

© Федосов М.И., Кубышкин А.В., Анисимова Л.В., Асриянц С.Ю., Калиновский О.А.

УДК: 616-092.18+616-092.08+616-003.215:577.17+577.15

**Федосов М.И., Кубышкин А.В., Анисимова Л.В., Асриянц С.Ю., Калиновский О.А.**

Крымский государственный медицинский университет имени С.И.Георгиевского, кафедра патологической физиологии (бульвар Ленина 5/7, г. Симферополь, 295006, Крым)

## ИЗМЕНЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ, ИХ ИНГИБИТОРОВ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С КРИТИЧЕСКИМИ СОСТОЯНИЯМИ

**Резюме.** Исследовали состояния протеиназ-ингибиторной системы и систему провоспалительных цитокинов сыворотки крови пациентов с критическими состояниями различной этиологии в зависимости от исхода заболевания. Результаты показали, что при критических состояниях, независимо от этиологии, в случае неблагоприятного исхода заболевания, в протеиназ-ингибиторной системе развивается более выраженный дисбаланс, связанный с активацией и прогрессивным ростом протеиназ, угнетением их ингибиторов, и более высокие уровни провоспалительных цитокинов с тенденцией к их прогрессивному росту в течение 5 суток после госпитализации.

**Ключевые слова:** протеиназы, ингибиторы протеиназ, цитокины, критические состояния.

### Введение

Современные достижения медицины неотложных состояний позволили существенно повысить выживаемость больных с критическими состояниями различной этиологии, госпитализированных в отделения интенсивной терапии. В то же время, тенденция к снижению смертности в остром периоде критических состояний сопровождается увеличением количества пациентов, основной причиной гибели которых являются отдалённые осложнения, включающие развитие синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) [Krau, 2007; Кижаяева, Закс, 2004; Dewar, 2009].

В настоящее время патогенез СПОН всё чаще рассматривается с точки зрения развития синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) [Lenz, 2007; Dahiya, 2009]. Считается, что при воздействии повреждающего фактора и генерализации активации маркеров повреждения, запускаются системные провоспалительные и иммунные механизмы. Это влечёт за собой нарушение функций калликреин-кининовой, оксидантной систем, комплемента, гемокоагуляции, кислотно-щелочного равновесия и других [Брехов, 2008; Wang, Ma, 2008].

Из пусковых факторов системной активации ключевая роль в развитии ССВР придаётся цитокинам [Schmitz, 2011]. При выраженном локальном воспалении или несостоятельности ограничивающих его механизмов некоторые цитокины (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10) проникают в системную циркуляцию, оказывая различные дистантные эффекты, в большей степени регуляторного характера [Jaffer, 2010]. С другой стороны, важную роль в патогенезе ССВР может играть системная активация протеолитических ферментов на фоне угнетения функции сывороточных и тканевых ингибиторов протеолиза [Douvas, 2005; Naayama, 2006; Fujimura, 2013]. Причём, считается, что протеиназы в большей степени выполняют роль эффекторных факторов, которые оказывают основное повреждающее воздействие на регуляторные и тканевые структуры.

Таким образом, изучение характера изменений не-

специфических протеиназ и их ингибиторов в сопоставлении с реакциями других провоспалительных факторов может стать основой поиска эффективных критериев, используемых для прогнозирования исхода критических состояний и контроля адекватности проводимых лечебных мероприятий в клинике [Scoletta, 2012; Prondzinsky, 2012; Cotanen, 2013; Faix, 2013].

Целью настоящего исследования явилось изучить характер изменений в неспецифических протеиназах, их ингибиторах и провоспалительных цитокинах в сыворотке крови пациентов с критическими состояниями различной этиологии в зависимости от исхода заболевания.

### Материалы и методы

Исследование проведено на 54 пациентах с критическими состояниями различной этиологии, включая осложнённый и неосложнённый острый инфаркт миокарда, тяжёлую скелетную травму, тяжёлую черепно-мозговую травму, тупую травму живота, геморрагический шок, ожоговый шок различной степени тяжести, острую кишечную непроходимость, перитонит, острый панкреатит, панкреонекроз. Все пациенты были разделены на 2 группы: первая группа (n=25) включала пациентов с благоприятным исходом (выздоровление), вторая (n=19) - пациентов с неблагоприятным исходом (летальный исход в течение 10-15 суток). Контрольную группу составили 10 практически здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу.

Определение активности неспецифических протеиназ, их ингибиторов и концентрации провоспалительных цитокинов проводили в сыворотке венозной крови пациентов, полученной на 1, 3 и 5 сутки после поступления в стационар.

Определение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы проводили с использованием энзиматических методов [Кубышкин, 2010] на спектрофотометре "Biomat 5" (Великобритания). Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости

отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N- $\alpha$ -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.

Определение концентрации основных провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов компании "Вектор-Бест" (Россия). Результаты фиксировали с использованием микропланшетного сканера с длиной волны 450 нм.

Статистическая обработка полученных данных проведена при помощи 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. Обсуждение

Полученные результаты показали, что при развитии критических состояний в протеиназ-ингибиторной системе сыворотки крови пациентов развивается дисбаланс с активацией протеиназ и снижением контроля со стороны ингибиторов (табл. 1). Причём, динамика показателей активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы различается в зависимости от исхода заболевания.

При благоприятном исходе критических состояний в первые сутки после поступления отмечается максимальное повышение ЭПА, более чем в 5 раз по отношению к контролю, с последующей тенденцией к снижению до значения, превышающего контрольное, бо-

лее чем в 2 раза. В случае неблагоприятного исхода, напротив, первоначальное значение ЭПА превышает контрольное в 2 раза, однако имеет тенденцию к прогрессивному росту и достигает максимального к 5-м суткам после госпитализации, при этом превышая соответствующее значение в группе с благоприятным исходом почти в 5 раз.

ТПА в течение 5 суток после поступления при благоприятном исходе выявляет тенденцию к незначительному росту с последующим снижением до первоначального значения, которое превышает контрольное почти на 40%. При неблагоприятном исходе указанный показатель изначально имеет более высокие значения с тенденцией к их дальнейшему росту. Максимальное значение в этой группе, достигаемое на 5 сутки, превышает соответствующее в группе с благоприятным исходом почти в 1,5 раза.

В динамике показателей АТА выявлено постепенное её возрастание при благоприятном исходе до значения, превышающего контрольное почти на 25%. При неблагоприятном исходе первоначальное значение АТА превышает контрольное на 16%, а к 5 суткам снижается до значения, близкого к контрольному.

Активность КСИ при благоприятном исходе, изначально превышающая контрольное значение на 5%, к 5 суткам становится почти на 10% ниже последнего. При неблагоприятном исходе отмечается тенденция к более выраженному прогрессивному снижению указанного показателя до значения, почти в 1,5 раза ниже контрольного.

В системе провоспалительных цитокинов уровень IL-1 $\beta$  в сыворотке крови пациентов с благоприятным исходом, изначально превышающий контрольное значение более чем в 6 раз, имеет тенденцию к снижению в течение 5 суток после госпитализации (табл. 2). В случае неблагоприятного исхода отмечается обратная тенденция, связанная с повышением этого показателя, причём первоначальное его значение превышает таковое в группе с благоприятным исходом почти в 1,5 раза.

**Таблица 1.** Динамика изменений показателей активности протеиназ-ингибиторной системы крови пациентов с критическими состояниями различной этиологии (M $\pm$ m).

| Группа                       | День от момента поступления | ЭПА (нМоль/мл*мин)  | ТПА (нМоль/мл*мин) | АТА (мкМоль/мг) | КСИ (мкМоль/мг)   |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Контроль (n=10)              |                             | 0,12 $\pm$ 0,04     | 0,28 $\pm$ 0,06    | 29,4 $\pm$ 1,3  | 5,8 $\pm$ 0,5     |
| Благоприятный исход (n=25)   | 1                           | 0,62 $\pm$ 0,1*,**  | 0,39 $\pm$ 0,03    | 34,1 $\pm$ 3,1  | 6,1 $\pm$ 0,5     |
|                              | 3                           | 0,61 $\pm$ 0,1*     | 0,42 $\pm$ 0,04    | 35,95 $\pm$ 3,2 | 5,7 $\pm$ 0,3**   |
|                              | 5                           | 0,27 $\pm$ 0,01**   | 0,39 $\pm$ 0,03    | 36,6 $\pm$ 3,3  | 5,5 $\pm$ 0,3**   |
| Неблагоприятный исход (n=19) | 1                           | 0,36 $\pm$ 0,04*,** | 0,44 $\pm$ 0,04*   | 34,2 $\pm$ 2,7  | 5,5 $\pm$ 0,3     |
|                              | 3                           | 0,95 $\pm$ 0,2*     | 0,49 $\pm$ 0,05*   | 29,3 $\pm$ 1,5  | 4,6 $\pm$ 0,3**   |
|                              | 5                           | 1,17 $\pm$ 0,2*,**  | 0,56 $\pm$ 0,08*   | 29,7 $\pm$ 1,5  | 3,9 $\pm$ 0,3*,** |

**Примечание:** (здесь и в последующем) звёздочками отмечена достоверность отличий: \* - по отношению к контролю, \*\* - по отношению к показателям в соответствующие сроки при благоприятном и неблагоприятном исходах. Для всех значений достоверность отличий по отношению к контролю  $p < 0,05$ .

**Таблиця 2.** Динамика изменений уровня провоспалительных цитокинов сыворотки крови пациентов с критическими состояниями различной этиологии (M±m).

| Группа                       | День от момента поступления | IL-1β (пг/мл) | IL-6 (пг/мл)    | TNF-α (пг/мл) |
|------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------|---------------|
| Контроль (n=10)              |                             | 0,16±0,02     | 21,4±5,3        | 1,07±0,06     |
| Благоприятный исход (n=25)   | 1                           | 0,99±0,1*,**  | 109,98±10,9*,** | 8,91±0,6*     |
|                              | 3                           | 0,77±0,06*,** | 59,74±4,2*,**   | 8,54±0,6*     |
|                              | 5                           | 0,69±0,05*,** | 36,54±1,8*,**   | 7,63±0,4*     |
| Неблагоприятный исход (n=19) | 1                           | 1,55±0,28*,** | 206,27±30,9*,** | 11,13±1,9*    |
|                              | 3                           | 2,27±0,5*,**  | 196,46±29,5*,** | 12,39±2,1*    |
|                              | 5                           | 2,75±0,6*,**  | 238,9±47,8*,**  | 7,96±0,6*     |

Уровень IL-6 у пациентов с благоприятным исходом, изначально превышающий контрольное значение более чем в 5 раз, также имеет тенденцию к прогрессивному снижению в течение 5 суток. В случае неблагоприятного исхода отмечаются более высокие уровни указанного показателя и противоположная тенденция, связанная с его ростом. При этом, первоначальное значение превышает таковое в группе с благоприятным исходом почти в 2 раза.

Уровень TNF-α у больных с благоприятным исходом, превышая контрольное значение более чем в 8 раз в первые сутки, постепенно снижается в течение 5 суток после госпитализации. У больных с неблагоприятным исходом отмечаются более высокие значения указанного показателя с тенденцией к росту к 3м суткам и последующему снижению к 5 суткам после госпитализации. При этом первоначальный уровень TNF-α превышал таковой в группе с благоприятным исходом почти на 25%.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что в сыворотке крови больных с критическими состояниями отмечается выраженная активация систем, отвечающих за развитие воспалительного процесса. У поступивших больных, независимо от характера развивающейся патологии, выявлена значительная активация как провоспалительных цитокинов, так и неспецифических протеиназ. Следует отметить, что при этом уровень всех цитокинов превосходил контрольные показатели в 5-15 раз. Аналогичная закономерность отмечена для эластазоподобной активности. В то же время, сравнение исходных значений в

группах с благоприятным и неблагоприятным исходами показывает, что в последнем случае уровень провоспалительных цитокинов был выше в 1,5-2 раза.

Отличалась и дальнейшая динамика изученных показателей в обеих группах больных. В группе с благоприятным исходом отмечалось снижение уровня провоспалительных цитокинов и активности протеиназ на фоне стабильных и относительно высоких показателей активности их ингибиторов. В группе с неблагоприятным исходом, напротив, на фоне более выраженной исходной активации цитокинов и протеиназ отмечалась тенденция к дальнейшему росту этих показателей. По всей видимости, рост активации провоспалительных цитокинов и протеиназ свидетельствует о дальнейшем прогрессировании патологического процесса, развитии ССВР и, в комплексе с оценкой клинических данных, может рассматриваться в качестве маркера, указывающего на высокую вероятность развития неблагоприятного исхода критического состояния.

### Выводы и перспективы дальнейших разработок

Развитие критических состояний, независимо от их этиологии, сопровождается активацией провоспалительных цитокинов и неспецифических протеиназ сыворотки крови, что проявляется повышением уровня цитокинов и активности протеиназ. При неблагоприятном исходе критических состояний активация провоспалительных цитокинов и протеиназ более выражена.

Динамика изменений уровня провоспалительных цитокинов и неспецифических протеиназ сыворотки крови зависит от исхода критических состояний. При благоприятном исходе отмечается тенденция к снижению уровней провоспалительных цитокинов и активности неспецифических протеиназ, при неблагоприятном - к повышению указанных показателей.

Активация неспецифических протеиназ и провоспалительных цитокинов при неблагоприятном исходе критических состояний можно расценивать как прогрессирование ССВР. Исследование динамики изменений уровня цитокинов, неспецифических протеиназ и их ингибиторов может быть использовано в качестве показательных маркеров для прогнозирования исхода заболевания и контроля эффективности проводимого лечения, что требует дальнейшего изучения.

### Список литературы

- Кижяева Е.С. Полиорганная недостаточность в интенсивной терапии /Е.С. Кижяева, И.О.Закс //Вестник интенсивной терапии.- 2004.- №1.- С.12-24.
- Современный взгляд на проблему критических состояний в хирургической клинике /Е.И. Брехов, И.Н.Пасечник, В.В.Калинников [и др.] // Российские мед. вести.- 2008.- №3.- С.17-22.
- Biomarkers as predictors of outcome after cardiac arrest /S.Scolletta, K.Donadello, C.Santonocito [et al.] //Expert Rev. Clin. Pharmacol.- 2012.- Vol.5(6).- P.687-699.
- Cotanen C.N. Monitoring systems and quantitative measurement of biomolecules for the management of trauma /C.N.Kotanen, A.Guiseppi-Elie //Biomed. Microdevices.- 2013.- Vol.15(3).- P.561-577.
- Dahiya P. Burns as a model of SIRS / P.Dahiya //Front. Biosci (Landmark Ed).- 2009.- Vol.14.- P.4962-4967.
- Douvas S. Anti-Inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor /S.Douvas, A.Kolokotronis, P.Stefanopoulos // Infection and Immunity.- 2005.- V.73,

- №3.- P.1271-1274.  
 Faix J.D. Biomarkers of sepsis /J.D.Faix // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.- 2013.- Vol.50(1).- P.23-36.  
 Fujimura N. Neutrophil elastase inhibitor improves survival rate after ischemia reperfusion injury caused by supravisceral aortic clamping in rats / N. Fujimura, H. Obara, K. Suda [et al.] //J. Surg. Res.- 2013.- Vol.180(1).- P.31-36.  
 Hayama T. Beneficial effect of neutrophil elastase inhibitor on renal warm ischemia-reperfusion injury in the rat /T.Hayama, M.Matsuyama, K.Funao //Transplant Proc.- 2006.- V.38, №7.- P.2201-2203.  
 Jaffer U. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review /U.Jaffer, R.G.Wade, T.Gourlay /HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth.- 2010.- Vol.2(3).- P.161-175.  
 Interleukin-6, -7, -8 and -10 predict outcome in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock / R.Prondzinsky, S.Unverzagt, H.Lemm [et al.] //Clin. Res. Cardiol.- 2012.- Vol.101(5).- P.375-384.  
 Krau S.D. Making sense of multiple organ dysfunction syndrome /Krau S.D. // Crit. Care Nurs. Clin. North. Am.- 2007.- Vol.19 (1).- P.87-97.  
 Lenz A. Systemic inflammation after trauma /A.Lenz, G.A.Franklin, W.G.Cheadle //Injury.- 2007.- Vol.38(12).- 1336-1345.  
 Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines / M.L.Schmitz, A.Weber, T.Roxlau [et al.] //Biochim. Biophys. Acta.- 2011.- Vol.1813 (12).- P.2165-2175.  
 Wang H. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome /H.Wang, S.Ma //Am. J. Emerg. Med.- 2008.- Vol.26 (6).- P.711-715.

**Федосов М.І., Кубишкін А.В., Анісімова Л.В., Асріянець С.Ю., Калиновський О.А.**

### ЗМІНИ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕІНАЗ, ЇХ ІНГІБІТОРІВ І ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У КРОВІ ХВОРИХ НА КРИТИЧНІ СТАНИ

**Резюме.** Проведено дослідження стану протеїназ-інгібіторної системи та системи прозапальних цитокінів сироватки крові пацієнтів з критичними станами різної етіології в залежності від наслідків захворювання. Результати показали, що при критичних станах, незалежно від етіології, у випадку летальних наслідків захворювання, в протеїназ-інгібіторній системі розвивається виражений дисбаланс, пов'язаний з активацією та прогресивним ростом протеїназ, пригніченням їх інгібіторів, та відмічаються більш високі рівні прозапальних цитокінів з тенденцією до їх прогресивного росту протягом 5 діб після госпіталізації.

**Ключові слова:** протеїнази, інгібітори протеїназ, цитокіни, критичні стани.

**Fedosov M.I., Kubyshekin A.V., Anisimova L.V., Asriyanc S.Y., Kalinovskiy O.A.**

### CHANGES OF NON-SPECIFIC PROTEINASES, THEIR INHIBITORS AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE SERUM OF PATIENTS ON THE CRITICAL STATES

**Summary.** It was made the study of proteinase-inhibitor and proinflammatory cytokines systems' condition in the serum of critically ill patients with various diseases depending on the outcome. The results had showed that in critical conditions, independently of etiology, in the case of an unfavorable outcome in proteinase - inhibitor system develops more pronounced imbalance associated with the activation and progressive growth of proteinases, oppression of their inhibitors, and higher levels of proinflammatory cytokines with their tendency to progressive growth within 5 days after hospitalization.

**Key words:** proteinases, proteinase inhibitors, cytokines, critical conditions.

Стаття надійшла до редакції 21.04.2014 р.

Федосов Михайло Ігорович - аспірант кафедри патологічної фізіології Кримського державного медичного університету; +38 095 078-86-64; mifedosov@mail.ru

Кубишкін Анатолій Володимирович - д. мед. н., професор, завідувач кафедри патологічної фізіології Кримського державного медичного університету; +38 050 294-14-44; anatoly2802@gmail.com

Анісімова Людмила Василівна - к.мед.н., доцент кафедри патологічної фізіології Кримського державного медичного університету; +38 050 961-22-35; anisanisl@mail.ru

Асріянець Сергій Юрійович - зав. відділенням анестезіології та інтенсивної терапії МКЛ ШМД №6 м. Сімферополя; +38 050 509-61-69; ass1965@mail.ru

Калиновський Олег Анатолійович - зав. відділенням анестезіології та інтенсивної терапії МКЛ №7 м. Сімферополя; +38 050 943-97-64; koa101@mail.ru

© Гальчин К.С.

УДК: 616.89-008.444.053.2

Гальчин К.С.

Національна медична академія післядипломної освіти, кафедра дитячої, соціальної та судової психіатрії (вул. Фрунзе, 103-А, м.Київ, 04080, Україна)

## ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ПОРУШЕНЬ ПСИХІКИ ТА ПОВЕДІНКИ У ДІТЕЙ З РОЗЛАДАМИ АУТИСТИЧНОГО СПЕКТРУ

**Резюме.** В цій статті публікуються дані досліджень особливостей порушень психіки та поведінки дітей з розладами розвитку зі спектру аутизму. Дослідженню підлягало 56 дітей різних вікових груп: від раннього дитинства до підліткового віку. Досліджені відмінності у порушенні психіки та поведінки дітей різного віку з розладами аутистичного спектру. В залежності від вікових особливостей цих порушень автор пропонує диференційований підхід до медико-корекційної роботи.

**Ключові слова:** аутизм, діти, вікові особливості, корекція.