

УДК 616.381-002:616-07:577.152.34-(599.323.4)

© Ю.А. Ермола, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин, 2012.

## ЛОКАЛЬНЫЕ И СИСТЕМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

Ю.А. Ермола, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин

*Кафедра патологической физиологии (зав. - профессор А.В. Кубышкин)**Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь.*

### LOCAL AND SYSTEMIC CHANGES OF NONSPECIFIC PROTEASES AND THEIR INHIBITORS IN EXPERIMENTAL PERITONITIS

Yu.A. Ermola, I.I. Fomochkina, A.V. Kubishkin

#### SUMMARY

The activity of proteolytic enzymes and their inhibitors in peritoneal washout, blood serum and bronchoalveolar lavage fluid in experimental peritonitis in rats it was studied. The development of imbalance of non-specific proteases and their inhibitors depends from dosage and concentration of injected flogogen. Activation of proteases and decrease protease inhibitor activity can appear such as important factor which may leads for spread of abdominal inflammation process and multiple organ disfunction syndrome development.

### ЛОКАЛЬНІ І СИСТЕМНІ ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ І ЇХ ІНГІБІТОРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПЕРИТОНІТІ

Ю.А. Ермола, І.І. Фомочкіна, А.В. Кубишкін

#### РЕЗЮМЕ

У статті проведений порівняльний аналіз змін показників системи протеоліза при моделюванні експериментального перитоніту в перитонеальному вмісті, сироватці крові і бронхоальвеолярному змиванні. Встановлено, що дисбаланс неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів, що розвивається, залежить від дози і концентрації флогогена, що вводиться, і може бути одним з чинників генералізації запального процесу в черевній порожнині і сприяти розвитку органопатології.

**Ключевые слова:** перитонит, протеиназы, ингибиторы протеиназ, воспаление.

Продолжающейся рост заболеваемости и высокая летальность от перитонита выдвигает изучение патогенеза данной патологии в одну из наиболее актуальных проблем [3,4,5]. Причем у больных перитонитом формирование заболевания часто осложняется абдоминальным сепсисом, что существенно утяжеляет течение патологии [2,4,13]. В связи с этим рассмотрение проблемы перитонита с точки зрения локального воспаления брюшной полости не в полной мере отражает патогенетические механизмы его развития. Все больше внимания уделяется изучению системных изменений при перитоните и роли медиаторов воспаления в их развитии, причем считается, что именно медиаторы воспалительной реакции могут являться посредниками между локальными и системными изменениями при перитоните [1,5,7,15].

В качестве одних из таких посредников могут рассматриваться неспецифические лейкоцитарные протеиназы и их ингибиторы [8,11,9,16]. Чрезмерное накопление протеиназ в очаге воспаления с их попаданием в системный кровоток является одним из факторов, подключающих системный уровень воспалительного процесса. Возрастающая активность протеиназ и неспособность ингибиторной и кининазной

систем инактивировать увеличивающееся количество ферментных комплексов может приводить к срыву ферментативного гомеостаза, развитию патологических сдвигов в системах коагуляции и фибринолиза и способствовать развитию гемодинамических нарушений, ведущих к артериальной гипотензии и шоку [12,14,17].

В связи с этим, цель нашей работы выявить значение изменений состояния показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов в процессах генерализации патологических изменений при моделировании экспериментального перитонита.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 32 половозрелых крысах линии Вистар массой тела 180 – 200 г. Животные были разделены на 4 группы: интактная группа животных (n=8), служившая в качестве контроля, и три опытные группы, в которых осуществлялось моделирование экспериментального перитонита различной степени тяжести интраперитонеальным введением фильтрованной крысиной каловой взвеси [10]. В первой опытной группе (n=8) крысам вводилась 10% каловая взвесь в дозировке 0,5 мл на 100 г массы тела животного, во второй опытной группе

(n=8) – 15% каловая взвесь в дозировке 0,5 мл на 100 г массы тела животного, в третьей опытной группе (n=8) – 15% каловая взвесь в дозировке 1мл на 100 г массы животного. Проведение эксперимента осуществляли с соблюдением принципов Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1985г.). Умерщвление животных осуществляли под эфирным наркозом путем декапитации с последующим забором материала. Кровь для исследований получали из яремной вены. Перитонеальный смыв получали 5-кратным промыванием брюшной полости 10 мл изотонического раствора NaCl в течение 1 минуты, с последующей аспирацией с помощью шприца. После выделения легочно-сердечного комплекса получали бронхоальвеолярный смыв путем промывания легких через трахею 10 мл физиологического раствора [6].

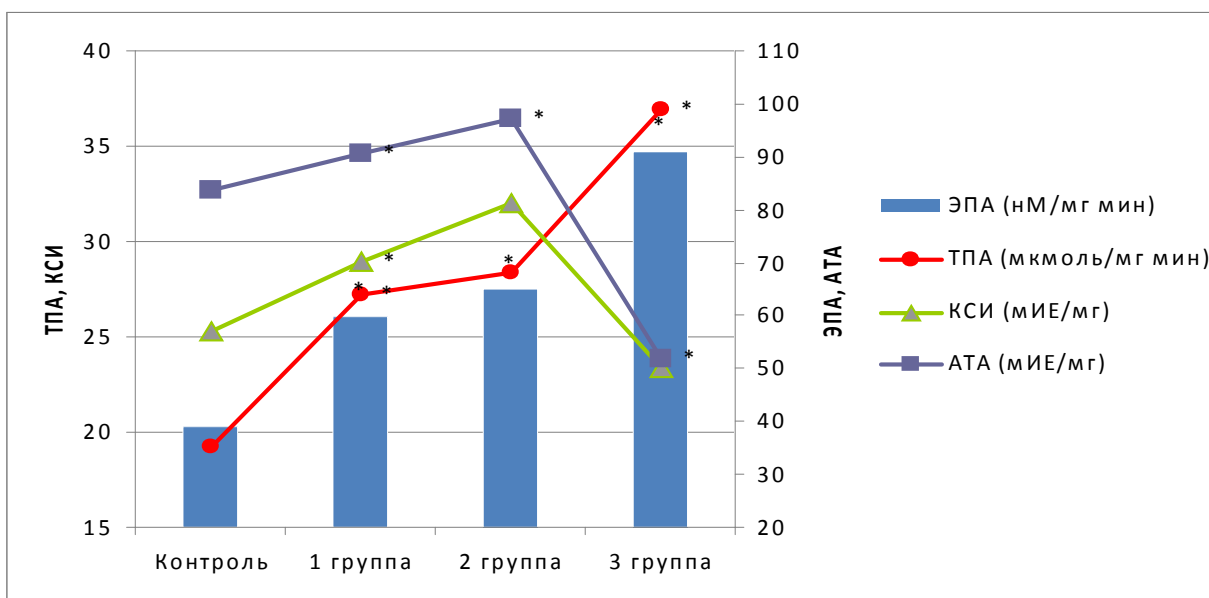
Исследования проводили в перитонеальном смыве, сыворотке крови, бронхоальвеолярном смыве. Компоненты протеиназ – ингибиторной системы определяли с использованием энзиматических методов [6]. Трипсиноподобную активность (ТПА) плазмы крови, измеряли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата N-бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ). Измерение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили по гидролизу синтетического субстрата N-t-ВОС-аланил-p-нитрофинилового эфира

(БАНФЭ). Определение антитриптической активности (АТА) проводили по определению торможения БАЭЭ – эстеразной активности трипсина. Для определения кислотостабильных ингибиторов (КСИ) в биологическом материале предварительно инактивировали лабильные ингибиторы прогреванием в кислой среде, и в дальнейшем определение проводили, как для антитриптической активности. Белок во всех образцах определяли методом Лоури. Статистический анализ результатов проводили методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные предварительные исследования показали, что выживаемость при моделировании экспериментального перитонита у крыс зависит от концентрации и количества введенной каловой взвеси. При введении фильтрованной 10% и 15% каловой взвеси в дозировке 0,5 мл на 100 г массы животного летальность в первые сутки составляла от 20 до 30%, доза 1 мл на 100 г массы животного фильтрованной 15% каловой взвеси оказалась сублетальной и в течение 24 часов вызывала гибель 90% животных.

При изучении локальных и системных изменений была выявлена их зависимость от степени тяжести развивающегося процесса. В перитонеальном секрете отмечены разнонаправленные изменения неспецифических протеолитических протеиназ и их ингибиторов (рис. 1).



**Рис. 1. Изменение показателей протеиназ и их ингибиторов в перитонеальном смыве при экспериментальном перитоните (звездочками на всех рисунках показана достоверность различий ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю).**

Трипсиноподобная активность прогрессивно росла при увеличении дозы вводимого флогогена с 41,6% в первой группе до 92,1% в третьей группе животных. Более выражено увеличивалась актив-

ность эластазоподобных протеиназ, уровень которых в первой группе увеличился на 53,5%, а в группе с сублетальной дозой каловой взвеси в 1,3 раза по сравнению с контролем. На фоне роста активности про-

теиназ отмечалась фазная реакция в состоянии ингибиторов. В группах животных с введением малой дозы 10 и 15% каловой взвеси отмечался незначительный рост АТА и КСИ. Антитриптическая активность увеличивалась на 8,1 и 15,3 % в первой и второй группах, а КСИ на 33,9 и 12,5% соответственно. Вместе с тем, в группе с высокой летальностью отмечалось снижение ингибиторов протеиназ. Способность смыва связывать трипсин снизилась на 38%

по сравнению с контролем, а уровень КСИ уменьшился на 7,5% по отношению к контролю.

На фоне указанных изменений в перитонеальном секрете, при моделировании экспериментального перитонита 10 % и 15% каловой взвесью у крыс через 24 ч в сыворотке крови наблюдалась острофазная реакция компонентов протеиназ-ингибиторной системы в ответ на развитие воспаления в брюшной полости (рис.2).

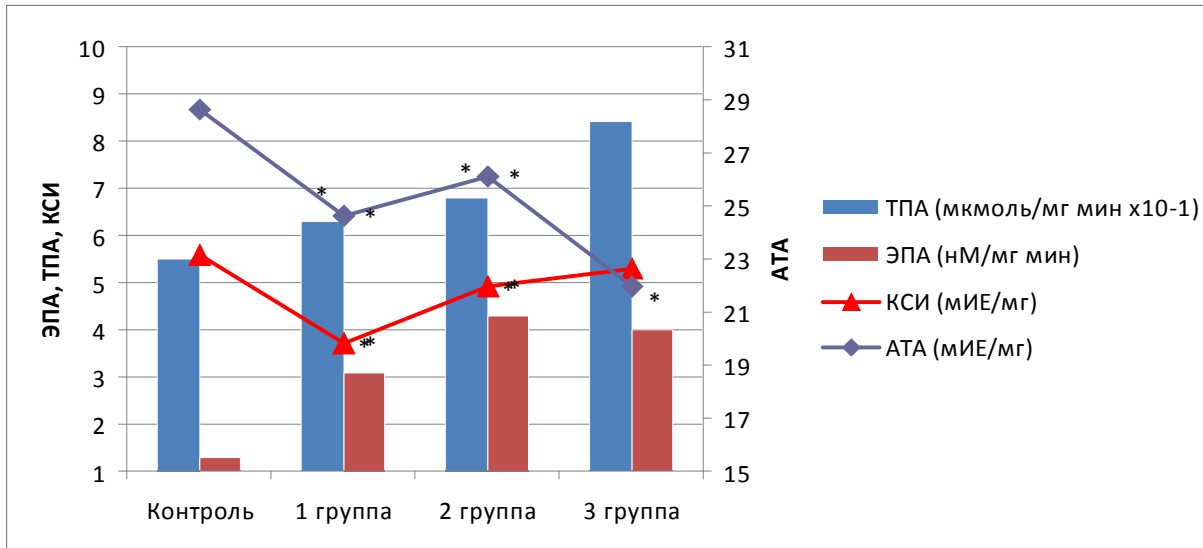


Рис.2. Изменение показателей процессов протеолиза в сыворотке крови при экспериментальном перитоните.

Изучение трипсиноподобной активности показало прогрессивный рост с 14,5% в первой группе до 52,7% в третьей группе с высокой летальностью животных. Выраженное увеличение эластазоподоб-

ной активности в 2 раза наблюдалось в группе животных с высокой летальностью, хотя и в первых двух группах эластазоподобная активность увеличилась от 53,5% до 66,4%. Уровень антитриптической актив-

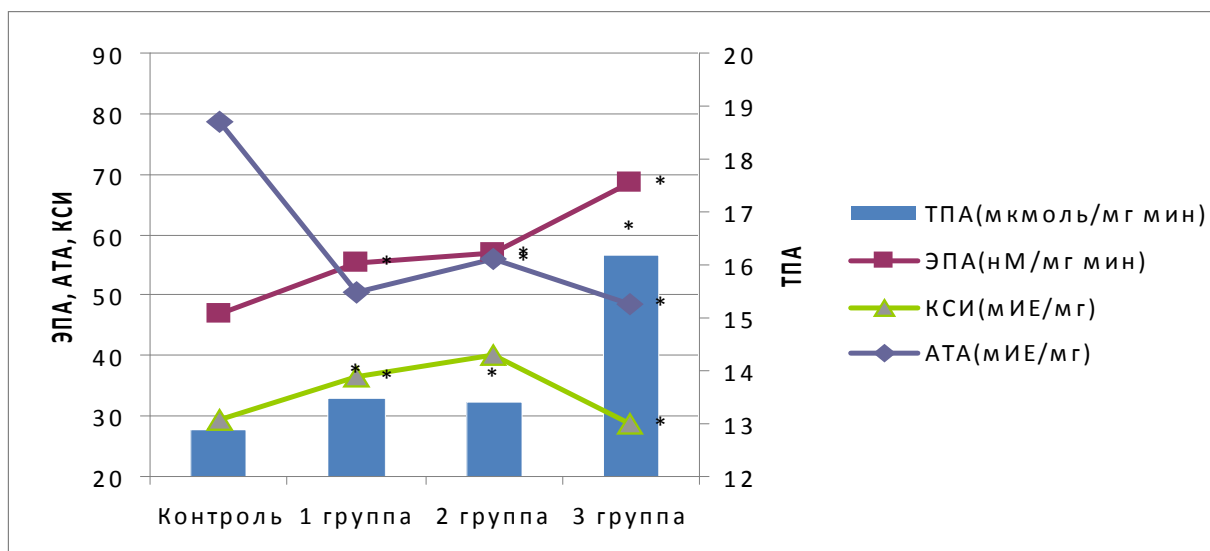


Рис.3. Изменение показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов в бронхоальвеолярном смыве при экспериментальном перитоните.

ности и кислотостабильных ингибиторов прогрессивно снижался с 5,3% в первых двух группах до 33,9% в группе животных с сублетальной дозой.

Указанные изменения в состоянии протеиназ и их ингибиторов на системном уровне могут сказываться на реактивных изменениях в других органах и, по-

видимому, быть одним из факторов формирования органопатологии. В проведенной работе в качестве органа-мишени для исследования реакции неспецифических протеиназ и их ингибиторов при формировании перитонита были выбраны легкие с исследованием локальных изменений в бронхоальвеолярном секрете (БАС). Реакция БАС зависела от степени выраженности перитонеальной реакции и степени активации протеиназ в сыворотке крови (рис.3).

Показано, что в бронхоальвеолярном смыве наблюдалось постепенное увеличение уровня ТПА с 4,6% до 25,5%, ЭПА с 17,6% до 46% в группе с высокой летальностью. В динамике отмечен рост уровня КСИ с 24% до 52,2% в третьей группе животных по сравнению с показателями контрольной группы. В ходе изучения антитриптической активности наблюдалась тенденция к её снижению на 28 - 38% по сравнению с показателями контрольной группы.

Таким образом, в ходе проведенной работы выявлено, что при развитии экспериментального перитонита в перитонеальном содержимом происходит активация процессов протеолиза. Выраженность активации зависит от дозы и концентрации введенной каловой взвеси. На фоне роста активности протеиназ наблюдалась фазная реакция в состоянии ингибиторов, зависящая от дозы повреждающего фактора. В группе с сублетальной дозой каловой взвеси отмечалось снижение активности ингибиторов протеиназ. Изменения на локальном уровне подключают системный уровень воспалительного процесса, который проявляется в сыворотке крови развитием острофазной реакции компонентов протеиназ-ингибиторного потенциала. Низкая активность ингибиторов протеиназ в сыворотке крови может быть маркером нарушений, приводящих к развитию органопатологии. В частности, снижение ингибиторного потенциала в крови параллельно с увеличением активности эластазоподобных протеиназ в сыворотке крови может являться одним из основных факторов вовлечения легких в патологический процесс. При тяжелой форме экспериментального перитонита в бронхоальвеолярном секрете отмечена реактивная активация эластазоподобных и трипсиноподобных протеиназ с снижением антитриптической активности и кислотостабильных ингибиторов протеиназ. Формирование дисбаланса на локальном уровне, может являться дополнительным фактором способствующим повреждению лёгких при развитии тяжелых форм перитонита.

#### ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментального перитонита сопровождалось активацией системы протеолиза в перитонеальном содержимом, причем выраженность изменений зависела от концентрации и дозы введенной каловой взвеси и проявлялась локальным увеличением активности протеолитических ферментов и снижением ингибиторного потенциала.

2. Моделирование экспериментального перитонита приводило к развитию острофазной реакции неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови, которая зависела от дозы и концентрации флогогенного фактора. При низких дозах и концентрациях флогогенного фактора отмечена активация трипсиноподобной и эластазоподобной активности на фоне некоторого снижения антитриптической активности и кислотостабильных ингибиторов. При сублетальных дозах флогогенного фактора активность эластазоподобных протеиназ увеличилась в 2 раза, а уровень антитриптической активности и кислотостабильных ингибиторов прогрессивно снижался.

3. В бронхоальвеолярном секрете отмечается реактивная активация протеиназ, максимально выраженная при тяжелой форме экспериментального перитонита. Активация трипсино- и эластазоподобных протеиназ сопровождается ростом протеолитической и антитриптической активности и снижением кислотостабильных ингибиторов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Активность протеолитических процессов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости в разные стадии перитонита /Штурич И.П., Шиленок В.Н., Кирпиченок Л.Н. //Новости хирургии. — 2006. — Т. 14, № 2. — С. 13-21.
2. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии /К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. — К.: Здоров'я—1988. — С.199.
3. Гостищев В.К. Перитонит /В.К. Гостищев, В.П. Сажин, А.Л. Авдовенко. — М.: ГЭОТАР-МЕД, — 2002. — С. 240.
4. Гельфанд Е.Б. Абдоминальный сепсис: интегральная оценка тяжести состояния больных и полиорганной дисфункции /Гельфанд Е.Б., Гологорский В.А., Гельфанд Б.Р. //Анестезиология и реаниматология. — 2000. — № 3. — С. 29-33.
5. Гринчук Ф.В. Патогенетичні, клінічні і тактичні особливості гострого перитоніту у хворих із супровідною патологією /Ф.Г. Гринчук, І.Ю. Полянський, В.В. Максим'юк // Шпитальна хірургія. — 2008. — №3. — С.71-74.
6. Кубишкін А.В, Харченко В.З., Семенець П.Ф. та інші. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах. // Методичні рекомендації. - Київ.- 2010. — С.27.
7. Клименко Ю.А. Патогенетичне та клінічне значення порушення мікроелементного гомеостазу у хворих на перитоніт / Ю.А. Клименко //Галицький лікарський вісник. — 2007. — Т.14, №4. — С.53-55.
8. Косинец А.Н Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии /А.Н. Косинец, Л.Н. Кирпиченок. —Витебск, — 2003. — С. 410.
9. Кузин М.И. Синдром системного ответа на воспаление /Кузин М.И. //Хирургия. — 2000. — № 2. — С.54-59.
10. Пат. С1 2338265 Российская Федерация G 09

B23/26. Способ моделирования острого перитонита / Блинков Ю.Ю.; заявитель и патентообладатель Курск. гос. мед. ун-т. - №2007119763/14; заявл. 28.05.2007; опубл. 10.11.2008, Бюл. №31.

11. Характеристика некоторых компонентов системной воспалительной реакции у больных с распространенным перитонитом / Чурляев Ю.А., Григорьев Е.В., Шерстобитов А.В. и др. // Анестезиология и реаниматология. — 2003. — № 3. — С. 25-27.

12. A novel, potent dual inhibitor of the leukocyte proteases cathepsin G and chymase: molecular mechanisms and anti-inflammatory activity in vivo / L. de Garavilla, M. N. Greco, N. Sukumar [et al.] // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280, N 18. — P. 18001–18007.

13. Collagenase 2/matrix metalloproteinase 8 in critically ill patients with secondary peritonitis / J. Hastbacka, M. Hynninen, E. Kolho [et al.] // Shock. —

2007. — Vol. 27, N 2. — P. 145–150.

14. Endogenous IL-10 regulates sepsis-induced thymic apoptosis and improves survival in septic IL-10 null mice / S. K. Tschoeke, C. Oberholzer, D. LaFace [et al.] // Scand. J. Immunol. — 2008. Vol. 68, N 6. — P. 565–571.

15. Changes in the organisms of resistant peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis / H. Nakamoto, Y. Hashikita, A. Itabashi [et al.] // Adv. Perit. Dial. — 2004. — N 20. — P. 52–57.

16. Early procoagulant shift in the bronchoalveolar compartment of patients with secondary peritonitis / J. W. van Till, M. Levi, P. Bresser [et al.] // J. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 194, N 9. — P. 1331–1339.

17. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental Sepsis / H. Tsujimoto, S. Ono, T. Majima [et al.] // Shock. — 2005. — Vol. 23, N 1. — P. 39–44.