

Т.Н. Войтович, Г.Н. Бычко, А.Г. Чистый

**ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕИНАЗНО-ИНГИБИТОРНОЙ СИСТЕМЫ
У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В статье обсуждаются результаты исследования протеиназно-ингибиторной системы и уровня средних молекул у детей с муковисцидозом в зависимости от формы, стадии заболевания и характера осложнений. Исследования установили, что выраженность дисбаланса в протеиназно-ингибиторной системе у больных муковисцидозом зависит от глубины поражения слизистой бронхов и фазы носительства синегнойной и стафилококковой инфекции. Высокий уровень средних молекул у всех пациентов с муковисцидозом, не зависит от длительности заболевания, глубины поражения бронхиального дерева, тяжести осложнений и проведенной терапии, что требует пересмотра терапевтических подходов к лечению и назначению более адекватных и эффективных методов детоксикации.

Ключевые слова: муковисцидоз, дети, протеиназно-ингибиторная система, средние молекулы.

**T.N. Voitovich, G.N. Bychko, A.G. Chisty
FEATURES PROTEINASE-INHIBITORY SYSTEM
OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS**

This article includes the results of a study of proteinase-inhibitory system and the level of average molecules that children with cystic fibrosis have, depending on the shape, stage of disease and the nature of complications. Research have established that the severity of the imbalance in the proteinase-inhibitory system of cystic fibrosis patients is dependent on the depth of distraction of the bronchial mucosa and the carrier phase of pseudomonas and staph infection. High level of average molecules that all patients with cystic fibrosis have, independents of disease duration, depth of bronchial apparatus distraction, severity of complications of therapy that requires a review of therapeutic approaches to the treatment and the appointment of more appropriate and effective methods of detoxification.

Key words: cystic fibrosis, children, proteinase-inhibitors system, the average molecule

Муковисцидоз (МВ) – наиболее частая наследственная полиорганная патология, характеризующаяся выраженной генетической гетерогенностью и клиническим полиморфизмом, относится к моногенным заболеваниям, обусловлена мутацией гена МВТР. При этом заболевании поражаются жизненно важные экзокринные железы всех органов. Течение обычно тяжелое, а прогноз неблагоприятный.

Распространение муковисцидоза варьируется в зависимости от популяции, так в РБ она составляет 1:8000 новорожденных, в России – 1:4900, в большинстве стран Европы эти цифры колеблются от 1:2000 до 1:5000 [4].

Еще 15-20 лет назад муковисцидоз (МВ) относился к «фатальным» или «летальным» заболеваниям, так как большинство детей умирало в первые годы жизни, редко доживая до 7-летнего возраста. В настоящее время эффективная, своевременная диагностика и разработанные методы терапии МВ значительно увеличили сроки жизни этих больных. Так, в США в 1969 году продолжительность жизни больных муковисцидозом не превышала 14 лет, в 1990 – 28 лет, 1996 – 31 год, 2001 – 32 года.

В России средняя продолжительность жизни больных муковисцидозом не превышает 16 лет, в РБ – 22 года. В настоящий момент в РБ на учете находятся 98 детей (в возрасте от 0 до 18 лет), в г. Минске проживает 21 ребенок.

В связи с тем, что продолжительность жизни больных с муковисцидозом увеличилась, эта патология приобретает в последние годы важную медико-социальную значимость, что определяется ранней инвалидизацией, необходимостью постоянного проведения терапии и активной диспансеризации, ростом полирезистентности бактериальной флоры в дыхательных путях к современным антибиотикам и в связи с этим, высокой стоимостью лечения больных.

При муковисцидозе поражаются функции ряда органов и систем и в первую очередь работа легких, печени, ЖКТ, сердца, нарушаются все виды обмена – белковый, углеводный, жировой, витаминный.

Тяжесть поражения зависит от типа мутации, при этом наиболее распространенной является мутация F508del, которая характеризуется появлением клинических симптомов уже с первых

дней жизни ребенка, быстрым развитием осложнений и формированием состояния полиорганной недостаточности.

Несмотря на своевременную диагностику и рано начатое лечение у большинства пациентов с МВ болезнь быстро прогрессирует, приводя к тяжелому поражению ряда органов и систем: бронхолегочной (множественные бронхоэктазы, фиброз, легочная гипертензия, легочное сердце), гепатобилиарной (мультилобулярный цирроз печени, портальная гипертензия), поджелудочной железы (недостаточность поджелудочной железы, диабет), наблюдаются значительные отклонения в физическом и половом развитии.

В настоящее время достаточно хорошо изучены генетические аспекты муковисцидоза, большой шаг сделан в отношении ранней диагностики и терапии, что во многом определило увеличение продолжительности жизни пациента. В то же время в литературе крайне мало работ, посвященных механизму формирования этой патологии, неясны основные причины быстрого ее прогрессирования и факторы, обеспечивающие стабильность компенсаторных систем.

В последние годы все больше внимания привлекают протеолитические ферменты, играющие ключевую роль в процессах регуляции метаболизма. В норме регуляторная функция протеиназ контролируется сложной системой белков-ингибиторов. При их недостаточности, формирующейся в результате усиленного специфического потребления, окислительной деструкции и нарушения белок-синтезирующей функции печени, развивается состояние гиперпротеаземии. Вовлечение протеолитической системы в патологический процесс с ее быстрой мобилизацией является обязательной и неспецифической реакцией организма, носящей универсальный характер и играющий в первую очередь защитную роль.

Можно выделить еще один существенный фактор, объединяющий компоненты протеолитической системы, – это тесная связь каждого из них с функциональным состоянием печени, поскольку именно в этом органе синтезируются многие белки, обладающие ферментативной, активаторной и ингибирующей активностью. Приспособительные (адаптационные) и компенсаторные возможности систем, в том числе и протеиназно-ингибиторной, обеспечивающих гомеостаз, велики, но они резко уменьшаются

в случае нарушения функциональной белок-синтезирующей способности печени.

Нарушение равновесного баланса в системе протеиназы – ингибиторы протеиназ является одной из причин формирования состояния эндогенной интоксикации (ЭИ), являющийся патологическим процессом с тенденцией к прогрессированию. К маркерам ЭИ относятся такие показатели гомеостаза как СРБ, церулоплазмин, гаптоглобин, фибриноген, билирубин, трансаминазы, СОЭ и многие другие. В настоящее время к универсальным эндогенным маркерам ЭИ относят и пептиды группы «средних молекул» (СМ). В норме эти соединения присутствуют в жидкостных средах организма (плазма, лимфа, ликвор и т.д.) в незначительных концентрациях и только при развитии патологического процесса, сопровождающегося нарушением баланса в системе протеиназы, – ингибиторы протеиназ, их концентрация резко возрастает реально отражая степень патологического белкового метаболизма.

Так как исследований по изучению состояния протеиназно-ингибиторной системы и маркеров эндогенной интоксикации по уровню средних молекул больных муковисцидозом до настоящего времени не проводилось нам представилось интересным изучить совокупную активность наиболее значимых плазменных протеолитических ферментов и их ингибиторов, а так же уровень пептидов групп СМ, как интегрального показателя эндотоксемии при муковисцидозе, поскольку при этой патологии диагностируются факторы, которые как по отдельности, так и при своем сочетании способны вызывать нарушения баланса протеиназно-ингибиторной системы организма и состояние гиперпептидемии.

Материалы и методы

Группа исследования составила 16 пациентов с МВ, в качестве контроля использованы данные, полученные от 230 интактных доноров. В качестве тестов, характеризующих состояние протеиназно-ингибиторной системы в плазме крови больных муковисцидозом, определяли трипсиноподобную (ТпА) активность и уровень наиболее значимых плазменных ингибиторов α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) и α_2 макроглобулина (α_2 -МГ), используя для этой цели синтетический хромогенный субстрат ВАРНА (L-бензоил-DZ-аргинин-п-нитронирид) по методу Карягиной И.Ю. и соавт. [5]. Концентрацию пептидов группы СМ оценивали кислотнo-этанольным осаждением [3,6,7]. Для суждения о степени динамической сбалансированности в изучаемой системе протеиназы – ингибиторы протеиназ, для каждого индивидуального анализа рассчитывался коэффициент, представляющий собой отношения ТпА/ α_1 -АТ [1,2,5]. Величина его, определенная по плазме крови доноров, составила 4,0-9,6. Отклонения от нормального диапазона значения индекса, сбалансированность в любую сторону расценивалась как состояние развивающегося дисбаланса протеиназно-ингибиторной системы.

О степени эндогенной интоксикации судили по уровню средних молекул (СМ) в плазме модифицированным методом кислотнo-этанольного осаждения [7].

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 1, протеиназная активность в среднем по группе детей больных муковисцидозом составила $54,75 \pm 22,68$ нмоль/л•с, что находилось в диапазоне физиологических колебаний (12-67,0 нмоль/л•с). Однако при анализе полученных результатов отмечался значительный разброс колебаний среднего показателя трипсиноподобной активности (ТпА) плазмы, что делает невозможным интерпретацию полученных данных при значительных фенотипических проявлениях заболеваний у больных МВ. При этом ингибиторная активность плазмы по уровню α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) составила $2,09 \pm 0,78$ мкмМ/л•с и была значительно ниже нормы, а содержание α_2 -макроглобулина было выше верхней границы физиологического колебания ($1,30 \pm 0,20$ мкмМ/л•с против $0,7-1,1$ мкмМ/л•с в контроле), что в целом трудно объяснить с позиции патофизиологии.

Уровень средних молекул (СМ) значительно превысил норму ($1,07 \pm 0,12$ г/л против $0,35 - 0,88$ г/л). При этом индекс сбалансированности в целом по группах был в 4,4 раза выше по

сравнению с аналогичными показателями у интактных доноров ($29,96 \pm 14,78$ против $4-9,6$ у интактных доноров).

Учитывая то обстоятельство, что пациенты с муковисцидозом, составляющие группу наблюдения, страдали тяжелыми проявлениями основного заболевания, а степень выраженности клинического течения болезни и характер сопутствующих осложнений значительно различались, мы посчитали необходимым провести внутрigrупповой анализ, чтобы попытаться установить основные закономерности и соответствие их с клиническими особенностями заболевания.

В результате были выделены 3 группы по особенностям динамики протеиназно-ингибиторной системы и уровню СМ у пациентов с муковисцидозом (таблица 2).

При проведении внутрigrуппового анализа установлено, что у 2-х детей с муковисцидозом (1 группа) протеиназно-ингибиторная система находится в равновесном состоянии, что нашло свое отражение в индексе сбалансированности, который составил 8,9 и 9,3 соответственно (при норме 4-9,6). Ингибиторная активность по α_1 -АТ и α_2 -МГ не отличалась от уровня этих показателей у интактных доноров, и составила $3,47 \pm 0,09$ мкмМ/л•с и $1,16 \pm 0,17$ мкмМ/л•с соответственно.

На уровне физиологической нормы была и трипсиноподобная активность плазмы крови $31,6$ нмоль/л•с при диапазоне колебаний ($12,0 \pm 67,0$ мкмМ/л•с). При этом уровень пептидов группы СМ оказался в этой группе повышен в 1,2 раза по сравнению с интактными донорами ($P < 0,05$) и составил $1,18 \pm 0,11$ г/л.

Анализ клинической картины показал, что это были дети в возрасте 17 и 11 лет с сформировавшимся на фоне муковисцидоза хроническим вторичным деформирующим бронхитом без бронхоэктазов. Однако у ребенка 11 лет имелись тяжелые осложнения в виде стафилококковой инфекции, цирроза печени, легочной гипертензии, сформировавшимся легочным сердцем, варикозным расширением вен пищевода 3 степени. Диагноз установлен у этих больных в возрасте $3,5 \pm 2,0$, терапия начата рано, доза креона - 10 на момент обследования составила в среднем 115000 ± 20000 ЕД по липазе. Течение муковисцидоза среднетяжелое и тяжелое по характеру основного заболевания и осложнений. Анализируя полученные данные, можно думать, что повышение в 1,2 раза уровня СМ в плазме крови у этих больных при компенсации протеиназно-ингибиторных факторов свидетельствует о состоянии выраженной эндогенной интоксикации, не корригируемой в ходе традиционной терапии, и хотя баланс протеиназно-ингибиторной системы и сохранен, но он находится в фазе неустойчивого равновесия.

У 6 пациентов с муковисцидозом (II группа) (37,5%) в возрасте $12,3 \pm 3,3$ лет уровень плазменного протеолиза оценивался нами как состояние протеаземии, так как активность ТпА у этих больных достоверно превышала верхнюю границу нормы и составила $82,1 \pm 13,22$ мкмМ/л•с. Ингибиторный потенциал за счет снижения активности α_1 -АТ ($2,02 \pm 0,4$ мкмМ/л•с) может свидетельствовать о уже имеющемся относительном дефиците этого ингибитора и, следовательно, о быстром расходовании его на нейтрализацию активированного протеолиза. В этих условиях даже незначительное повышение у этих больных α_2 -МГ ($1,29 \pm 0,21$ мкмМ/л•с против $0,9 \pm 0,2$ мкмМ/л•с) может явиться защитной компенсаторной реакцией, препятствующей глубокому дисбалансу протеиназно-ингибиторной системы, который уже имеет место у этих больных, что подтверждается высоким коэффициентом дисбаланса, который был самым высоким по сравнению с 1 и 2 группой ($P^1 < 0,05$, $P^2 < 0,05$). В то же время, несмотря на высокий протеолитический потенциал, прирост продуктов ограниченного протеолиза белка – пептидов группы СМ, оказался ниже ожидаемого по сравнению с 1 и 3 группой ($1,08 \pm 0,15$ г/л против $0,61 \pm 0,26$ г/л), но в 1,7 раза выше, чем в контроле, что обусловлено, по-видимому, сохраняющейся на достаточно высоком уровне активностью α_2 -МГ ($1,29 \pm 0,21$ мкмМ/л•с против $0,9 \pm 0,2$ мкмМ/л•с) и ферментов группы экзопептидов, утилизирующих пептидные фрагменты до аминокислот и их эффективное удаление через почки. Анализ клинической картины у этих больных показал, что во всех случаях это были дети с тяжелой формой муковисцидоза, с явлениями рас-

пространенного бронхоэктатического процесса, проявляющегося множественным двухсторонним пневмофиброзом, бронхоэктазами (мешотчатые, цилиндрические), хроническим носительством синегнойной и стафилококковой инфекции, поражениями печени в виде цирроза, хронической панкреатической недостаточностью (100%), гепатопатиями (70%), хроническими гепатитами (30%). Ни в одном случае не было отмечено поражения почек. Диагноз выставлен у этих больных в возрасте у 3-х пациентов в 4,7±1,7мес. и 2-х - 9,5±1,2 лет.

Средняя доза креона у этой группы детей составила 212 500±35000ЕД по липазе, что в 1,8 раза превышало аналогичные цифры у больных 1 группы, что является отражением тяжелого течения болезни независимо от возраста установления диагноза и начатой терапии. Таким образом, тяжелое течение муковисцидоза сопровождается явлениями протеолиза, накоплением продуктов ограниченного протеолиза, снижением ингибиции протеолитической активности, что обусловлено тяжестью основного заболевания, развивающимися осложнениями в виде тяжелой бактериальной агрессии и нарушениями функции, как печени, так и других органов и систем и сопровождающимися длительной и тяжелой хронической эндогенной интоксикацией, не корригируемой проводимой активной терапией.

В третью группу пациентов с муковисцидозом вошли 9 больных, у которых активность ТПА находилась в диапазоне физиологической нормы (44,72±12,55мкМ/л•с), но при этом регистрировалась крайне низкая ингибиторная активность α1-АТ (1,83±0,7мкМ/л•с против 5,0±1,1мкМ/л•с, диапазон колебаний 3-7,0мкМ/л•с), что нашло свое отражение в коэффициенте сбалансированности, который превысил значения контроля в 2,6 раза (28,18±12,55мкМ/л•с при 6,8±2,8мкМ/л•с в контроле, диапазон колебаний 4-9,6мкМ/л•с), что может свидетельствовать о декомпенсации ингибиторного звена протеиназно-ингибиторной системы. При этом концентрация α₂-МГ оказалась самой высокой в этой группе пациентов (1,33±0,2мкМ/л•с против 0,9±0,2мкМ/л•с, при диапазоне колебаний 0,7-1,1мкМ/л•с). Скорее всего, это можно расценить как благоприятный прогностический признак, так как даже в условиях значительной тяжести воспалительного процесса и его распространенности у этой группы детей наблюдается значительное компенсаторное напряжение защитных субклеточных систем организма, при котором антипротеолитический потенциал поддерживается за счет увеличения синтеза α₂-МГ.

Клинический анализ позволил установить, что диагноз муковисцидоза был установлен у этих пациентов рано, в 3,6 ± 0,5мес. По характеру и тяжести течения у всех пациентов отмечено к началу обследования тяжелое - среднетяжелое течение муковисцидоза. Легочные поражения характеризовались развитием вторичного хронического фиброзирующего бронхита (100%), вторичными множественными (90%) и единичными (10,0%) бронхоэктазами, хроническим носительством синегнойной и стафилококковой инфекции (50%), поражением печени в виде гепатопатии (50%), цирроза печени (12,5%), хронической панкреатической недостаточностью (100%).

Нам представляется важным выделить клинические критерии, которые могут находиться в тесной взаимосвязи с выявленными нарушениями протеиназно-ингибиторной системы и уровнем средних молекул при муковисцидозе.

Оказалось, что в случае, когда протеиназно-ингибиторная система находилась в равновесном состоянии, а уровень средних молекул был высоким - клиническая картина бронхолегочного процесса больных муковисцидозом характеризовалась наличием хронического

Таблица 1. Показатели протеиназно-ингибиторной системы и уровень средних молекул у детей больных муковисцидозом

	ТПА нмоль/л•с	α ₁ -АТ мкМ/л•с	α ₂ -МГ мкМ/л•с	СМ, г/л	ТПА/ α ₁ -АТ
Больные муковисцидозом n=16	54,55±22,68	2,09±0,78	1,30±0,20	1,07±0,12	29,96±14,78
Диапазон колебаний (интактные доноры)	12-67,0	3,0-7,0	0,7-1,1	0,35-0,88	4,0-9,6

деформирующего бронхита без бронхоэктазов, а носительство стафилококковой и синегнойной инфекций находилось только у острой стадии.

У больных с высокой активностью протеолиза и увеличением уровня средних молекул в 1,7 раз бронхолегочный процесс носил распространенный характер, для него были характерны тяжелые поражения легких в виде множественных бронхоэктазов с обеих сторон, а носительство стафилококковой и синегнойной палочки носило хронический характер(100%). Ингибиторное звено с увеличением уровня средних молекул в 1,7 раз преобладало у больных с вторичным хроническим бронхитом с явлениями пневмофиброза, преимущественно локальными цилиндрическими бронхоэктазами и острым носительством стафилококковой и синегнойной инфекции. Содержание средних молекул у них было увеличено в 1,7 раза.

Таким образом, анализируя клинические данные и результаты, полученные при исследовании протеиназно-ингибиторной системы и уровня средних молекул, можно сделать вывод, что выраженность дисбаланса в протеиназно-ингибиторной системе зависит от глубины поражения слизистой бронхов и фазы носительства синегнойной и стафилококковой инфекции.

Известно, что ингибиторная активность повышает устойчивость организма, являясь приспособительным механизмом в ответ на тяжелый и глубокий воспалительный процесс бронхов от действия протеаз бактериального происхождения (в частности в ответ на острое и хроническое носительство синегнойной палочки и стафилококка), и ее снижение может служить неблагоприятным прогностическим признаком, так как свидетельствует об истощении этого важного звена защиты организма.

Высокий уровень СМ в плазме крови у пациентов с муковисцидозом свидетельствует о сохраняющемся у этих детей состоянии эндогенной интоксикации, которая не корригируется проводимой терапией и не зависит от типа дисбаланса протеиназно-ингибиторной системы. Уровень средних молекул, как важный интегральный показатель эндогенной интоксикации, превышал аналогичный у интактных доноров в 1,7-1,8 раз, что свидетельствует об отсутствии достижения эффекта от терапии у всех пациентов с муковисцидозом, независимо от длительности заболевания, глубины поражения бронхолегочного дерева, тяжести осложнений и проведенной терапии, фазы болезни, что требует пересмотра терапевтических подходов к лечению пациентов с

Таблица 2. Показатели протеиназно-ингибиторной системы и уровень средних молекул у детей с муковисцидозом (внутригрупповой анализ)

	ТПА нмоль/л•с	α ₁ -АТ мкМ/л•с	α ₂ -МГ мкМ/л•с	СМ, г/л	ТПА/ α ₁ -АТ
1 группа	31,6	3,47±0,09	1,16±0,17	1,18±0,11	9,1±0,28
2 группа	44,72±12,55	1,83±0,7	1,33±0,2	1,03±0,09	28,18±12,55
3 группа	82,10±13,22	2,02±0,40	1,29±0,21	1,08±0,15	82,06±10,5
Интактный контроль	39,5±27,5 (12,0-67,0)	5,0±1,1 (3,0-7,0)	0,9±0,2 (0,7-1,1)	0,61±0,26 (0,35-0,88)	6,8±2,8 (4,0-9,6)
P ¹	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
P ²	> 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
P ³	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05
P ¹ - P ²	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
P ¹ - P ³	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
P ² - P ³	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

P¹ - 1 группа и интактный контроль
P² - 2 группа и интактный контроль
P³ - 3 группа и интактный контроль

P¹ - P² - 1 группа и 2 группа
P¹ - P³ - 1 группа и 3 группа
P² - P³ - 2 группа и 3 группа

Оригинальные научные публикации

муковисцидозом и назначения более адекватных и эффективных методов дезинтоксикации.

Литература

1. Суровкина, М.С. // Кинины и кининовая система крови.- М., 1976.-С.21-33.
2. Colman, R.W., Wong P. // Thrombosis. Haemostasis. – 1977.- vol 38, # 4. – P. 751 – 775.
3. Косинец, А.Н., Кирпиченок Л.Н. Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии.- Витебск.-2003.-409с.
4. Капранов, Н. И., Каширская Н. Ю., Петрова Н. В. Муковисцидоз: достижения и проблемы на современном этапе. Медицинская генетика, 2004; 9: 398-412.

5. Карягина, И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α 1-антитрипсина и α 2- макроглобулина в гастроэнтерологической практике // Лаб. дело, 1990.-№2.-С. 10-13.

6. Николайчик, В.В., Кирковский В.В., Моин В.М. с соавт. «Средние молекулы» – образования и способы определения // Лабораторное дело – 1989.-№8.-С31-33.

7. Николайчик, В.В., Моин В.М., Кирковский В.В., Мазур Л.И., Лобачева Г.А., Бычко Г.Н., Бараташвили Г.Г. Способ определения «Средних молекул» / Лаб. дело, 1991.-№10.-С.15-18.

Поступила 17.01.2013 г.