

## ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМИ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ПЕРИТОНІТУ НА ТЛІ ПОЄДНАНОЇ ПАТОЛОГІЇ

**Ключові слова.** перитоніт, поєднана патологія, протеолітична система.

**Резюме.** У роботі представлені результати дослідження активності протеолітичної системи плазми крові щурів за умов гострого перитоніту. Встановлено, що поєднання останнього з цукровим діабетом та ураженням печінки і нирок відрізняється характерними закономірностями - дисфункцією протеолітичних систем та швидким розвитком необмеженого протеолізу.

### Вступ

Плазма крові вміщує складний набір протеолітичних ферментів, узгоджена взаємодія яких лежить в основі гемокоагуляції, фібринолізу, кініногенезу, імунних реакцій, регуляції кровообігу [2,7,14]. Означені процеси найтіснішим чином пов'язані між собою, оскільки мають спільні механізми активації та контролю [2,14]. Численні реакції цих біологічних систем каталізуються протеїназами, що знаходяться в плазмі крові, які, на відміну від тканинних, просторово не відокремлені [2]. Надлишкова активація протеолізу, як однієї з найбільш значущих регуляторних систем організму, є важливою патогенетичною ланкою в розвитку деструктивних, запальних та алергічних реакцій, порушенні процесів гемостазу [2,4,7,8], що робить актуальними дослідження стану цієї системи при розвитку запального процесу в очеревинній порожнині, який розвивається на тлі змін функціональної активності як протеолітичних, так і антипротеолітичних ферментів, зумовлених впливом супутньої патології (СП).

### Мета дослідження

Дослідити особливості динаміки протеолітичної активності плазми крові щурів при розвитку перитоніту у тварин із моделями супутньої патології.

### Матеріал і методи

Матеріал досліджень становили 75 білих статевозрілих нелінійних щурів, масою 180 - 200 г. Перитоніт моделювали за розробленою методикою, шляхом черезстравохідної перфорації шлунка спеціальним пристроєм [12]. Як СП ми обрали цукровий діабет (ЦД) - одне з найпоширеніших захворювань, яке моделювали шляхом підшкірного уведення 1,6% розчину алоксану на дистильованій воді в дозі 16 мг на 100 г маси [1]. Крім того, враховуючи значну розповсюдженість

© Ф.В. Гринчук, 2006

патології печінки та нирок, ми моделювали їх ураження шляхом підшкірного уведення 5% розчину нітриту натрію на дистильованій воді в дозі 0,5 мг на 100 г маси, що викликало розвиток гломерулонефриту та гепатиту [11].

Тварини були розподілені на три групи. Першу склали 20 щурів із перитонітом, контролем для яких були 5 інтактних тварин. Другу групу - 20 щурів із перитонітом на фоні гепатиту та гломерулонефриту, контролем для яких було 5 тварин, яким вводився нітрит натрію. У третю групу увійшло 20 тварин із перитонітом на фоні цукрового діабету, контролем для яких були 5 тварин із моделлю діабету.

При виконанні роботи дотримувались основних вимог Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Виведення тварин з експерименту проводили шляхом декапітації. Усі маніпуляції виконували під хлороформним наркозом.

Протеолітичну активність плазми крові визначали за азоказеїном (лізис високомолекулярних білків), азоальбуміном (лізис низькомолекулярних білків) та азоколом (лізис колагену) за методикою Л.О. Кухарчука [10] реактивами фірми "Simko Ltd" м. Львів.

Статистичну обробку даних проводили із застосуванням для нормально розподілених незалежних виборок множинного критерію Бонфероні, для ненормально розподілених - Краскела - Уолліса, для динамічного порівняння нормально розподілених виборок використовували парний критерій Стьюдента, для виборок із ненормальним розподілом - Т - критерій Уїлкоксона [13]. Нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро - Вілкі [5].

### Обговорення результатів дослідження

Встановлено, що вихідні параметри рівня лізису азоказеїну (АЗКз) (таблиця) у 2-й та 3-й групах високовірогідно переважали такі в 1-й групі.

Виявлені зміни у тварин із моделями ЦД та ураження печінки й нирок можна розцінити як зростання активності ферментних систем плазми, які ініціюють калікреїни, ренін та, відповідно, ангіотензин, що є характерним для ЦД, патології печінки та нирок [2,9]. Важливим біологічним ефектом таких процесів є неконтактна активація

факторів згортання, в першу чергу XII та VII, що реалізується впливом калікреїну, а також низки інших ферментів [3,14], наслідком чого є тенденція до розвитку гіперкоагуляції, яка має місце при ЦД та нирковій патології [2,7,9]. Ще одним об'єктом впливу протеаз, які модифікують високомолекулярні білки (ВМБ), є компоненти системи компле-

**Таблиця**

**Вихідна протеолітична активність (Е440/мл/год) плазми крові експериментальних тварин**

№ п/п	Групи тварин	За азоказеїном		За азоальбуміном		За азоколом	
		М	м	М	м	М	м
1.	1 група	0,238	0,002	0,213	0,005	0,024	0,011
2.	2 група	0,422**	0,006	0,337**	0,007	0,018	0,002
3.	3 група	0,326 1-3**	0,009	0,333 1-3**	0,010	0,022	0,003

**Примітка:** \*\* - коефіцієнт вірогідності Р між прилеглими та вказаними групами < 0,01 (наведені тільки статистично вірогідні відмінності).

менту [3,4,8], активація якого має місце при ЦД, гепатиті та гломерулонефриті [2,3,8,9].

Одним із основних наслідків ініціації калікреїнів є розщеплення  $\alpha_2$ -глобуліну плазми, результатом чого є утворення кінінів, яке запускається також активованим фактором Хагемана [2,3]. В той же час, рівень протеолізу за азоальбуміном (АЗА) у 2-й та 3-й групах вірогідно переважав такий у здорових тварин, що свідчить про зростання активності протеаз, які гідролізують низькомолекулярні білки (НМБ), в тому числі кініни [2]. З одного боку, активація лізису кінінів може мати регуляторне значення, з іншого - не можна виключити, що порушення рівноваги між активністю кінінів, дія яких призводить до розширення судин, та ангіотензину, який викликає вазоконстрикцію, сприяє розвитку циркуляторних розладів, характерних для ЦД, печінкової та ниркової патології [9], що підсилюється впливом кініназ, одним із ефектів яких є перетворення ангіотензину I на ангіотензин II [2]. На нашу думку, зважаючи на роль компонентів кінінової системи в реалізації програми запального процесу, в тому числі в очеревинній порожнині [3,6], підсилення їх розпаду є одним із факторів, які становлять підґрунтя змін перебігу запалення в очеревинній порожнині при розвитку перитоніту в умовах наявності супутньої патології, зокрема ЦД, ураження печінки та нирок.

Колагеназна активність плазми, визначена за азоколом (АЗКл), в інтактних тварин переважала, а найнижчі параметри показників мали місце в 2-й групі, що свідчить про зниження рівня колагенолізу, у тварин із моделями СП. Такі зміни, разом із хронічною вазоконстрикцією, спричиненою збільшенням утворення ангіотензину, призводять до розростання сполучної тканини в стінках судин,

що є однією з причин мікроциркуляторних розладів при ЦД, патології печінки та нирок [7,9]. Зважаючи, що  $\alpha$ -ланки колагенових пептидів регулюють хемотаксис мононуклеарних лейкоцитів, лімфоцитів, фібробластів [3,4,8], зменшення колагенолізу можна розцінити як одну з передумов дисфункції захисних систем при виникненні перитоніту на фоні СП.

Розвиток перитоніту викликав закономірне зростання протеолітичної активності плазми у всіх групах тварин. Однак при цьому мали місце деякі характерні міжгрупові відмінності активності різних складових протеолізу. Так, через 6 год з часу моделювання перитоніту мало місце різке зростання рівня лізису АЗКз (рис.1), найбільш виражене (майже на 50%) у 1-й групі. Разом із тим, параметри показника в останній залишалися вірогідно меншими, ніж в інших, що свідчить про зростання активності протеаз, що модифікують ВМБ, у відповідь на виникнення запального процесу в очеревинній порожнині. Це, в свою чергу, ініціює каскад перетворень, одним із результатів якого є активація згортальної, калікреїн - кінінової, фібринолітичної систем, компонентів комплементу, вазоконстрикція, збільшення проникливості судин, а також безпосередній вплив протеаз на мікроорганізми - індуктори перитоніту [2,3].

Паралельно відмічено суттєве збільшення параметрів лізису АЗА (рис.2), що є проявом активації протеаз, які розщеплюють НМБ. Серед широкого спектру біологічних ефектів впливу ферментів слід відмітити розщеплення таких медіаторів запалення, як кініни та біогенні аміни [2,3], що спонукає до думки про регуляторне значення зростаючої активності цієї ланки протеолізу. Окрім того, один з її чинників - Ig - аза -

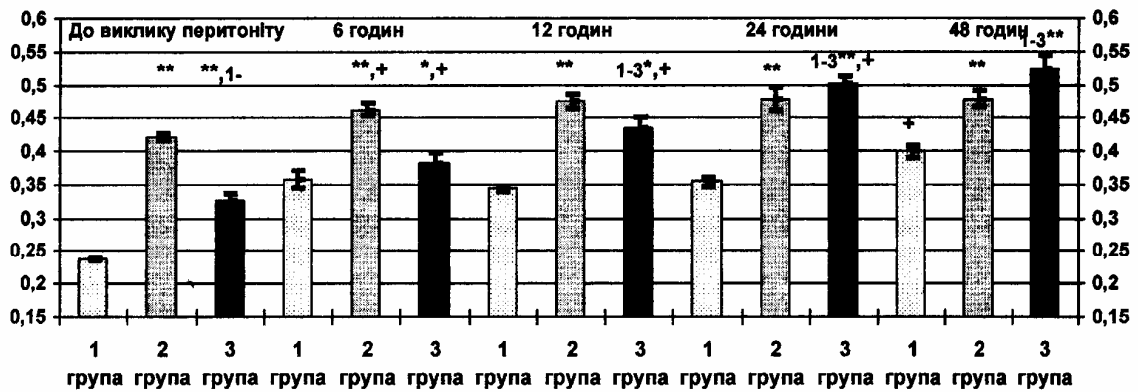


Рис. 1. Динаміка протеолітичної активності плазми крові експериментальних тварин за азоказеїном (E440/мл/год) у процесі розвитку перитоніту

Примітка: \* - коефіцієнт вірогідності P між прилеглими групами < 0,05, \*\* - < 0,01; +- коефіцієнт вірогідності між прилеглими термінами спостереження < 0,05, ++ - < 0,01 (наведені тільки статистично вірогідні відмінності).

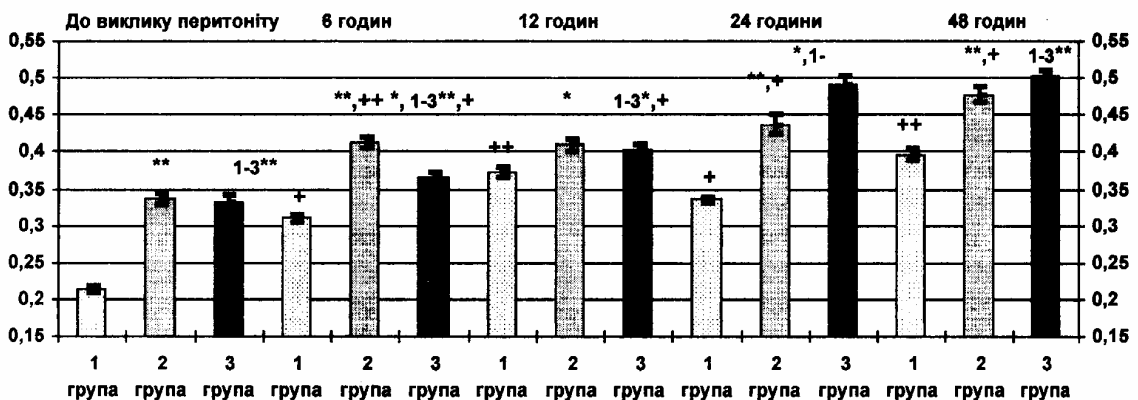


Рис.2. Динаміка протеолітичної активності плазми крові експериментальних тварин за азоальбуміном (E440/мл/год) у процесі розвитку перитоніту

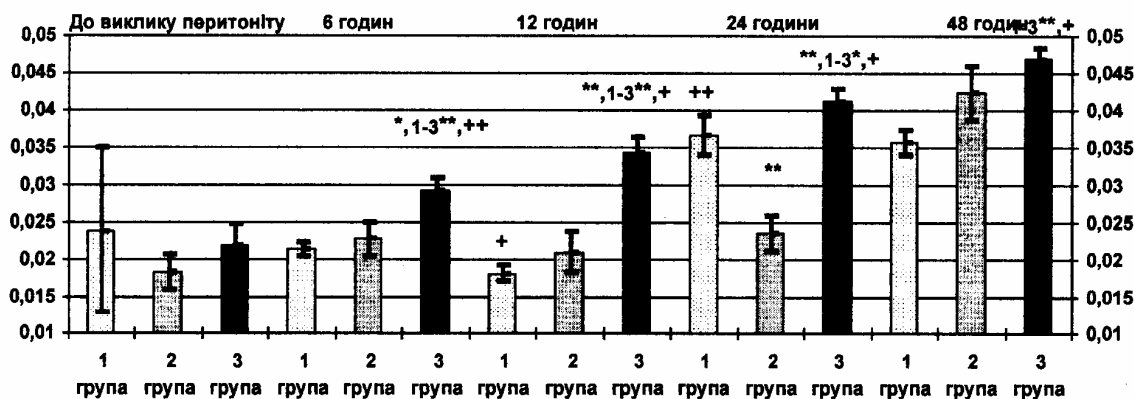
Примітка: \* - коефіцієнт вірогідності P між прилеглими групами < 0,05, \*\* - < 0,01; +- коефіцієнт вірогідності між прилеглими термінами спостереження < 0,05, ++ - < 0,01 (наведені тільки статистично вірогідні відмінності).

розщеплює легкі ланки імуноглобулінів [2], що є неодмінною складовою класичного шляху активації системи комплементу [3,8].

Колагеназна активність плазми (рис.3) в 1-й групі тварин майже не змінювалась, у той час як у 2-й та 3-й групах мало місце її зростання, найбільш виражене, високовірогідне, у тварин із ЦД. Це вказує на відмінності метаболізму колагену, який у 1-й групі можна розцінити як стабільний. Випереджаючу ініціацію колагенлізу у тварин із моделями СП можна трактувати з різних позицій. З одного боку, це могло зумовлюватись необхідністю додаткового впливу на стінки судин, структура яких змінюється при ЦД та патології печінки й нирок [7,9]. З іншого - беручи до уваги хемоатрактантні та цитоімунорегуляторні властивості продуктів деградації колагену [3,8], зростання лізису останнього могло бути одним із додаткових факторів, спрямованих на активацію клітин

моноцитарно - макрофагальної системи та лімфоцитів. Слід зазначити, що в умовах пригнічення синтезувальної функції печінки, яка є основним джерелом інгібіторів протеаз, в тому числі антиколагеназних [2], надмірне зростання колагеназної активності створює передумови для девіацій інформаційно - регуляторної функції колагену, наслідком чого є розвиток дисрегенеративної та гальмування каскаду реакцій активації комплементу за рахунок руйнування колагеноподібного компоненту C1q.

Через 12 год з часу моделювання перитоніту зміни протеолітичної активності плазми в досліджуваних групах мали неоднозначний характер. Так, рівень лізису АЗКз у тварин із моделями СП продовжував збільшуватися, найбільш виражено в 3-й групі, вірогідно випереджаючи такий у тварин 1-ї групи, що свідчить про зростаючу активність протеаз, які розщеплюють ВМБ. У той же час у



**Рис. 3.** Динаміка протеолітичної активності плазми крові експериментальних тварин за азоколом (Е440/мл/год) у процесі розвитку перитоніту

**Примітка:** \* - коефіцієнт вірогідності Р між прилеглими групами < 0,05, \*\* - < 0,01; +- коефіцієнт вірогідності між прилеглими термінами спостереження < 0,05, ++ - < 0,01 (наведені тільки статистично вірогідні відмінності).

1-й групі параметри показника практично не змінилися.

Серед причин виявлених відмінностей динаміки лізису ВМБ можна виділити декілька факторів. Зокрема, зростаюча активність протеолізу врівноважується антипротеолітичними чинниками [2], дією яких можна пояснити стабільність рівня лізису АЗКз у 1-й групі тварин. Зміни функціональної здатності печінки, спричинені наявністю СП, підсилені її токсичним ураженням внаслідок розвитку перитоніту, зумовлюють гальмування синтезу білків [6], в тому числі компонентів антипротеолітичного захисту [2]. Зважаючи на те, що печінка є також основним фізіологічним джерелом чинників протеолітичної системи [2,14], виявлене у тварин із моделями СП зростання протеолітичної активності можна пояснити внеском інших донаторів гідролаз, серед яких активовані лейкоцити та лімфоцити, ендотеліальні клітини, мікроорганізми тощо [2,3]

Лізис АЗА суттєво зростав у 1-й та 3-й групах, а у 2-й продовжував перебувати на високому рівні. При цьому значення показників у тварин без СП залишались вірогідно вищими. Високі параметри показників протеолітичної модифікації НМБ свідчать, на перший погляд, про достатню активність протеаз, дія яких компенсує деякі негативні наслідки випереджаючої ініціації ферментів, що впливають на ВМБ, в першу чергу за рахунок регуляції вмісту біологічно активних амінів - медіаторів запалення. Разом із тим, активність протеїназ даної категорії у 1-й групі зростала більш виражено - високовірогідно. У тварин із ЦД збільшення параметрів показників не таке значне, а у 2-й групі останні майже не змінилися, в той час як зростання в останніх групах рівня лізису ВМБ дає підстави стверджувати про прогресуюче

збільшення вмісту циркулюючих медіаторів [2,3].

Колагеназна активність плазми у 1-й групі вірогідно зменшувалась, а в 2-й групі - майже не змінилися. Натомість у тварин із ЦД спостерігалось прогресуюче вірогідне зростання лізису АЗКл. Зниження активності колагеназ у 1-й групі можна розцінити як наслідок ініціації відповідних інгібіторів, спрямованої на активацію синтезу колагену, якому належить важлива роль у процесах проліферації та відмежування запального вогнища [3]. Зростання катаболізму колагену у тварин з ЦД і, як наслідок, порушення регенераторних процесів, може бути одним із чинників, який сприяє поширенню перитоніту.

Через 24 год з часу моделювання перитоніту рівень лізису АЗКз у 1-й групі суттєво не змінився, а у тварин з моделями СП тривало його зростання, більш суттєве при ЦД. Параметри деградації АЗА у 1-й групі вірогідно зменшувалися, натомість у 2-й та 3-й групах стрімко зростали. Колагеназна активність плазми зростала у всіх піддослідних групах, найбільш виражено - в 3-й.

Такі відмінності свідчать, що прогресування запального процесу у тварин із СП супроводжується наростанням активності всіх ланок протеолітичної системи плазми, яке набуває ознак неконтрольованого. У той же час у тварин 1-ї групи лізис ВМБ не зростає, а НМБ - навіть зменшується, що вказує на функціональну активність систем - регуляторів протеолізу. Разом з тим, зростаючий рівень колагенолізу можна розцінити як прояв деякої дисфункції останніх, що сприяє поширенню перитоніту.

Через 48 год із часу моделювання перитоніту у тварин із моделями СП тривало прогресуюче зростання параметрів усіх досліджуваних показників. Таку динаміку можна розцінити, як необме-

жену активацію протеолізу, яка розвивається на фоні пригнічення функціональної здатності антипротеолітичних механізмів. Основною причиною виявлених змін протеолітичної активності плазми можна вважати дію численних гідролаз та ініціаторів протеолітичного каскаду, що володіють властивостями взаємної активації, джерелом яких в умовах прогресуючого перитоніту є зруйновані тканини, мікроорганізми, імунокомпетентні клітини тощо [2,3,8].

У 1-й групі рівень лізису ВМБ та НМБ також збільшувався, що вказує на активацію каскаду протеолітичних реакцій, однак параметри лізису колагену при цьому практично не змінилися. Така стабільність колагенлізу у тварин 1-ї групи вказує на певну функціональну активність систем-регуляторів протеолізу, хоча зростання активності інших чинників протеолізу свідчить про недостатність останніх.

Таким чином, проведений аналіз дозволяє стверджувати, що виникнення та розвиток запального процесу в очеревинній порожнині у тварин із моделями СП відрізняється не лише кількісними, але й якісними характеристиками стану протеолітичної активності плазми крові, що проявляється в надмірному її зростанні, швидкому, вже через 12 год, розвитку дисбалансу між окремими ланками протеолізу, який через 24 год переходить в неконтрольовану активацію протеаз із подальшим розвитком необмеженого протеолізу. Варто наголосити, на тому, що не дивлячись на відмінності між змодельованою у тварин СП, динаміка протеолітичної активності мала спільні закономірності, що є свідченням універсального характеру виявлених змін.

## Висновки

1. Розвиток запального процесу в очеревинній порожнині спричиняє різке зростання протеолітичної активності плазми крові.

2. При моделюванні цукрового діабету, ураження печінки і нирок спостерігається зростання рівня лізису азоколу й азоказеїну та зниження колагеназної активності плазми крові.

3. Поеднання перитоніту з цукровим діабетом та ураженням печінки і нирок викликає як кількісні, так і якісні відмінності реакцій протеолітичної системи плазми, наслідком яких є розвиток необмеженого протеолізу.

## Перспективи подальших досліджень

Зважаючи на важливу регуляторну роль протеолітичної системи, перспективними є дослідження, спрямовані на оцінку прогностичного значення показників стану протеолізу. Буде продовжене

вивчення ролі ферментних систем протеолізу та антипротеолізу в інтимних механізмах патогенезу перитоніту за умов поєднаної патології.

**Література.** 1. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.И. Серова, В.С. Пауков.- М.: Медицина, 1995.- 640 с. 2. Гаин Ю.М., Леонович С.И., Завада Н.В. и др. Имунный статус при перитоните и пути его патогенетической коррекции.- Мн: ООО "Юнипресс", 2001.- 256 с. 3. Гланц С. Медико-биологическая статистика.- М.: Практика, 1999.- 460 с. 4. Гнойный перитонит: патофизиология и лечение / Под ред. А.Я. Цыганско.- Х.: Контраст, 2002.- 280 с. 5. Грицюк А.И., Амосова Е.Н., Грицюк И.А. Практическая гемостазиология.- К.: Здоров'я, 1994.- 256 с. 6. Змушко Е.И., Белозеров Е.С., Митин Ю. Клиническая иммунология.- СПб: Питер, 2001.- 576 с. 7. Кулешов Е.В., Кулешов С.Е. Сахарный диабет и хирургические заболевания.- М.: Воскресенье, 1996.- 216 с. 8. Кухарчук О.Л. Патогенетическая роль и методы коррекции интегративных нарушений гормонально-мессенджерных систем регуляции гомеостаза натрия при патологии почек.- Автореф. дис. ... докт. мед. наук.- Одесса, 1995.- 32 с. 9. Пат. 31164А, Україна, МКИ А61В10/00, АК31/515. Спосіб моделювання гострої ниркової недостатності / Федорук О.С.- Опубл. 16.04.2001.- Бюл. № 3.- 2 с. 10. Пат. 4766, Україна, МКИ А61В17/00, А61М27/00. Спосіб моделювання гострого перитоніту / Гринчук Ф.В., Полянський І.Ю.- Опубл. 15.02.2005.- Бюл. № 2.- 3 с. 11. Сергиенко В.К., Боднарєва И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях.- М.: ГЭО-ТАР-МЕД, 2001.- 256 с. 12. Сидоркина А.Н., Сидоркина В.Г., Преснякова М.В. Биохимические основы системы гемостаза и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови.- Н. Новгород: ННИИТО, 2005.- 112 с.

## ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПЕРИТОНИТА И ЕГО РАЗВИТИЯ НА ФОНЕ СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИИ

Ф.В. Гринчук

**Резюме.** В работе представлены результаты исследования активности протеолитической системы плазмы крови в условиях острого перитонита. Установлено, что сочетание последнего с сахарным диабетом и поражением печени и почек отличается характерными закономерностями - дисфункцией протеолитической системы и быстрым развитием неограниченного протеолиза.

**Ключевые слова:** перитонит, сочетанная патология, протеолитическая система.

## DYNAMICS OF INDECES OF PROTEOLYTIC SYSTEM BLOOD PLASMA IN UNDER CONDITION OF RATS PERITONITIS AND ITS DEVELOPMENT AGAINST A BACKGROUND OF ASSOCIATED PATHOLOGY

F.V. Grynychuk

**Abstract.** In the article the results of research of activity of the proteolytic system blood plasma of rats under conditions of acute peritonitis have been presented. It has been stated that association of the acute peritonitis with diabetes mellitus and pathology of liver and kidneys have specific characteristic - distortion of proteolytic system and rapid development of the unlimited proteolysis.

**Key words:** peritonitis, associated pathology, proteolytic system.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2006. - Vol.5, №2.-P.18-22.  
Надійшла до редакції 11.04.2006