

И.П. ШТУРИЧ, В.Н. ШИЛЕНКО, Л.Н. КИРПИЧЕНКО

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В РАЗНЫЕ СТАДИИ ПЕРИТОНИТА

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

В статье представлены результаты исследования активности протеолитических процессов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости у 42 больных перитонитом в разные стадии заболевания. Установлено, что при перитоните происходят изменения активности и/или содержания компонентов системы протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости в зависимости от стадии перитонита. В сыворотке крови наиболее значимым изменениям подвергается общая протеолитическая активность, которая в стадию полиорганной недостаточности увеличивается в 13,4 раза по сравнению с токсической стадией. В перитонеальной жидкости наиболее лабильным является α_1 -протеиназный ингибитор, который резко снижается в токсической стадии – в 3,2 раза по сравнению с реактивной стадией, а затем вновь растет. Повышение общей протеолитической активности в сыворотке крови более 100 нмоль/л^{Чс} является критерием перехода токсической стадии перитонита в стадию полиорганной недостаточности. Снижение содержания α_1 -антипротеиназного ингибитора в перитонеальной жидкости менее 0,4 г/л является критерием перехода реактивной стадии перитонита в токсическую. Источником протеиназ и их эндогенных ингибиторов является не только печень, но и клетки крови – моноциты, лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы. В соответствии с обнаруженными корреляционными взаимоотношениями, в разные стадии перитонита участвуют различные клетки.

Тяжесть течения перитонита определяет стратегию лечебных мероприятий для каждого больного. Существующие методы оценки тяжести течения перитонита не всегда позволяют определить состояние больного, степень интоксикации и, как следствие, назначить адекватное лечение.

Цель настоящего исследования – на основе исследования интенсивности протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости изучить возможность использования показателей активности протеолитических процессов для оценки тяже-

сти течения перитонита и прогнозирования исхода заболевания.

Для этого мы исследовали интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости у больных перитонитом на различных стадиях заболевания.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила сыворотка крови и перитонеальная жидкость 42 больных перитонитом (13 больных в реактивной стадии, 14 больных в токсической стадии).

ческой стадии и 15 больных в стадии полиорганной недостаточности).

В сыворотке крови и перитонеальной жидкости определяли общую протеолитическую активность (ОПА) по методу Erlanger B.F. et al. [4] с нашими модификациями, используя в качестве субстрата N-а-бензоил-D,L-аргинина паранитроанилида (БАПНА). Основой для определения активности ингибиторов служил метод, предложенный Т.А. Хватовым и В.Б. Беловой [3]. Определяли α_1 -антипротеиназный ингибитор (АПИ), α_2 -макроглобулин (МГ), суммарную ингибиторную емкость (СИЕ) (соответствовала сумме активности основных ингибиторов – АПИ + МГ) и индекс протеолиза (ИП). Индекс протеолиза (соотношение общей протеолитической активности к сумме активности основных ингибиторов протеиназ) отражает напряженность или «управляемость» протеолитических процессов.

Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что в реактивную стадию перитонита в сыворотке крови наблюдался рост активности одного из основных ингибиторов протеиназ – АПИ на 46,95% при практически неизменном содержании

МГ, что приводило к росту СИЕ на 24,27% (табл. 1). Одновременно происходило снижение общей протеолитической активности на 45,43% (табл. 1). Индекс протеолиза при этом также уменьшался (на 56,22%).

В реактивную стадию перитонита имела место четкая корреляционная зависимость между количеством сегментоядерных лейкоцитов и ОПА ($r=0,69$, $p=0,025$), а также между содержанием этих лейкоцитов и ИП ($r=0,804$, $p=0,009$).

Наблюдаемые изменения, по-видимому, связаны с тем, что в ответ на воспалительный процесс происходит выброс одного из быстрых реактантов острой фазы – АПИ. АПИ способен необратимо связывать протеолитические ферменты, которые обеспечивают измеряемую нами общую протеолитическую активность. Это объяснение подтверждается и количественной сопоставимостью разнонаправленных изменений АПИ и ОПА (46,95% и 45,43%, соответственно).

В токсическую стадию перитонита активность АПИ снижалась до контрольных значений, а МГ – увеличивалась (на 31 % по сравнению с реактивной стадией), что в результате не сказалось на уровне СИЕ

Таблица 1
Интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови больных перитонитом (реактивная стадия, n=13)

Показатель	Контроль	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Значение р U-критерий Манна-Уитни*
АПИ, г/л	2,13	3,13	1,14	3,84	0,07
МГ, г/л	3,02	3,28	2,42	3,53	0,006
ОПА, нмоль/л·с	11,16	6,09	0	20,3	0,001
СИЕ, г/л	5,15	6,40	3,29	6,95	0,053
ИП, усл. ед.	2,17	0,95	0	3,08	0,079

Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в реактивной стадии с показателями в стадии полиорганной недостаточности.

Таблица 2

Интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови больных перитонитом (токсическая стадия, n=12)

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Значение р U- критерий Манна-Уитни*
АПИ, г/л	2,11	0,76	2,2	0,019
МГ, г/л	4,3	3,32	24,07	0,025
ОПА, нмоль/л·с	8,12	0	52,79	0,54
СИЕ, г/л	6,41	4,66	26,31	0,78
ИП, усл. ед.	1,27	0	4,36	0,3

Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в токсической стадии с показателями в реактивной стадии.

(табл. 2). ОПА и ИП имели тенденцию к росту, но достоверно не отличались от уровня предыдущей стадии (табл. 2).

Снижение активности АПИ на фоне роста МГ в токсическую стадию перитонита может быть следствием нескольких причин. Уменьшение активности АПИ может быть связано с необходимостью инактивации массивного количества протеолитических ферментов, поступивших в сыворотку крови как из собственных клеток, так и из микроорганизмов. С другой стороны, изве-

стно, что МГ способен резко усиливать диссоциацию комплексов АПИ-протеиназа, что приводит к освобождению активного ингибитора. Но, поскольку роста СИЕ не наблюдалось, по-видимому, происходит истинное снижение концентрации белка-ингибитора.

Снижение активности АПИ может происходить в результате уменьшения синтетической функции печени, которая является основным продуцентом сывороточных серпиновых ингибиторов. Однако в таком

Таблица 3

Интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови больных перитонитом (стадия полиорганной недостаточности, n=13)

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Значение р U- критерий Манна- Уитни*
АПИ, г/л	3,72	3,21	5,6	0,0002
МГ, г/л	4,03	3,69	10,9	0,8
ОПА, нмоль/л·с	108,62	24,36	140,09	0,004
СИЕ, г/л	7,75	6,97	8,17	0,22
ИП, усл. ед.	14,02	3,2	17,2	0,36

Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в стадии полиорганной недостаточности с показателями в токсической стадии.

случае не наблюдался бы рост активности МГ, так как постоянство пула МГ в системе кровообращения обеспечивается большей частью гепатоцитами [2].

Возможно, уменьшение активности АПИ связано с истощением его периферического пула.

Повышение активности МГ в токсическую стадию может быть связан с ростом его синтеза.

К факторам, стимулирующим биосинтез МГ, относят HSF (фактор, стимулирующий гепатоциты), который продуцируют полиморфноклеточные лейкоциты из перитонеального экссудата и из периферического кровотока. Синтез МГ может также осуществляться периферическими мононуклеарами, их содержание в токсическую стадию увеличивалось по сравнению с содержанием в реактивную стадию. Возможность лейкоцитов как источника МГ в эту стадию косвенно подтверждается положительной корреляцией этих показателей ($r=+0,62$, $p=0,05$).

Биосинтез МГ стимулируется также интерлейкином-6 (ИЛ-6), который индуцирует транскрипцию гена МГ, усиливает секрецию МГ гепатоцитами и одновременно подавляет секрецию α_1 -протеиназного ингибитора, который является основным ингибитором сыворотки крови.

В токсическую стадию перитонита происходит повреждение печени и из поврежденных гепатоцитов вместе с другими ферментами в кровеносное русло выходят протеолитические ферменты, так как наблюдается положительная корреляция как между ОПА и АСАТ ($r=+0,60$, $p=0,05$), так и между ИП и АЛАТ ($r=+0,71$, $p=0,04$) и ИП и АСАТ ($r=+0,75$, $p=0,029$).

В стадию полиорганной недостаточности перитонита активность МГ оставалась на предыдущем уровне, в то время как активность АПИ и ОПА резко повышались (соответственно на 76% и на 1237% по

сравнению с предыдущей стадией, табл. 3). ИП в эту стадию также повышался.

Кроме печени АПИ синтезируется макрофагальными клетками. Доказано, что связывание комплексов АПИ-протеиназа с соответствующими рецепторами гепатоцитов и макрофагов человека приводит к экспрессии гена АПИ и индуцирует синтез этого белка. Поэтому возможно, что при увеличении активности протеиназ происходит снижение концентрации свободного АПИ и рост концентрации комплексов АПИ-протеиназа. В результате клетки печени отвечают дополнительной продукцией нативного ингибитора, что мы и наблюдали в стадию полиорганной недостаточности.

Постоянный рост общей протеолитической активности в динамике развития перитонита обусловлен поступлением протеолитических ферментов из различных источников. Главное значение в развитии протеиназно-ингибиторного дисбаланса имеют гранулоциты и макрофаги, они первыми мигрируют в очаг воспаления, принимают участие в формировании гистиоцитарно-гематического барьера.

В реактивную стадию перитонита основным источником протеиназ являются сегментоядерные нейтрофилы, так как наблюдается тесная положительная корреляционная связь между ОПА, ИП и содержанием сегментоядерных нейтрофилов ($r=+0,69$, $p=0,025$ и $r=+0,804$, $p=0,009$, соответственно).

Активация этих клеток в зоне воспаления сопровождается дестабилизацией их мембран, что приводит к выбросу пула активных лизосомальных ферментов. Выход лизосомальных ферментов из клеток индуцирует избирательный протеолиз, который приводит к активации плазменных проферментов систем свертывания и фибринолиза, калликреин-кининовой системы и системы комплемента. В результате накапливаются биологически активные пептиды:

Таблица 4

Распределение результатов исследования общей протеолитической активности в сыворотке крови больных перитонитом (число случаев)

Показатель	Результаты исследований				Всего
	положительные		отрицательные		
	ИП	ЛП	ИО	ЛО	
ОПА	6	3	12	1	22

Примечание: ИП – истинно положительные, ЛП – ложно положительные, ИО – истинно отрицательные, ЛО – ложно отрицательные результаты.

кинины, анафилотоксины, а также происходит потребление факторов гемокоагуляции, фибринолиза и калликреин-кининового каскада [1].

Судя по корреляционным отношениям, в реактивную стадию перитонита эндогенные ингибиторы протеиназ поставляются не только печенью, но и лейкоцитами, так как имеется тенденция к положительной корреляции между МГ и лейкоцитами ($r=+0,59$, $p=0,05$).

В токсическую стадию ингибиторный потенциал пополняется в основном за счет α_2 -макроглобулина (коэффициент корреляции между МГ и лейкоцитами составляет

$+0,62$, $p=0,05$). Отрицательная корреляция между количеством лимфоцитов и ИП ($r=-0,71$, $p=0,03$), возможно связана, с разрушением последних, так как количество их в эту стадию перитонита снижалось вдвое.

Возможно, в токсическую стадию перитонита в сыворотке крови циркулируют как собственно сывороточные активированные протеиназы, так и тканевые и микробные протеолитические ферменты.

По-видимому, изменяется и функциональное «содержимое» клеток гранулоцитарного ряда. Если в реактивную стадию сегментоядерные клетки «богаты» протеиназами ($r=+0,69$, $p=0,025$ между ОПА и ко-

Таблица 5

Интенсивность протеолитических процессов в перитонеальной жидкости больных перитонитом (реактивная стадия, n=13)

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя Квартиль	Значение р U-критерий Манна-Уитни*
АПИ, г/л	0,51	0,46	0,6	0,1
МГ, г/л	0,56	0,47	0,73	0,73
ОПА, нмоль/г·с	9	0,86	17,56	0,5
СИЕ, г/л	1,07	1,02	1,39	0,09
ИП, усл. ед.	8,41	0,81	12,04	0,2

Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в реактивной стадии с показателями в стадии полиорганной недостаточности.

Таблица 6

**Интенсивность протеолитических процессов в перитонеальной жидкости
больных перитонитом (токсическая стадия, n=14)**

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя Квартиль	Значение р U-критерий Манна- Уитни*
АПИ, г/л	0,16	0	0,4	0,003
МГ, г/л	0,6	0,43	0,88	0,88
ОПА, нмоль/г·с	5,14	0	18,45	0,86
СИЕ, г/л	0,76	0,58	1,15	0,01
ИП, усл. ед.	6,8	0	16,17	0,87

Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в токсической стадии с показателями в реактивной стадии.

личеством сегментоядерных нейтрофилов), то в стадию полиорганной недостаточности наоборот – наблюдалась положительная корреляция между количеством сегментоядерных нейтрофилов и активностью ингибиторов ($r = +0,76$, $p = 0,03$), а также между количеством лейкоцитов и СИЕ ($r = +0,88$, $p = 0,004$). Отрицательная корреляционная связь между содержанием, активностью ингибиторов и содержанием моноцитов ($r = -0,71$, $p = 0,047$) при росте количества последних может свидетельствовать о том, что они функционально неполноценны и не в состоянии секретировать эндогенные ингибиторы протеолитических ферментов.

Протеолитический потенциал сыворотки крови в какой-то мере обеспечивается за счет клеток крови только в реактивной стадии перитонита. Отсутствие корреляции индекса протеолиза с клеточным составом в стадию полиорганной недостаточности свидетельствует о том, что основными источниками и агрессивных протеиназ, и их эндогенных ингибиторов в эту стадию являются периферические ткани.

Анализируя изменение интенсивности протеолиза в сыворотке крови в диагнос-

тическом плане, необходимо отметить, что при прогрессировании перитонита наиболее динамичными показателями являются ОПА и АПИ. ИП является более интегральным показателем, чем ОПА, который оценивает и агрессивность протеолитических ферментов, и защитную реакцию эндогенных ингибиторов. Однако этот показатель очень сильно варьировал у разных больных, особенно в стадию полиорганной недостаточности: интерквартильный размах в первые две стадии был от 0 до 4,36, в последнюю стадию – от 3,20 до 17,20.

Таким образом, рост (в 13,4 раза) общей протеолитической активности в сыворотке крови больных перитонитом свидетельствует о прогрессировании процесса. Повышение ОПА более 100 нмоль/лс является признаком перехода токсической стадии перитонита в стадию полиорганной недостаточности.

Диагностическая чувствительность этого показателя составляет 66,7%, диагностическая специфичность – 92,3%, процент правильного прогноза – 81,8% (табл. 4).

В перитонеальной жидкости наименьшая активность АПИ имела место в токсиче-

Таблица 7

Интенсивность протеолитических процессов в перитонеальной жидкости больных перитонитом (стадия полиорганной недостаточности, n=15)

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя Квартиль	Значение р U- критерий Манна- Уитни*
АПИ, г/л	0,77	0,26	1,28	0,002
МГ, г/л	0,58	0,42	0,77	0,79
ОПА, нмоль/г·с	6,4	1,64	9,11	0,84
СИЕ, г/л	1,35	0,8	1,73	0,008
ИП, усл.ед.	4,74	2,74	6,2	0,64

Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в стадии полиорганной недостаточности с показателями в токсической стадии.

ческую стадию перитонита (в 3,2 раза меньше, чем в реактивную стадию) (табл. 5, 6). В стадию полиорганной недостаточности активность АПИ вновь увеличивалась (в 1,5 раза по сравнению с реактивной и в 4,8 раза по сравнению с токсической стадией) (табл. 6, 7).

Уровень МГ во все стадии перитонита оставался неизменным.

Характер изменений СИЕ был аналогичен изменениям содержания АПИ. В токсическую стадию СИЕ снижалась в 1,4 раза по сравнению с реактивной стадией, а в стадию полиорганной недостаточности – вновь повышалась (в 1,8 раза по сравнению с предыдущей стадией) (табл. 5, 6, 7).

Общая протеолитическая активность с прогрессированием заболевания имела тенденцию к снижению в токсическую стадию. Наибольшие значения индекса протеолиза отмечались в реактивную стадию перитонита, затем ИП постепенно снижался в токсическую стадию и еще более – в стадию полиорганной недостаточности (почти вдвое по сравнению с реактивной стадией) (табл. 5, 6, 7).

При анализе корреляционной зависимости показателей протеолиза в перитоне-

альной жидкости и клеточного состава крови обнаружено следующее.

В реактивной стадии перитонита обнаружена положительная корреляционная зависимость между содержанием АПИ в перитонеальной жидкости и индексами интоксикации сыворотки крови – лейкоцитарный индекс интоксикации и лейкоинтоксикационный индекс ($r = +0,78$, $p = 0,04$), а также СИЕ и лейкоцитарный индекс интоксикации ($r = +0,75$, $p = 0,05$). Это также предполагает участие ингибиторов протеиназ, секретируемых клетками крови, в инаktivации протеолитических ферментов, находящихся в перитонеальной жидкости. Существенный вклад, по-видимому, вносят моноциты, так как наибольшая корреляция наблюдается для СИЕ и моноцитов ($r = +0,71$, $p = 0,03$).

Если моноциты являются источником ингибиторной активности, то лимфоциты, вероятно, – источником протеолитической активности (коэффициент корреляции между ИП и лимфоцитами равен $+0,75$, $p = 0,05$).

В токсическую стадию перитонита лимфоциты, напротив, вероятно, продуцируют МГ ($r = +0,55$, $p = 0,05$).

Таблица 8

Распределение результатов исследования содержания α_1 -протеиназного ингибитора в перитонеальной жидкости больных перитонитом (число случаев)

Показатель	Результаты исследований				Всего
	положительные		отрицательные		
	ИП	ЛП	ИО	ЛО	
АПИ	9	3	10	3	25

Примечание: ИП – истинно положительные, ЛП – ложно положительные, ИО – истинно отрицательные, ЛО – ложно отрицательные результаты.

Таким образом, резкое снижение (в 3,2 раза) содержания АПИ в перитонеальной жидкости больных перитонитом на ранних этапах заболевания свидетельствует о прогрессировании процесса и переходе реактивной стадии в токсическую. Снижение АПИ менее 0,4 г/л является признаком перехода реактивной стадии перитонита в токсическую.

Диагностическая чувствительность этого показателя составляет – 75%, диагностическая специфичность – 76,9%, процент правильного прогноза – 76% (табл. 8).

Выводы

1. При перитоните происходят фазные изменения активности и/или содержания компонентов системы протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости.
2. В сыворотке крови наиболее значимым изменениям подвергается общая протеолитическая активность, которая в стадию полиорганной недостаточности увеличивается в 13,4 раза по сравнению с токсической стадией.
3. В перитонеальной жидкости наиболее лабильным является α_1 -протеиназ-

ный ингибитор, который резко снижается в токсической стадии – в 3,2 раза по сравнению с реактивной стадией, а затем вновь растет.

4. Источником протеиназ и их эндогенных ингибиторов является не только печень, но и клетки крови: моноциты, лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы. В соответствии с обнаруженными корреляционными взаимоотношениями в разные стадии перитонита участвуют различные клетки.

5. Повышение общей протеолитической активности в сыворотке крови более 100 нмоль/лЧс является критерием перехода токсической стадии перитонита в стадию полиорганной недостаточности (диагностическая специфичность – 92,3 %, диагностическая чувствительность – 66,7 %, процент правильного прогноза – 81,8 %).

5. Снижение содержания α_1 -антипротеиназного ингибитора в перитонеальной жидкости менее 0,4 г/л является критерием перехода реактивной стадии перитонита в токсическую (диагностическая специфичность – 76,9 %, диагностическая чувствительность – 75 %, процент правильного прогноза – 76 %).

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко, К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – Киев: Здоров'я, 1988. – 199 с.
2. Косинец, А.Н Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии / А.Н. Косинец, Л.Н. Кирпиченок. – Витебск, 2003. – 410 с.
3. Хватов, В.Б. Ускоренный метод определения основных ин-гибиторов протеиназ в плазме крови человека: метод. рекомендации / В.Б. Хватов, Т.А. Белова; МЗ РСФСР.– Москва, 1981. – 16 с.
4. Erlanger, D.F. The preparation and properties of two new chromogenic substates of trypsin / N. Kokowsky, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, N 2. – P. 271-278.

Поступила 22.05.2006 г.