

УДК 616.718+616-005.4+616-008.6+616-092.4-078

© Коллектив авторов, 2012.

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ И ЦИТОКИНОВЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ

**М.И. Федосов, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин, А.А. Бабанин, Н.Ю. Пылаева***ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», кафедра патологической физиологии (зав. – профессор А.В. Кубышкин), кафедра медицины неотложных состояний и анестезиологии (зав. – доцент А.А. Бабанин), г. Симферополь.*

### PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF PROTEOLYTIC AND CYTOKINE MECHANISMS IN REPERFUSION SYNDROME

**M.I. Fedosov, I.I. Fomochkina, A.V. Kubyshkin, A.A. Babanin, N.Y. Pylaeva**

#### SUMMARY

Development of an experimental reperfusion syndrome accompanied by activation of the serum proteinase, reduction of their inhibitors and increased concentrations of the main pro-inflammatory cytokines. Active proteases increases the maximum to 12 hours after reperfusion, and tends to decrease to 48 hours after reperfusion in surviving animals. The concentration of the major pro-inflammatory cytokines in the serum reaches the maximum level at 12 hours (IL-1 $\beta$ ) and 24 hours (IL-6, TNF- $\alpha$ ) with subsequent reduction to 48 hours after reperfusion. Determination of proteinase activity indicators, their inhibitors and the level of proinflammatory cytokines can be used as an effective and demonstration of biochemical markers to determine the severity of the condition and predict the outcome of the critical state.

### ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ І ЦИТОКІНОВИХ МЕХАНІЗМІВ ПРИ РЕПЕРФУЗІЙНОМУ СИНДРОМІ

**М.І. Федосов, І.І. Фомочкіна, А.В. Кубишкін, А.А. Бабанін, Н.Ю. Пылаєва**

#### РЕЗЮМЕ

Розвиток експериментального реперфузійного синдрому супроводжується активацією в сироватці крові протеїназ, пригніченням їх інгібіторів і підвищенням концентрації основних прозапальних цитокінів. Активність протеїназ максимально зростає к 12 годинам після реперфузії і має тенденцію до зниження к 48 годинам після реперфузії у виживших тварин. Концентрація основних прозапальних цитокінів в сироватці крові досягає максимального рівня к 12 годинам (IL-1 $\beta$ ) і к 24 годинам (IL-6, TNF- $\alpha$ ) з подальшим зниженням к 48 годинам після реперфузії. Визначення показників активності протеїназ, їх інгібіторів та рівня прозапальних цитокінів може використовуватися в якості ефективних і показових біохімічних маркерів для визначення тяжкості стану і прогнозування результату критичного стану.

**Ключевые слова: ишемия, реперфузия, протеиназы, ингибиторы протеиназ, цитокины.**

Успехи развития медицины неотложных состояний в последнее время привели к увеличению выживаемости больных в остром периоде их развития. Однако на первый план вышла другая основная причина гибели пациентов в более поздний период критических состояний, связанная с развитием полиорганной недостаточности (ПОН) [1, 2]. Одним из частых критических состояний, сопровождающихся развитием ПОН, является синдром ишемии-реперфузии. Данный синдром, представляющий собой патологический процесс, развивающийся в результате восстановления кровотока в ранее ишемизированной ткани, встречается в кардиологической, ангиохирургической, травматологической, неврологической практике и в практике медицины неотложных состояний [3, 4]. Считается, что ключевую роль в патогенезе полиорганной недостаточности играют микроциркуляторные расстройства и чрезмерная активация биологически активных веществ [5]. При этом активации биологически активных веществ при критических

состояниях уделяется всё больше внимания, а их чрезмерный выброс в системный кровоток получил название синдрома системного воспалительного ответа (ССВО).

Из механизмов, участвующих в патогенезе ССВО, особое значение придаётся чрезмерной системной активации цитокинов и протеолитических ферментов, которая происходит в результате повышения проницаемости клеточных мембран, экзоцитоза лейкоцитов, на фоне угнетения функции сывороточных и тканевых ингибиторов протеолиза, что приводит к нарушению функции калликреин-кининовой системы, свёртывания крови, системы комплемента [5-9]. При этом цитокины, относящиеся к регуляторным факторам, становятся главной движущей силой патологического процесса, а протеолитические ферменты оказывают повреждающее воздействие [10-12].

Целью настоящей работы явилось установить значение провоспалительных цитокинов, неспецифических протеиназ и их ингибиторов при моделировании синдрома ишемии-реперфузии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на 70 белых крысах-самцах линии «Вистар» массой 180-210 г. Содержание животных в виварии было одинаковым, что является условием создания структурной группы [13, 14]. Исходное количество крыс в экспериментальных группах составило по 12 животных в каждой.

Синдром ишемии-реперфузии 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.

Забой животных осуществляли под тиопенталовым наркозом путём декапитации. Кровь для исследования получали через 6 часов после наложения жгутов (n=12), через 6 (n=12), 12 (n=12), 24 (n=12) и 48 (n=12) часов после реперфузии. Биохимические исследования проводили в сыворотке крови, полученной из яремной вены опытных животных. В качестве контроля служила группа интактных животных (n=10).

Определение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы проводили с использованием энзиматических методов [15]. Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N-б-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата N-t-вос-аланил-n-нитрофенилового эфира (БАНФЭ). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ (АТА) проводили на основании торможения расщепления трипсином этилового эфира N-α-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal). При определении активности кислотостабильных ингибиторов (КСИ) предварительная подготовка сыворотки крови заключалась в ее прогревании при кислых значениях pH для полной инактивации лабильных ингибиторов. Для этого сыворотку, предварительно разбавленную цитратным буфером до pH -4,1, прогревали в течение 30 мин. при 60° С. Дальнейшее определение проводили, как описано для б<sub>1</sub>-ингибитора протеиназ.

Определение концентрации цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов «RayBio» (США). Результаты фиксировали с использованием микропланшетного сканера с длиной волны 450 нм.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и оценкой вероятности расхождений (m) [16]. В качестве

критерия оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали t-критерий Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при p<0,05. Статистические расчеты выполняли в среде электронных таблиц Excel для Microsoft Office.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые исследования показали, что моделирование реперфузионного синдрома приводит к гибели 50-60% животных в первые 24 часа после реперфузии конечностей.

Исследование активности протеолитических ферментов и их ингибиторов показало, что при развитии реперфузионного синдрома в различные сроки после реперфузии в протеиназ-ингибиторной системе сыворотки крови развивается дисбаланс, который становится максимально выраженным в сроке 12 часов после реперфузии и сопровождается выраженной активацией трипсиноподобных протеиназ и угнетением антитриптической активности относительно контроля на 64% и 26% соответственно (рис. 1). В сроке до 48 часов у выживших экспериментальных животных в сыворотке крови отмечается тенденция к восстановлению баланса протеиназ-ингибиторной системы со снижением активности протеиназ и ростом активности их ингибиторов, что можно расценить как благоприятный прогностический признак при синдроме ишемии-реперфузии. В то же время следует отметить некоторое снижение эластазоподобной активности. Как известно, эластаза относится к одним из наиболее активных протеолитических ферментов, оказывающих мощное деструктивное воздействие. В связи с этим можно предположить, что в сыворотке крови эластазоподобная активность контролируется более эффективно.

Параллельно развитию дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе сыворотки крови при развитии синдрома ишемии-реперфузии происходит активация провоспалительных цитокинов (рис. 2). Выраженный рост отмечен в уровне IL-1β, причём его максимальный уровень, в 9,5 раз выше контрольного значения, отмечался в крови через 12 часов после реперфузии. Уровень IL-6 так же повышался и достигал максимума, в 40 раз превышая контрольное значение, к 24 часам после развития реперфузии. Рост TNF-α показывал волнообразное повышение и достигал максимального значения, более чем в 30 раз выше контрольного, к 24 часам после реперфузии. Следует отметить тенденцию к снижению уровня всех провоспалительных цитокинов к 48 часам после реперфузии у выживших животных, что можно расценивать в качестве благоприятного признака течения патологии.

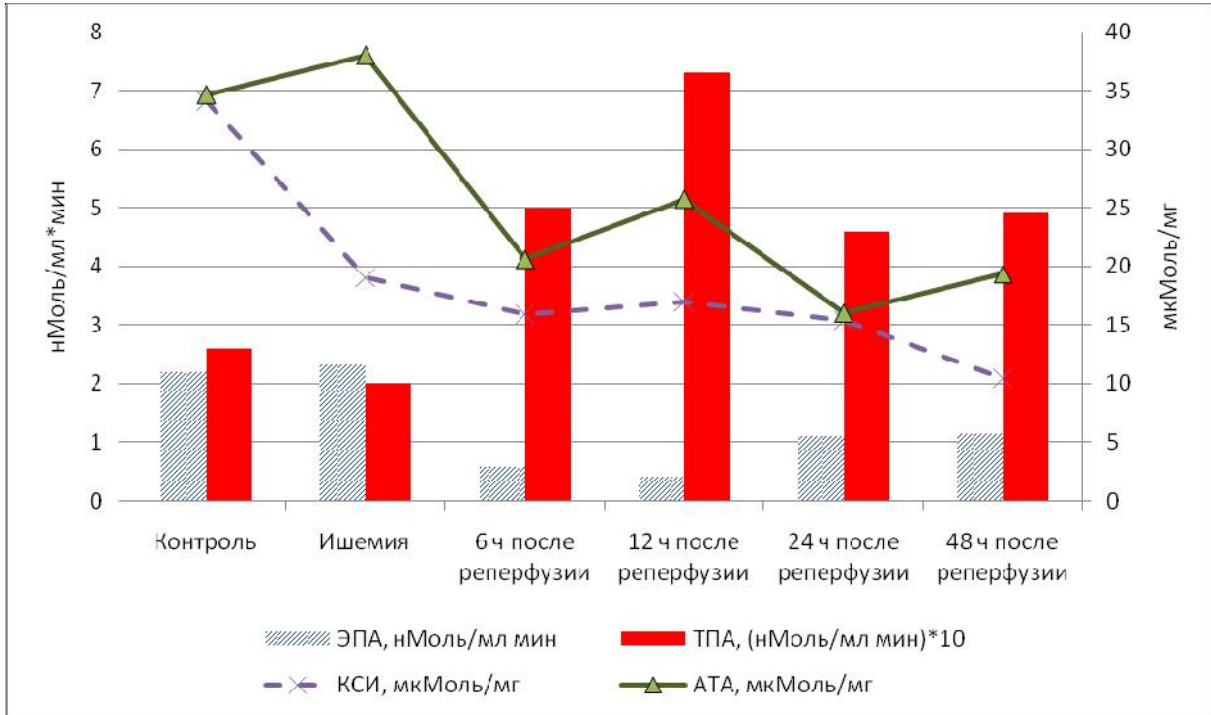


Рис. 1. Изменения в протеиназ-ингибиторной системе крови крыс при развитии синдрома ишемии-реперфузии.

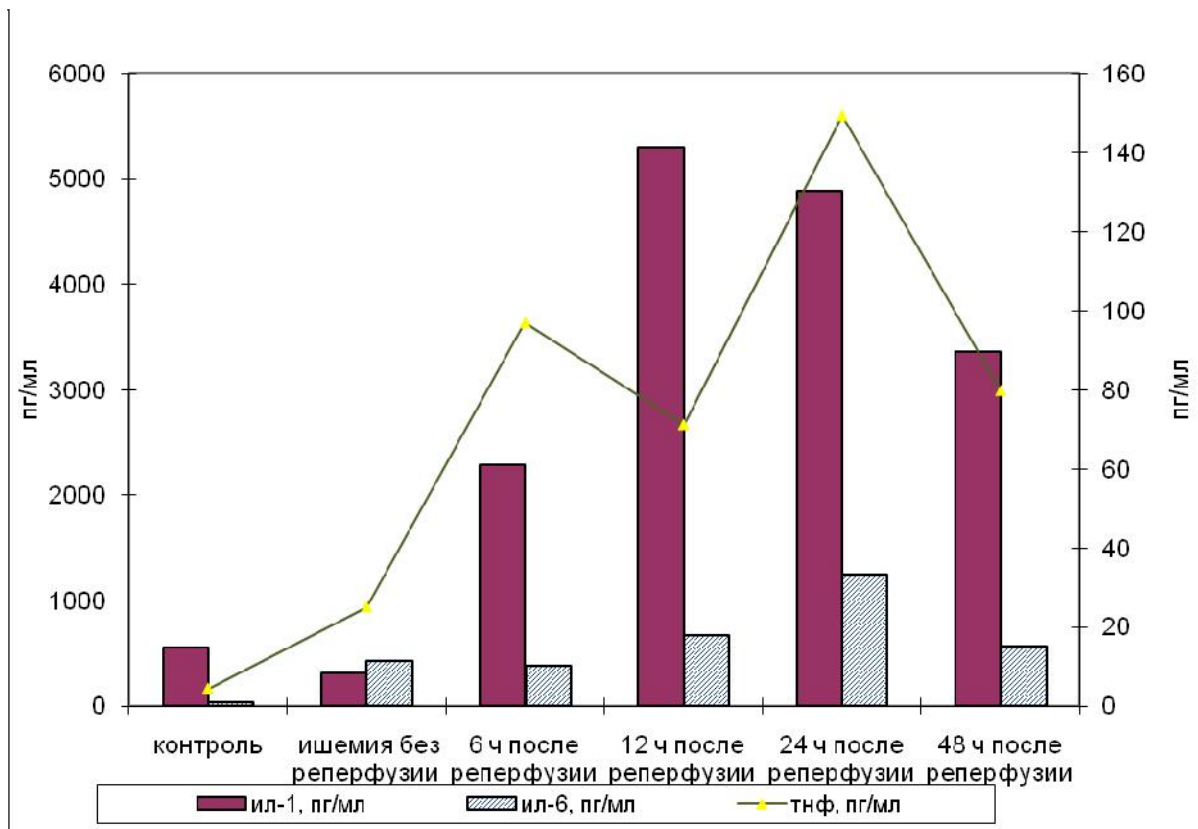


Рис. 2. Изменения в системе цитокинов крови крыс при развитии синдрома ишемии-реперфузии.

Полученные результаты показали, что определение активности протеиназ-ингибиторной системы является более достоверным методом для оценки тяжести и определения прогноза заболевания, чем определение концентрации цитокинов. Это связано с тем, что в протеиназ-ингибиторной системе выявляются более выраженные и более ранние изменения, отражающие фазность течения патологии. Возможно, это связано с тем, что протеиназы и их ингибиторы можно условно отнести к эффекторным факторам, непосредственно участвующим в развитии повреждения, тогда как цитокины в большей степени выполняют роль регуляторных факторов.

#### ВЫВОДЫ

1. Развитие синдрома ишемии-реперфузии сопровождается активацией в сыворотке крови протеиназ и угнетением их ингибиторов. Прогрессивный рост активности трипсиноподобных протеиназ достигает максимальных значений к 12 часам после реперфузии и сопровождается угнетением антитриптической активности. В сроке 48 часов после реперфузии у выживших животных отмечается тенденция к восстановлению баланса в протеиназ-ингибиторной системе со снижением активности протеиназ и ростом активности их ингибиторов у выживших животных.

2. При развитии синдрома ишемии-реперфузии происходит активация основных провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Так, уровень IL-1 $\beta$  достигает максимального уровня к 12 часам после реперфузии, уровень IL-6 и TNF- $\alpha$  – к 24 часам после реперфузии с последующим снижением уровня всех цитокинов к 48 часам после реперфузии у выживших животных.

3. Определение показателей активности протеиназ, их ингибиторов и концентрации основных провоспалительных цитокинов в сыворотке крови можно рекомендовать в качестве эффективных и показательных биохимических маркеров для определения тяжести состояния и прогнозирования исхода критического состояния.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Beal A.L., Cerra F.B. Multiple organ failure syndrome in the 1990s: Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1999; 279: 226-280.
2. Deitch E.A., Vincent J.-L., Windsor A. Sepsis and multiple organ dysfunction: a multidisciplinary approach. W.B.Saunders; 2002.
3. Тацкий Ю.П., Вардосанидзе С.Л., Вывыхвост А.В. и др. Метаболические и тканевые соотношения во время реперфузионного синдрома // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2001. – Т. 7, №4. – С. 44-50.
4. Кашталап В.В., Барбараш О.Л., Воронова Н.Л. Влияние системной тромболитической терапии

альтеплазой и стрептокиназой на показатели функции эндотелия и прогноз пациентов с инфарктом миокарда с подъемом ST // *Бюлл. СО РАМН*. – 2006. – №4 (126). – С. 132-137.

5. Knight S. Renal functional responses to ischaemia-reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats following non-selective and selective cyclo-oxygenase inhibition with nitric oxide donation / S.Knight, E.J., Johns // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2008. – Vol. 35, № 1. – P. 11-16.

6. Bilenko M.V. Free-radical mechanisms of macrophage involvement in endothelial cell injury and LDL oxidation in ischemic and reperfused vessels. Abstract From the XVII ISHR World Congress of the International Society for Heart Research. July 6-11, Winnipeg, Canada // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001. – Vol. 33, № 6. – P. 13.

7. Knight S. Renal functional responses to ischaemia-reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats following non-selective and selective cyclo-oxygenase inhibition with nitric oxide donation / S.Knight, E.J., Johns // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2008. – Vol. 35, № 1. – P. 11-16.

8. Rossi A. The role of 5-lipoxygenase and leukotrienes in shock and ischemia-reperfusion injury / A. Rossi, C. Pergola, S. Cuzzocrea et al. // *Scientific World Journal*. – 2007. – № 7. – P. 56-74.

9. Douvas S. Anti-Inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor / S. Douvas, A. Kolokotronis, P. Stefanopoulos // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 3. – P. 1271-1274.

10. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен. Цитокины и воспаление 2002; Т.1(2): 17-22.

11. Marshall J.C. Immune response in the critically ill / J.C. Marshall, J. Coehn. - Softcover ed. Germany (Berlin Heidelberg): Springer-Verlag, 2002.

12. Гусев Е.Ю., Осипенко А.В. Иммунология системного воспаления. Иммунология Урала. 2001; 1:4-8.

13. Лифшиц Р.И., Калимов Ф.Х., Ефименко Г.П., Слободин В.Б. и др. Исследование возможности синтеза белка в условиях острой ишемии конечности // *Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами: Тез. докл. 1 Всесоюз. симпозиум*. - М., 1973. - С.30-31.

14. Хельд Д.Р. Требования к лабораторным животным при осуществлении программ здравоохранения // *Бюл. ВОЗ* - 1981. - Т.50, N 4. - 20 с.

15. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. -Киев: Здоровья, 1988. -2.

16. А. Петри, К. Сэбин Наглядная статистика в медицине. -М.:ГЭОТАР МЕД, 2003. - с.17-18, 79.