

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЗНАЧИМОСТИ ПРОТЕИНАЗ-ИНГИБИТОРНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Бугаенко О.А., Михайличенко В.Ю., Кубышкин А.В.

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, Россия, Республика Крым, г.Симферополь, e-mail: pancreas1978@mail.ru

Проведенные исследования на 26 белых крысах-самцах линии Вистар продемонстрировали, что при развитии экспериментального панкреатита происходит активация протеиназ как местно в перитонеальной жидкости, так и системно – в крови, и дистанционно – в легких. Наиболее выраженной была активация эластазы, как на местном, так и на системном уровне. Это может свидетельствовать о важной роли активации эластазы в патогенезе панкреатита, а на местном уровне эластаза может быть ведущим ферментом, который приводит к деструкции поджелудочной железы. Незначительное увеличение антитрипсиновой активности в перитонеальном секрете и ее снижение в крови, свидетельствует про неадекватный контроль со стороны ингибиторов над увеличением активности протеиназ. Адекватное повышение антитрипсиновой активности определяется только в бронхоальвеолярном секрете, что вероятно носит компенсаторный характер и является одним из факторов защиты легких от системной протеолитической агрессии. При обследовании перитонеальной жидкости в клинике у пациентов с острым панкреатитом в клинической практике, проведены параллели между тяжестью течения заболевания и активностью протеиназ-ингибиторной системы, которая обладает высокой чувствительностью. Проведенное исследование определение активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в перитонеальной жидкости у больных с острым панкреатитом и другими острыми хирургическими абдоминальными патологиями определяют максимальную активность эластоподобных ферментов и других компонентов протеиназ-ингибиторной системы. Активность протеиназ больше выражена при формировании перитонита. Вышеперечисленные факторы позволяют рекомендовать использовать показатели протеиназ-ингибиторной системы при остром панкреатите в клинической практике для прогнозирования течения воспаления в ткани поджелудочной железы и эффективности проводимых лечебных мероприятий.

Ключевые слова: острый панкреатит, протеиназ-ингибиторная система, патогенез.

EXPERIMENTAL AND CLINICAL SUBSTANTIATION OF SIGNIFICANCE OF PROTEASE-INHIBITOR SYSTEM IN ACUTE PANCREATITIS

Bugaenko O.A., Mikhaylichenko V.Y., Kubyshkin A.V.

Medical Academy named after S.I. Georgievskiy, The Federal State Autonomous Educational Establishment of Higher Education "Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky" Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Russia, Republic of Crimea, Simferopol, e-mail: pancreas1978@mail.ru

Studies on 26 white male Wistar rats have demonstrated that the development of experimental pancreatitis activates proteases, locally in the peritoneal secret, systematically – at the blood level, and distantly – at the lung level. The activation of is the most pronounced, elastase at both the local and systemic levels. This may be indicative of the important role of elastase activation in the pathogenesis of pancreatitis, in which, at the local level, the elastase can be a leading enzyme that leads to destruction of the pancreas. A slight increase in the antiprotease activity in the peritoneal secret and its reduction in the blood indicate that the inhibitors control the increase in the activity of proteases inadequately. An adequate raise of the antiprotease activity is observed only in the bronchoalveolar secret, which apparently is of a compensatory character and appears to be a factor protecting the lungs from systemic proteolytic aggression. In the study of the peritoneal fluid from patients with acute pancreatitis in clinical practice, we can see the parallels between the severity of the disease and the activity of proteinase-inhibitor system, which has high sensitivity. Determination of nonspecific proteinases and their inhibitors activity in the peritoneal secret of patients with acute pancreatitis and other forms of acute abdominal pathology showed that in acute pancreatitis is found the maximum activation of the elastase-like enzymes and other components of proteinase-inhibitory system. Activation of proteinases more intensive in patients with peritonitis. These factors make it possible to recommend to use indicators of the proteinase inhibitor system in acute pancreatitis in clinical practice for predicting the course of inflammation in pancreatic tissue and effectiveness of the treatment measures.

Keywords: acute pancreatitis, proteinase-inhibitor system, pathogenesis.

Значительное количество публикаций и рандомизированных исследований в медицинской мировой литературе посвящены вопросам патогенезу, диагностике и лечению острого панкреатита, особое внимание уделяется деструктивным формам, сопровождающиеся большим количеством осложнений и смертности [2,5]. По статистическим данным разных авторов, за последние 10 лет острый панкреатит по частоте возникновения стойко занимает третье место среди острых хирургических заболеваний органов брюшной полости после острого аппендицита и острого холецистита [1]. Важнейшим этапом в лечении данной категории пациентов считают раннюю диагностику деструктивных форм и комплекс консервативных мероприятий, которые принято обозначать термином «базисная терапия», ее основные составляющие: купирование боли и рвоты, коррекция волемиических нарушений и кислотно-основного состояния, купирование расстройств микроциркуляции, торможение внешней секреции поджелудочной железы (ПЖ), активная детоксикация, восполнение дефицита энергии, антимиediatorная терапия, профилактика инфицирования очагов некроза, метаболическая коррекция [3]. Ведущими инструментальными методами ранней диагностики локальных гнойно-септических осложнений острого некротического панкреатита являются УЗИ и КТ органов брюшной полости. Необходим дифференцированный подход в выборе лечебной тактики при деструктивном панкреонекрозе: лечение гнойно-септических осложнений должно проводиться с учетом выявленной патологии, требующей соответствующего метода консервативной терапии и выбора объема оперативного вмешательства [4]. Таким образом, оправданы все попытки определения раннего биохимического маркера начала деструктивного процесса в ткани поджелудочной железы, когда инструментальные исследования являются малоинформативными.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на белых крысах-самцах линии "Вистар" массой 180-210 г. Острый панкреатит моделировали путём выполнения срединной лапаротомии, выделения поджелудочной железы и наложения лигатуры на главный её проток возле места впадения его в 12-перстную кишку, после чего переднюю брюшную стенку ушивали наглухо. Операция проводилась под эфирным наркозом. Забой животных осуществляли под эфирным наркозом 48 часов после развития острого панкреатита.

Клинические исследования проведены у больных, поступивших в отделение хирургии 7 городской больницы г. Симферополя. Все больные нуждались в экстренном хирургическом лечении в связи с острой патологией органов брюшной полости. Всего был обследован 51 человек с оперативными вмешательствами по поводу острого панкреатита, острого

аппендицита, холецистита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Течение послеоперационного периода у 22 обследованных сопровождалось развитием перитонита.

Исследования проводили в сыворотки крови, бронхоальвеолярном смыве (БАС) и перитонеальном смыве у крыс в эксперименте и в перитонеальном содержимом в клинической части работы. Определение трипсиноподобной активности. Принцип метода основан на измерении скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N- α -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal). Определение эластазоподобной активности. Принцип метода основан на гидролизе синтетического субстрата N-t-вос-аланил-p-нитрофенилового эфира (БАНФЭ). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ. Принцип метода основан на торможении расщепления трипсином белковых и низкомолекулярных субстратов этилового эфира N- α -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal). Уровень кислотостабильных ингибиторов (КСИ) определяли по расщеплению синтетического субстрата бензоил-D-аргинина-паранитроанилид-монохлорида (БАПНА). Концентрацию белка определяли методом Лоури. Полученные результаты подвергали статистической обработке.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных экспериментальных исследований было выявлено, что через 48 часов с момента перевязки протока поджелудочной железы активность α -амилазы возросла по сравнению с контролем в 2,3 раза (табл.1). С развитием острого панкреатита рост активности эластазоподобных протеиназ составил 1,6 раза. Трипсиноподобная активность при этом не претерпела существенных изменений. Ингибиторная активность альфа-1-ингибитора протеиназ снизилась и составила 88% от исходного уровня.

Таблица 1

Изменения в протеиназ-ингибиторной системе в различных средах крыс при развитии острого панкреатита (M \pm m)

Группа	Среда	α -амилаза г/ч л	ТПА (нМоль/мл мин)	ЭПА (нМоль/мг мин)
Контроль	Кровь	97,5 \pm 3,41	0,24 \pm 0,04	1,5 \pm 0,06
	Перитонеальный смыв	8,18 \pm 0,97	3,17 \pm 0,06	0,89 \pm 0,16
Острый панкреатит	Кровь	224,32 \pm 0,84*	0,22 \pm 0,05	2,4 \pm 0,09*
	Перитонеальный смыв	10,76 \pm 0.15	1,32 \pm 0,07*	3,69 \pm 0,07*

Примечание: звездочками показана достоверность различий по отношению к контролю: * – p<0,05.

Исследование перитонеального смыва крыс в эксперименте показало (табл.1), что к 48 часам развития острого панкреатита увеличение показателей активности α -амилазы в 1,3 раза относительно контроля. Также выявлена тенденция роста ЭПА по мере развития воспалительной реакции. Рост активности эластазоподобных протеиназ к 48 часам панкреатита составил по сравнению с контролем 1,5 раза. На фоне роста ЭПА имеет место увеличение антитриптической активности перитонеального секрета на 14% относительно контроля. Таким образом, реакция перитонеального смыва характеризуется увеличением активности α -амилазы. Однако более показательным для перитонеального секрета является уровень эластазы, активность которой в отличие от сыворотки крови увеличивалась более значительно.

Подобная реакция протеиназ-ингибиторной системы на развитие острого панкреатита выявлена нами в бронхоальвеолярном секрете (табл.2). Эластазоподобная активность БАС увеличилась к 48 часам с момента развития острого панкреатита по сравнению с контролем в 1,6 раза. Вместе с тем, значения ингибиторной активности БАС также увеличиваются, что говорит о формировании дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе при развитии острого панкреатита в эксперименте. АТА по сравнению с контрольными данными увеличилась в 1,4 раза. Уровень КСИ к 48 часам от начала эксперимента увеличился в 2,4 раза по сравнению с контролем.

Таблица 2

Изменения в протеиназ-ингибиторной системе бронхо-альвеолярного смыва крыс при остром панкреатите ($M \pm m$)

	ЭПА (нМоль/мг мин)	АТА (мкМоль/мг)	КСИ (мкМоль/мг)
Контроль	0,96 \pm 0,09	0,39 \pm 0,06	0,15 \pm 0,03
Острый панкреатит	1,49 \pm 0,15*	0,55 \pm 0,05*	0,36 \pm 0,02*

Примечание: звездочками показана достоверность различий по отношению к контролю: * – $p < 0,05$.

При исследовании протеиназ-ингибиторной системы сыворотки крови, перитонеального и бронхоальвеолярного смывов выявлено повышение уровня амилазы сыворотки крови, эластазоподобной, трипсиноподобной активности и снижение антитриптической активности и уровня кислотостабильных ингибиторов во всех видах исследуемого материала. В контрольной группе животных таких изменений не выявлено, что подтверждает развитие протеиназ-ингибиторного дисбаланса как одного из существенных факторов развития системных изменений при панкреатите.

В клиническом исследовании показателей протеиназ-ингибиторного баланса перитонеального смыва у больных с различными формами острой абдоминальной патологии

показало, что острый воспалительный процесс в абдоминальной полости приводит к увеличению концентрации белка, росту эластазоподобной активности, снижению ТПА и увеличению АТА (табл.3). Минимальные значения белка в перитонеальном смыве обнаружены у больных с острым холециститом, причем в этой группе больных визуально определялось минимальное вовлечение брюшины в патологический процесс. При язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки белок в перитонеальном смыве был выше в 2,7 раза по сравнению с показателями у больных острым холециститом. Для острого аппендицита, уровень белка перитонеального смыва по сравнению данными у больных холециститом был выше в 3,8 раза. Наиболее высокий уровень белка отмечался в группе больных с панкреатитом. У этих больных насыщенность перитонеального секрета белком была более чем в 6 раз выше, по сравнению с группой больных с холециститом.

Интересные тенденции отмечены при анализе показателей протеолитической активности. Уровень эластазоподобной активности в перитонеальном секрете был максимальным в группе больных с панкреатитом и превышал соответствующие значения больных с острым холециститом в 5,4 раза. При язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки уровень ЭПА был в 2,4 раза, при остром аппендиците в 3,4 раза выше, чем у больных с острым холециститом.

Таблица 3

Состояние протеиназ-ингибиторного баланса перитонеального смыва у больных с острой абдоминальной патологией (M±m)

	Белок (мг/мл)	ЭПА (нМ/мг мин)	ТПА (мкМ/мгмин)	АТА (мкМ/мг)	КСИ (мкМ/мг)
Острый холецистит (n=12)	0,32±0,03	10,14±0,96	1,61±0,11	0,12±0,01	1,16±0,11
ЯБЖ и ДПК (n=16)	0,84±0,04*	23,65±1,45*	0,75±0,06*	0,37±0,03*	0,39±0,06*
Острый аппендицит (n=10)	1,20±0,04*	34,36±1,94*	0,20±0,05*	0,52±0,03*	0,76±0,07*
Острый панкреатит (n=13)	1,98±0,34*	54,5±8,8*	11,3±2,5*	2,21±0,14*	2,17±1,17*

Примечание: звездочками обозначена достоверность различий по отношению к группе больных с острым холециститом: *-p<0,05.

Уровень трипсиноподобной активности в перитонеальном смыве у больных острым панкреатитом был в 7 раз выше, чем у больных острым холециститом. А у больных с язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки и аппендицитом обнаруживалась противоположная динамика. Значения ТПА у больных с язвенной болезнью желудка и

12-перстной кишки были ниже, чем у больных острым холециститом в 2,1 раза, а у больных с острым аппендицитом в 8 раз.

Следует отметить, что рост активности протеиназ сопровождался и ростом ингибиторного потенциала. По-видимому, реакция со стороны ингибиторов отражает степень активации протеиназ ингибиторной системы и направлена на противодействие активации протеиназ в перитонеальном секрете. Причем в группе больных с острым панкреатитом антитриптическая активность перитонеального смыва была наиболее высокой и в 18 раз превышала значения АТА у больных с острым холециститом, в 6 раз у больных с язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки и 4,2 раза у больных с аппендицитом.

Несколько различалась реакция местносинтезируемых кислотостабильных ингибиторов протеиназ в перитонеальном секрете. Максимальный их уровень отмечен у больных с панкреатитом. В группе больных с холециститом значения КСИ были почти в 2 раза ниже, а в группах с язвенной болезнью и аппендицитом уровень КСИ по сравнению с панкреатитом был в 3-5 раз ниже, что может свидетельствовать об уменьшении синтеза и секреции этих ингибиторов. Сопоставление результатов состояния протеиназ-ингибиторной системы в перитонеальном секрете у больных с перитонитом и без перитонита показало, что наличие перитонита проявляется более выраженной активацией протеиназ не зависимо от первичной патологии. В брюшной полости развитие перитонита сопровождалось закономерным увеличением уровня белка (табл. 4). Белок в перитонеальном смыве у больных с острой абдоминальной патологией, осложненной развитием перитонита, в 4,2 раза превышает аналогичный показатель у больных без развития перитонита.

Таблица 4

Состояние протеиназ-ингибиторного баланса перитонеального смыва у больных с перитонитом и без него (M±m)

	Белок (мг/мл)	ЭПА (нМ/мг мин)	ТПА (мкМ/мгмин)	АТА (мкМ/мг)	КСИ (мкМ/мг)
Патология без перитонита (n=29)	0,30±0,03	10,14±1,21	1,42±0,11	0,13±0,01	0,95±0,06
Патология с перитонитом (n=22)	1,26±0,09*	27,04±2,17*	2,89±0,07*	0,97±0,05*	1,67±0,05*

Примечание: звездочками обозначена достоверность различий по отношению к группе больных без перитонита: *-p<0,05.

Динамика изменений активности протеиназ и ингибиторного потенциала свидетельствовала о более выраженной активации протеиназ-ингибиторной системы перитонеального секрета у больных с формированием перитонита. Так, активность трипсиноподобных протеиназ у больных с перитонитом была в 2 раза выше по сравнению с

больными без перитонита. Активность эластазоподобных протеиназ у больных с перитонитом была выше почти в 3 раза, что может свидетельствовать на усиление процессов деструкции в брюшной полости. На этом фоне у больных с перитонитом установлены в 7,5 раз более высокие цифры свободной антитриптической активности и почти в 2 раза более высокий уровень кислотостабильных ингибиторов, что также свидетельствует о более выраженной активации протеиназ при перитоните.

Из представленных данных, мы видим, что характерной реакцией на развитие патологии в брюшной полости является выраженное увеличение активности эластазоподобных протеиназ, обладающих выраженным деструктивным потенциалом. Рост трипсиноподобных ферментов, а также антитриптической активности и кислотостабильных ингибиторов также свидетельствует о степени выраженности изменений в перитонеальном секрете.

Формирование острого панкреатита проявляется наиболее выраженной активацией протеиназ в перитонеальном секрете. По-видимому, параллельный рост ингибиторов не в достаточной степени способен компенсировать действие протеиназ и их активация существенно усиливает риск формирования перитонита и системных осложнений. Это указывает на потенциальную диагностическую ценность определения протеиназ в перитонеальном секрете для оценки степени тяжести и прогноза течения панкреатита и другой абдоминальной патологии. Учитывая, что на данный момент времени не существует универсального и достоверного биохимического показателя, оценивающего активность и динамику протекания деструктивного панкреатита, то изучение протеиназ-ингибиторной системы представляет интерес как для патофизиологов, так и для клиницистов. Благодаря своей простоте выполнения определения и дешевизной необходимого для этого оборудования и реактивов, может обосновано использовать для скрининг метода определения течения острого панкреатита и оценивать эффективность его терапии.

Выводы: Степень активности протеиназ-ингибиторной системы, а также баланс конкурирующих систем, позволяет определить степень активности процесса, в частности при изучении в различных средах (кровь, альвеолярно-бронхиальный смыв, перитонеальное содержимое) и вовлечение их в патологический процесс. По степени нормализации показателей протеиназ-ингибиторной системы в динамике, можно оценить эффективность применяемой терапии и течение патологического процесса. Степень активации компонентов протеиназ-ингибиторной системы в перитонеальном секрете может свидетельствовать о тяжести течения абдоминальной патологии, указывать на степень риска системных изменений и их определение может быть эффективным маркером прогноза течения абдоминальной патологии.

Список литературы

1. Агаев Б.А. Микроциркуляторные нарушения в диагностике острого билиарного панкреатита / Б.А. Агаев, З.Э.Джафарли // Лазерная медицина.- 2011.-№ .-С.236-236.
2. Волков В.Е. Острый некротический панкреатит: актуальные вопросы классификации, диагностики и лечения локальных и распространенных гнойно-некротических процессов / В.Е. Волков, Н.Н. Чеснокова // Вестник Чувашского университета.- 2014.- № 2. -С. -211-217.
3. Гусейнов А.З. Острый панкреатит как медикосоциальная проблема в структуре ургентной абдоминальной хирургической патологии / А.З. Гусейнов, Д.В. Карапыш // Вестник новых медицинских технологий.-2010.-Т.17.-№3.-С.198-200.
4. Дифференциальная диагностика механической и динамической кишечной непроходимости / Вороной А.Л., Михайличенко В.Ю., Миминошвили А.О., Сабодаш А.В. // Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2012. Т. 13. № 2. С. 234-238.
5. Клинико-диагностические параллели при остром панкреатите / Бугаенко О.А., Михайличенко В.Ю., Кубышкин А.В., Старых А.А. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5; URL: www.science-education.ru/128-21722.

Рецензенты:

Антонюк О.С., д.м.н., профессор, заместитель директора Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака по научной работе, г. Донецк;

Крутиков Е.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней Медицинской академии имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь.