

УДК:616.24-001-008+616-092

Л.В. Анисимова**НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОТЕИНАЗЫ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РАЗВИТИЯ СИНДРОМА ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ***ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»*

Анисимова Л.В. Неспецифические протеиназы как диагностический и прогностический маркер развития синдрома острого повреждения легких // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. 129-131.

В статье представлен анализ состояния неспецифических протеиназ сыворотки крови и бронхоальвеолярного смыва у крыс с различными моделями критических состояний, приводящих к развитию синдрома острого повреждения легких (СОПЛ). Установлено, что при развитии СОПЛ происходит рост активности неспецифических протеиназ, как на системном, так и на местном уровнях независимо от этиологического фактора. Полученные данные свидетельствуют об истощении защитно-компенсаторных механизмов организма, что может быть ведущим фактором изменений в легких и формирования СОПЛ.

Ключевые слова: протеиназы, синдром острого повреждения легких, патогенез, полиорганная недостаточность

Анисимова Л.В. Неспецифічні протеїнази як діагностичний та прогностичний маркер розвитку синдрому гострого ушкодження легень // Український медичний альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. 129-131.

У статті наведено аналіз стану неспецифічних протеїназ сироватки крові та бронхоальвеолярного змиву у щурів з різними моделями критичних станів, що призводять до розвитку синдрому гострого ушкодження легень (СГУЛ). Встановлено, що при розвитку СГУЛ відбувається зростання активності неспецифічних протеїназ, як на системному, так і на місцевому рівнях незалежно від етіологічного фактора. Отримані дані свідчать про виснаження захисно-компенсаторних механізмів організму, що може бути провідним чинником змін в легенях і формування СГУЛ.

Ключові слова: протеїнази, синдром гострого ушкодження легень, патогенез, поліорганна недостатність

Anisimova L.V. Nonspecific proteases as diagnostic and prognostic marker of the syndrome of acute lung injury // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. 129-131.

The article presents the analysis of nonspecific proteases of blood serum and bronchoalveolar lavage in rats with various models of critical conditions that lead to the development of acute lung injury (ALI). It was established that during the development of ALI occurs the growth of activity of nonspecific proteases as at systemic and local levels regardless of the etiological factor. The findings suggest depletion of protective and compensatory mechanisms of an organism that can be a leading factor in changes in the lungs and the formation of the ALI.

Key words: proteinases, syndrome of acute lung injury, pathogenesis, multiple organ failure

Введение. Одной из причин смерти больных в терминальной стадии критических состояний остается синдром полиорганной недостаточности (СПОН) - синдром последовательного прогрессирующего отказа органов и систем в результате травмы или септического состояния. СПОН, на сегодняшний день, называют тяжелой неспецифическую стресс-реакцию организма, недостаточность двух и более функциональных систем, универсальное поражение всех органов и тканей организма агрессивными медиаторами критического состояния с временным преобладанием симптомов той или иной органной недостаточности - легочной, сердечной, почечной и т. д. [1]. Развитие синдрома острого повреждения легких (СОПЛ) является практически обязательным компонентом синдрома полиорганной недостаточности при критических состояниях, с многофакторным характером патогенеза и полиморфной клинической симптоматикой без четких диагностических критериев [2, 7].

Поиск диагностических и прогностических маркеров отражающих степень повреждения ткани легких в процессе формирования СПОН

является одним из актуальных вопросов современной теоретической и практической медицины. Процесс протеолиза является одним из универсальных процессов живой природы, происходящий во всех организмах с той или иной степенью интенсивности. Протеолитические ферменты, обладающие высокой биологической активностью, представляют потенциальную опасность для большинства белковых структур тканей. Избыточная активация протеиназ является важным патогенетическим звеном в развитии ряда деструктивных и воспалительных реакций организма [3]. В настоящее время считают, что в основе развития СОПЛ лежит не прямое повреждение альвеолярной мембраны в результате нарушений микроциркуляции и именно сдвиги баланса вазоактивных веществ, влияющие на легочную микроциркуляцию, играют главенствующую роль [4].

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 неспецифические

протеиназы на местном и системном уровнях влияют на развитие СОПЛ.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры патологической физиологии Государственного Учреждения «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского» «Разработка диагностических и прогностических критериев оценки развития воспаления, ассоциированного с различными заболеваниями» (№ государственной регистрации 0113U001557).

Цель исследования – сравнить реакцию неспецифических протеиназ сыворотки крови и бронхоальвеолярного смыва в процессе развития СОПЛ при действии различных этиологических факторов.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на 34 белых крысах-самцах линии "Wistar" массой 180-210 г в соответствии с принципами биоэтики.

Формирование СПОН проводили путем моделирования двух экстремальных клинических состояний: первый - синдром ишемии-реперфузии (СИР), второй – острый разлитой перитонит (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.

ОРП вызвали путем внутрибрюшинного введения в брюшную полость 1 мл 10% гомогенной каловой суспензии на 100г массы тела животного. Эвтаназию животных осуществляли под тиопенталовым наркозом путём декапитации через 24 часа после реперфузии (n=12), и через 24 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 [5].

Определение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы в БАС проводили с использованием энзиматических методов [6] на спектрофотометре "Biomat 5» (Великобритания). Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N- α -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). Общий белок исследовали спектрофотометрическим методом по Лоури.

Статистическая обработка полученных данных проведена с применением методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M), оценкой вероятности расхождений (m), оценкой достоверности изменений с использованием t-критерия Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование протеолитической активности на модели СИР выявило, что ТПА сыворотки крови относительно контроля увеличилась – в 1,8 раза ($p < 0,01$), а ЭПА, наоборот, снизилась – в 1,5 раза ($p < 0,01$). В БАС активность трипсиноподобных протеиназ была выше в 1,52 раза ($p < 0,001$), а эластазоподобных – в 1,7 раза ($p < 0,001$) чем в группе интактных животных (рис.1).

При моделировании ОРП у экспериментальных животных ТПА сыворотки крови увеличивалась в 2,42 раза ($p < 0,001$), а ЭПА – в 1,9 раза ($p < 0,001$) относительно группы контроля. В БАС ТПА превышала в 1,1 раза контрольные значения, ЭПА – в 1,21 раза, однако эти изменения были недостоверны.

Полученные экспериментальные данные показывают, что в процессе формирования СОПЛ происходит рост активности трипсиноподобных протеиназ, как на системном, так и на местном уровнях. Проведенные нами исследования выявили однонаправленные изменения ТПА относительно группы интактных животных, как в сыворотке крови, так и в БАС. Результаты показывают, что развивается дисбаланс в протеиназ-ингибиторной системе, проявляющийся активацией неспецифических протеиназ как на системном, так и на местном уровне. Однако ЭПА сыворотки крови при СИР снижалась, а при ОРП, наоборот, увеличивалась, тогда, как максимальное повышение трипсиноподобной активности сыворотки крови выявлено при ОРП, а в БАС при СИР. Разнонаправленное изменение активности эластазоподобных протеиназ может свидетельствовать о том, что при СИР, в отличие от ОРП, активация данных протеиназ менее выражена и протекторный механизм достаточен для предотвращения их системной активации.

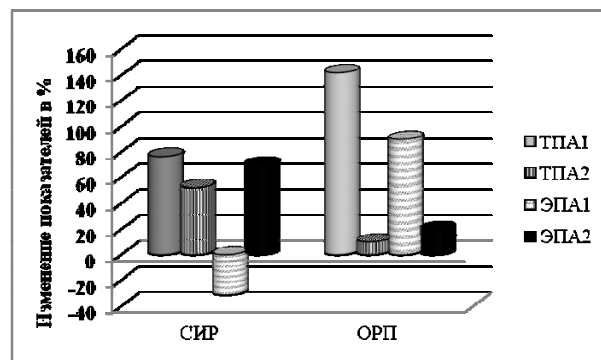


Рис. 1. Изменение неспецифических протеиназ сыворотки крови (1) и БАС (2) при экспериментальном СИР и ОРП

Гистологические исследования ткани лёгких показали, что при развитии СПОН у всех экспериментальных животных через 24 часа определялись ранние гистологические признаки диффузного альвеолярного повреждения легких. У экспериментальных животных с моделированием СИР превалировали признаки нарушения кровообращения в виде полнокровия сосудов разного калибра, явлений стаза и сладжа, очагами периваскулярных и внутриальвеолярных кровоизлияний, обнаруживались фибриновые тромбы в альвеолярных капиллярах и легочных артериолах, при этом стенки альвеолярных капилляров были утолщены, с наличием фибриноидного набухания. Также наблюдался выраженный интраальвеолярный и интерстициальный отек, а в некоторых альвеолах определялись формирующиеся гиалиновые мембраны, локализующиеся частично вдоль базальной мембраны альвеолярных перегородок с повреждением альвеолярного эпителия. В интерстиции альвеолярных перегородок также обнаруживали редкие инфилтраты, состоящие преимущественно из лимфоцитов и макрофагов.

Сопоставление результатов исследования состояния протеиназной активности сыворотки крови и БАС с морфологической картиной изменений показало, что степень деструктивных изменений в легочной ткани соответствует характеру активации неспецифических протеиназ в бронхоальвеолярном секрете. Причем одновременное повышение ТПА и ЭПА свидетельствует об истощении защитно-

компенсаторных механизмов организма, что может быть ведущим фактором изменений в легких и формирования СОПЛ.

Таким образом, характер и степень выраженности системных и локальных изменений неспецифических протеиназ можно рекомендовать использовать в качестве диагностического и прогностического маркера повреждения ткани легкого при развитии СОПЛ. Учитывая универсальный механизм участия неспецифических протеиназ в процессах тканевого повреждения можно предположить, что их степень активации может быть маркером повреждения других органов при СПОН, что требует проведения дальнейших исследований.

Выводы: 1. Рост активности трипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови и в БАС отражает степень повреждения ткани легких в процессе развития СОПЛ. 2. Определение уровня трипсиноподобной и эластазоподобной активности в сыворотке крови и в БАС может быть использован в качестве диагностически-прогностического маркера формирования синдрома острого повреждения легких и возможно других органов при развитии синдрома полиорганной недостаточности.

Перспективы дальнейших исследований. Перспективным направлением данного исследования является изучение активации неспецифических протеиназ и их ингибиторов на системном и местном уровнях при повреждении других органов в процессе формирования синдрома полиорганной недостаточности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. **Лейдерман И.Н.** Синдром полиорганной недостаточности (ПОН). Метаболические основы / **И.Н. Лейдерман** // Вестник интенсивной терапии. -1999. -№3. - С. 19-20.
2. **Никонов В.В.** Синдром полиорганной недостаточности: «шоковое легкое» / В.В. Никонов, А.Ю. Павленко, А.В. Белецкий // «Медицина неотложных состояний». -2011. -№ 7-8.-С.9-16.
3. Особенности протеолитической активности плазмы крови доноров и лиц с бронхо-легочной патологией / **В.Н. Никандров, О.Н. Жук, Е.И. Вашкевич [и др.]** //Функциональные системы организма в норме и при патологии: сб. науч. тр. / под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. – Минск : РИВШ. - 2008. – С.413-418
4. **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.
5. **Биркун А.А.** Сурфактант легких / А. А. Биркун, Е. Н. Нестеров, Г. В. Кобозев. – Киев: Здоров'я, 1981. – 160 с
6. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (методичні рекомендації) / **А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, П.Ф. Семенец [та ін.]** – Київ 2010 - 28 с.
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.

*Надійшла 19.11.2013 р.
Рецензент: проф. Ю.Г.Бурмак*