, А.Л. Черняев // Вестник современной клинической медицины. - 2012. - Т.5, №2. - С.60-67. 4. Гостищев В. К. Перитонит / В. К. Гостищев, В. П. Сажин, А. Л. Авдovenko. - М.: ГЭОТАР – МЕД, – 2002. – 240с. 5. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (методичні рекомендації) / А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, П.Ф. Семенець [та ін.] – Київ 2010 - 28с. 6. Фомочкина И.И. Патогенетическое значение протеиназ-ингибиторной системы в развитии локальной и системной патологии / И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин // Патологія. – 2012. – №2 (25). – С. 50–54. 7. Antiplatelet Therapy Is Associated With Decreased Transfusion-Associated Risk of Lung Dysfunction, Multiple Organ Failure, and Mortality in Trauma Patients / J. N. Harr, E. E. Moore, J. Johnson [et al] // Critical Care Medicine.- 2013. – Vol. 41.- P. 399–404. 8. Baue A. E. Multiple, progressive, or sequential systems failure: A syndrome of the 1970s. / A. E. Baue // Arch. Surg. - 1975.- Vol.10.-P.779-781.

ЗМІНИ В ПРОТЕЇНАЗ-ІНГІБІТОРНОМУ БАЛАНСІ БРОНХО-АЛЬВЕОЛЯРНОГО ЗМИВУ ЯК МАРКЕР ПОШКОДЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ ПРИ ФОРМУВАННІ СИНДРОМУ ПОЛІОРГАННОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Л. В. Анисимова

Резюме. Проведені експериментальні дослідження показали, що характерною реакцією на розвиток патології в легенях у процесі формування поліорганної недостатності є дисбаланс у протеїназ-інгібіторній системі бронхоальвеолярного змиву незалежно від етіологічного фактора. Таким чином, характер і ступінь виразності локальних змін протеїназ та їх інгібіторів у легенях можна використовувати в якості ефективного прогностичного маркера не тільки розвитку синдрому гострого пошкодження легень, а й формування синдрому поліорганної недостатності в цілому.

Ключові слова: поліорганна недостатність, синдром гострого пошкодження легень, протеїназ-інгібіторна система, патогенез

CHANGES IN PROTEINASE - INHIBITORY BALANCE OF BRONCHO- ALVEOLAR LAVAGE AS A MARKER OF LUNG INJURY IN THE FORMATION OF POLY-ORGANIC INSUFFICIENCY SYNDROME

L. V. Anysymova

Abstract. The carried out experimental studies have shown that a characteristic reaction to the development of the pathology in the lungs during the formation of polyorganic insufficiency syndrome is the imbalance in proteinase-inhibitory system of bronchoalveolar lavage independently of etiology Thus the character and severity of evidency of proteinases local changes and their inhibitors in the lungs can be used as an effective prognostic marker not only of the development of acute lung injury, but also the formation of polyorganic insufficiency syndrome as a whole.

Keywords: polyorganic insufficiency syndrome, acute lung injury, proteinase-inhibitory system, pathogenesis.

S E “S.I.Georgievsky Crimean State Medical University” of MPH of Ukraine

Clin. and experim. pathol.- 2013.- Vol.12, №4 (46).-P.20-23.

Надійшла до редакції 01.12.2013

Рецензент – проф. О.І.Федів

© Л. В. Анисимова, 2013