

На правах рукописи

**Гунбина Тамара Евгеньевна**

**СОСТОЯНИЕ ВАЗОАКТИВНЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ  
ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ НОВОРОЖДЕННЫХ**

**14.00.16 - патологическая физиология**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Томск - 2007

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

Суханова  
Галина Алексеевна

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Кондратьева  
Елена Ивановна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор

Уразова  
Ольга Ивановна,  
профессор кафедры  
патофизиологии ГОУ ВПО  
СибГМУ Росздрава

доктор медицинских наук

Кондакова  
Ирина Викторовна,  
заведующая лабораторией биохимии  
опухолей ГУ НИИ онкологии  
ТНЦ СО РАМН

**Ведущая организация:** ГОУ ВПО Омская государственная медицинская академия Росздрава

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г. в «\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Г. А. Суханова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность проблемы.* Протеолитические системы плазмы крови и тканей участвуют в процессах адаптации, защиты организма, а также развитии патологических реакций [Веремеенко К. Н., 1988; Яровая Г. А., 1993; Heidland A., 2004; Новицкий В. В., 2006]. Основными вазоактивными протеолитическими системами крови являются калликреин-кининовая и ренин-ангиотензиновая системы, обеспечивающие соответствие тонуса сосудов реологическим свойствам крови [Bradford H. N., 1993; Суровикина М. С., 1995; Homing B., 1997; Яровая Г. А., 2001; Donoghue M., 2001; Dzau V., 2001; Crackower M. A., 2002; Reckelhoff J. F., 2003; Barros N. M., 2004; Calixto J. B., 2004; Siani A., 2004; Legedz L., 2005; Альтшулер Б. Ю., 2006]. Функционирование протеолитических систем обеспечивается путем многократного контроля: наличия неактивных предшественников, внутриклеточных, внеклеточных ингибиторов, каскадных механизмов активации [Foca C., 2002; Кузнецова Н. А., 2004; Чистякова Г. Н., 2006; Зорина В. Н., 2007].

Универсальным активатором протеолиза является гипоксия-ишемия [Li X. B., 1996; Шабалов Н. П., 2000; Шахматов И. И., 2007]. Дефицит кровоснабжения нервной ткани при гипоксии компенсируется за счет раскрытия анастомозов, при этом факторы роста эндотелия сосудов активируют протеиназы [Pal S., 1997; Pupilli C., 1999; Кушлинский Н. Е., 2002; Пальцев М. А., 2004]. Известно также, что в условиях гипоксии или ишемии, возникающей в быстрорастущих опухолях, усиливается секреция протеолитических ферментов, происходит активация ангиогенных факторов HIF-1 и VEGF [Hood J. D., 1998; Ziche M., 1997; Петрова Л. В., 2004; Flyubjerg A., 2000; Touyz R. M., 2000; DeVriese A. S., 2001; Schrijevvers B. F., 2004; Трапезникова М. Ф., 2005]. Сведения о механизмах нарушения гемодинамики и ангиогенеза при гипоксии новорожденных отсутствуют. В этом плане значительный интерес представляет изучение состояния протеолиза в пуповинной, периферической крови, ликворе плода и новорожденных.

Перинатальная энцефалопатия новорожденных является результатом патологии беременности, наиболее выраженные повреждения нервной ткани отмечаются у недоношенных детей [Nyakas C., 1996; Петтерсон В. Д., 2003;

Кешишян Е. С., 2004; Буштырева И. О., 2005; Барашнев Ю. И., 2006; Ганнушкина И. В., 2007]. Среди осложнений беременности одно из ведущих мест занимает фетоплацентарная недостаточность, связанная с нарушением гемодинамики плаценты и постнатальным повреждением тканей и органов новорожденного, прежде всего мозговых структур [Крукиер И. И., 2006]. Избыточный кининогенез может нарушать течение беременности и родов [Абрамченко В. В., 1997, Денисова В. С., 2006]. Известно, что при гипоксии сосуды головного мозга наиболее чувствительны к воздействию кининов, которые расширяют просвет сосудов и усиливают венозный отток [Веремеенко К. Н., 1988; Щербакова И. В., 1998; Суровикина М. С., 1995; Чувакова Т. К., 2001; Yin H., 2005]. Активность ингибиторов протеолиза при гипоксии снижается, что создает дополнительные условия для активации кининогенеза [Басис В. Ю., 1987; Казанская Н. Ф., 1994; Ikarı Y., 2001; Кузьменко Г. Н., 2006]. Повышение активности ангиотензинпревращающего фермента, участвующего в перераспределении кровотока в ишемизированные органы может приводить к повреждению эндотелия сосудов [Dzau V. J., 1994; Spiering W., 2000; Pinheiro H., 2002; Didion S. P., 2003; Tiago A. D., 2003; Березнева Н. А., 2006; Романова Л. В., 2006; Коровина Н. А., 2007; Титов В. Н., 2007; Хамадуллаева Г. А., 2007].

Высокая частота рождения детей с перинатальным поражением центральной нервной системы гипоксического генеза (более 60% всех заболеваний нервной системы в детском возрасте) сопровождается задержкой психомоторного развития, умственной недостаточностью, двигательными расстройствами [Finer N. N., 1981; Gunn A., 1996; Кешишян Е. С., 2004; Wunderlich M. T., 2004; Babayan E., 2005; Барашнев Ю. И., 2006; Герасимова, М. М., 2006; Свирский А. В., 2006; Шантарина Е. В., 2006; Яцык Г. В., 2007]. Взаимодействие калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем пуповинной, периферической крови и ликвора, роль ингибиторов протеолиза в регуляции гемодинамики новорожденных, их значение для оценки степени недоношенности и фетоплацентарной недостаточности ранее не рассматривались. Перспективным для оценки повреждений мозга является изучение нейрон-специфической

енолазы [Missler U., 1997; Буркова А. С., 2004; Чехонин В. П., 2006; Карякина Г. М., 2007]. Этот фермент используют в качестве маркера нейробластомы и мелкоклеточного рака легких [Торопова Н. Е., 1995; Морозов Г. В., 1998; Преображенская И. С., 2001]. Его роль при перинатальной энцефалопатии новорожденных, связь с факторами регуляции гемодинамики изучена недостаточно.

Оценка состояния протеолиза и изменений нейрон-специфической енолазы при родах и в динамике развития новорожденных позволит выявить механизмы развития сосудистых осложнений и повреждений головного мозга при перинатальной энцефалопатии.

Цель работы: установить роль калликреин-кининовой, ренин-ангиотензиновой систем и нейрон-специфической енолазы при перинатальной энцефалопатии доношенных и недоношенных детей.

Задачи исследования:

1. Изучить активность калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в биологических жидкостях: пуповинной, периферической крови и ликворе новорожденных детей.
2. Исследовать активность калликреина, калликреиногена, ангиотензинпревращающего фермента,  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина доношенных и недоношенных детей при перинатальной энцефалопатии.
3. Оценить изменения содержания нейрон-специфической енолазы сыворотки периферической крови у доношенных и недоношенных детей при перинатальной энцефалопатии.
4. Охарактеризовать влияние фетоплацентарной недостаточности и степени недоношенности на показатели протеолиза и нейрон-специфической енолазы новорожденных детей. Оценить диагностическую значимость изучаемых показателей при перинатальной энцефалопатии новорожденных.

Научная новизна. Впервые установлено, что при родах происходит активация кининогенеза пуповинной крови, более выраженная у новорожденных с перинатальной энцефалопатией, чем у здоровых детей. При перинатальной энцефалопатии на фоне увеличения активности калликреина наблюдается снижение активности ангиотензинпревращающего фермента и  $\alpha_1$ -протеиназного

ингибитора, что наряду с фетоплацентарной недостаточностью и недоношенностью характеризует нарушение нормальных родов. Новыми являются данные о повышении отношений КК/АПФ, КК/ $\alpha_1$ -ПИ и КК/ $\alpha_2$ -МГ, свидетельствующие о наличии дисбаланса протеолитических систем и преобладании процессов кининогенеза при перинатальной энцефалопатии. Впервые показано, что в ликворе доношенных и недоношенных новорожденных активность калликреина и ангиотензинпревращающего фермента ниже, однако активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина ликвора в 1,5-1,9 раза превышает их значения в плазме крови. Умеренная активация кининогенеза в течение года после рождения недоношенных детей относится к адаптивным реакциям организма при дефиците кислорода. Повышение активности ангиотензинпревращающего фермента и снижение активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора в крови являются факторами риска развития сосудистых осложнений при кислородной недостаточности. Для оценки повреждений нервной ткани у доношенных и недоношенных новорожденных с перинатальной энцефалопатией перспективным является определение содержания нейрон-специфической енолазы в сыворотке.

Теоретическая и практическая значимость. В работе представлены результаты исследования активности протеолитических ферментов, их ингибиторов в пуповинной, периферической крови, ликворе и уровня нейрон-специфической енолазы сыворотки крови доношенных и недоношенных новорожденных с перинатальной энцефалопатией в течение первого года после рождения, а также практически здоровых новорожденных. Выявлена активация кининогенеза пуповинной и периферической крови, которая, способствует переходу кровообращения с фетального на неонатальный тип. Установлено, что перинатальная энцефалопатия приводит к угнетению активности ингибиторов протеолиза, повышению активности ангиотензинпревращающего фермента и уровня нейрон-специфической енолазы крови. В ликворе при этом наблюдается повышение ингибиторной активности и снижение активности ангиотензинпревращающего фермента. Рассчитанные протеиназно-

ингибиторные индексы, свидетельствуют о преобладающем влиянии кининовой системы на гемодинамику в период новорожденности. Показано, что фетоплацентарная недостаточность влияет на ангиотензинпревращающий фермент и  $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор, а степень недоношенности в большей степени отражается на показателях калликреина и нейрон-специфической енолазы.

Полученные данные позволяют охарактеризовать церебральную гемодинамику, целостность нервной ткани, а также могут быть использованы для прогнозирования течения патологического процесса.

#### Основные положения, выносимые на защиту.

1. Активация кининогенеза при родах происходит у здоровых и больных новорожденных. При перинатальной энцефалопатии на фоне значительного увеличения активности калликреина в пуповинной крови снижается активность ангиотензинпревращающего фермента и  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора. В ликворе новорожденных с перинатальной энцефалопатией увеличивается активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина.
2. Определение нейрон-специфической енолазы при перинатальной энцефалопатии является одним из важных показателей повреждения нейронов и гемато-энцефалического барьера, уровень которой зависит от фетоплацентарной недостаточности и степени недоношенности. Активность калликреина и ангиотензинпревращающего фермента отражает состояние сосудистой гемодинамики.
3. Увеличение отношения КК/АПФ характеризует дисбаланс вазоактивных протеолитических систем у детей с перинатальной энцефалопатией. Высокая активность ангиотензинпревращающего фермента и низкая активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора в сыворотке крови новорожденных являются факторами риска развития сосудистых осложнений.

#### Реализация и апробация работы.

Основные результаты представлены на региональных и российских конференциях: VI конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о

человеке» (Томск, 2005); Четвертой Российской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2005); I Международной (X Всероссийская) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2006); межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и наука: итоги и перспективы» (Саратов, 2006); Всероссийской научной конференции «Механизмы индивидуальной адаптации», посвященной памяти и 100-летию профессора В. А. Пегеля (Томск, 2006); на заседаниях кафедр патофизиологии, биохимии и молекулярной биологии, педиатрии ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Работа выполнена в рамках подпрограммы «Здоровый ребенок» на 2004-2006 годы областной программы «Дети Томской области», пункт 2.4. «Разработка программы поиска и внедрения диагностических маркеров поражения ЦНС новорожденных и детей раннего возраста».

Результаты диссертационных исследований используются в учебном процессе на кафедрах биохимии и молекулярной биологии и педиатрии ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ из них 3 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 143 страницах, содержит 32 таблицы и 16 рисунков. Библиография включает 304 литературных источников, из них 186 отечественных и 118 иностранных авторов.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Обследовано 110 новорожденных детей с перинатальной энцефалопатией (ПЭ) в течение первого года после рождения. Больных наблюдали в отделении патологии новорожденных МЛПУ детской больницы №1, где проводились стандартные диагностические и реабилитационные мероприятия. Контрольную группу составили 16 практически здоровых детей, клинические и биохимические показатели которых соответствовали средним критериям здорового новорожденного. Дизайн исследования – простое, сравнительное,



продолженное (рис. 1). Диагноз перинатальной энцефалопатии устанавливали в соответствии с классификацией перинатальных поражений нервной системы у новорожденных [Буркова А. С., 2003].

При разделении новорожденных на группы использовали срок гестации (недели беременности), массу тела новорожденного. В группу доношенных включено 32 ребенка с перинатальной энцефалопатией (ПЭ). Группы недоношенных I, II, III состояли из 24-27 новорожденных.

Для исследования использовали пуповинную, периферическую кровь и ликвор после подписания добровольного информированного согласия. У практически здоровых новорожденных изучали показатели протеолиза в пуповинной крови при родах, в периферической крови - на 7, 14, 30 сутки после рождения. При перинатальной энцефалопатии у доношенных и недоношенных детей также определяли показатели протеолиза периферической крови через 3-6, 9-12 месяцев после рождения. Исследование протеолиза ликвора проводили в том случае, если ребенку была показана люмбальная пункция.

В плазме и сыворотке периферической, пуповинной крови и ликворе определяли активность калликреина (КК), калликреиногена (ККГ) по методу Т. С. Пасхиной, А. В. Кринской (1974), ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [Голиков П. П., Николаева Н. Ю., 1998],  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha_1$ -ПИ) и  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ -МГ) по методу В. Ф. Нартиковой, Т. С. Пасхиной (1979), изучали содержание нейрон-специфической енолазы (НСЕ) сыворотки крови с помощью иммуноферментных наборов CanAg (Канада).

Статистический анализ данных проводили с помощью прикладных программ Statistica 6.0. При проверке на нормальность использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для определения различий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни. Проводили корреляционный, регрессионный и дисперсионный анализы. Построена обобщенная линейная дисперсионная GLM модель. Рассчитаны коэффициенты чувствительности, специфичности и прогностической ценности используемых биохимических показателей [Гланц С., 1998; Флетчер Р., 1998; Кучеренко В. З., 2006].

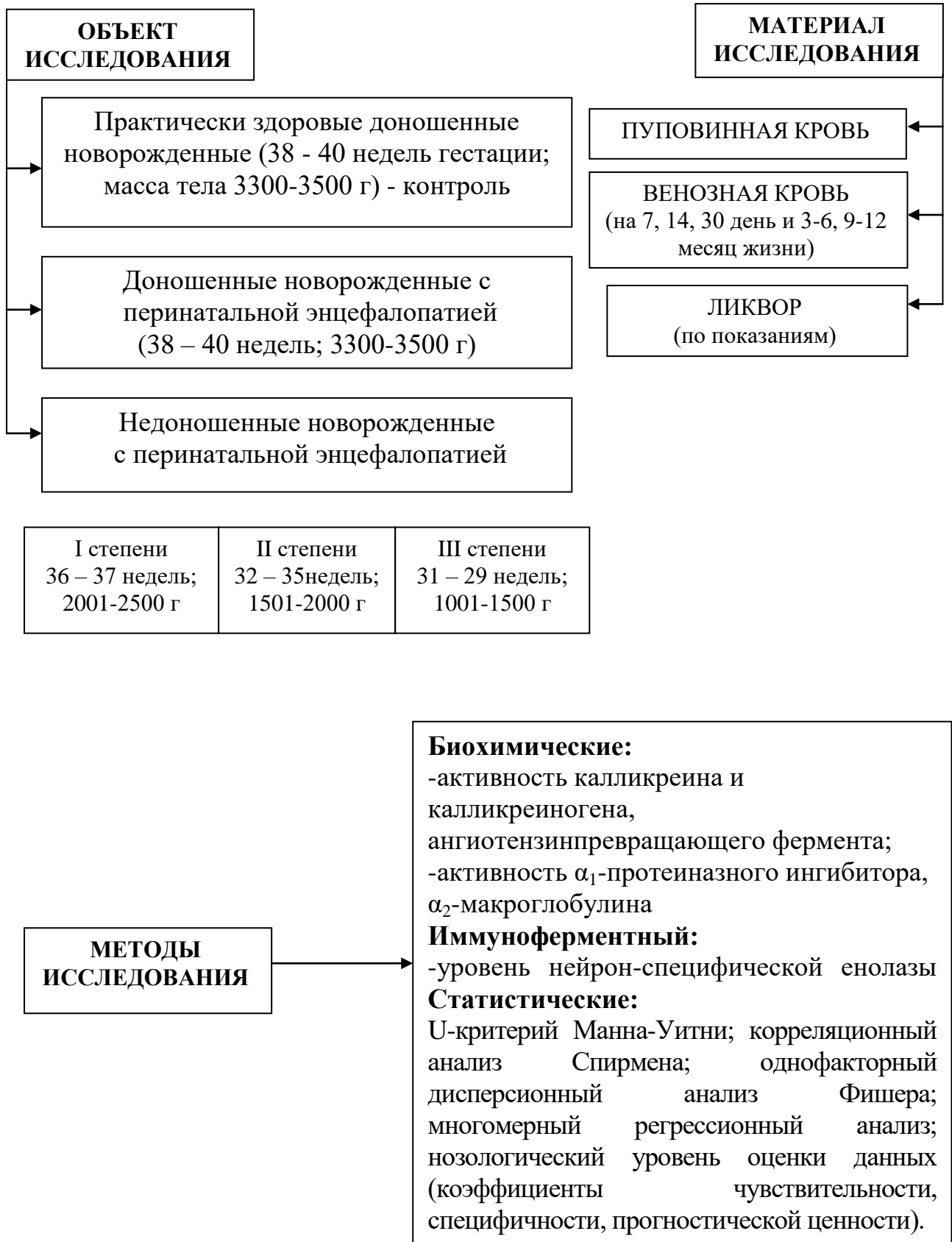


Рис. 1. Дизайн исследования

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования активности протеиназ, ингибиторов в пуповинной и периферической крови на 7 сутки после рождения здоровых детей представлены в табл. 1.

Таблица 1

Активность протеиназ и ингибиторов практически здоровых детей ( $M \pm m$ )

Показатели	Референтные значения (Пасхина Т.С., 1974; Голиков П.П., 1998; Нартикова В.Ф., 1979)	Пуповинная кровь (n = 10)	Периферическая кровь через 7 суток после рождения (n = 16)
Калликреин, мЕ/мл	30,00 - 79,26	81,24 ± 4,82 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	67,97 ± 7,11 p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>
Калликреиноген, мЕ/мл	340,00 - 373,69	231,62 ± 24,96 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	174,97 ± 7,44 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>
Ангиотензин- превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,20 - 42,00	53,61 ± 6,19 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	37,27 ± 1,57 p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>
α <sub>1</sub> -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,80 - 29,50	54,66 ± 7,21 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	28,62 ± 1,23 p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>
α <sub>2</sub> -макроглобулин, ИЕ/мл	2,30 - 5,10	1,06 ± 0,15 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	2,41 ± 0,23 p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>

Примечание:

p<sub>1</sub> - уровень статистической значимости по сравнению с референтными значениями;

p<sub>2</sub> - уровень статистической значимости по сравнению с пуповинной кровью

В пуповинной крови все показатели, кроме ККГ и α<sub>2</sub>-МГ, превышали соответствующие референтные значения. Активность КК и АПФ пуповинной крови была на 21% и 53% выше, активность ККГ снижалась на 35%, по отношению к соответствующим референтным значениям. Активность α<sub>1</sub>-ПИ

пуповинной крови в 2,0 раза превышала референтные значения, активность  $\alpha_2$ -МГ реципрокно была на 48% ниже.

Через 7 суток после рождения ребенка в плазме периферической крови активность протеиназ и ингибиторов находилась в пределах референтных значений ( $p > 0,05$ ), но снижались по отношению к пуповинной крови ( $p < 0,05$ ). Через 14 суток после рождения вновь происходила активация ККС периферической крови практически здоровых новорожденных, определяющая ее существенную роль в неонатальный период (рис.2). В этот период значительно повышалась активность КК, ККГ и  $\alpha_1$ -ПИ, что, очевидно, обусловлено становлением системы регуляции ККС. К 30 суткам после рождения все показатели, кроме  $\alpha_1$ -ПИ, снижались до уровня 7 суток. Активность  $\alpha_1$ -ПИ плазмы крови оставалась повышенной. Активность АПФ в этот период не изменялась.

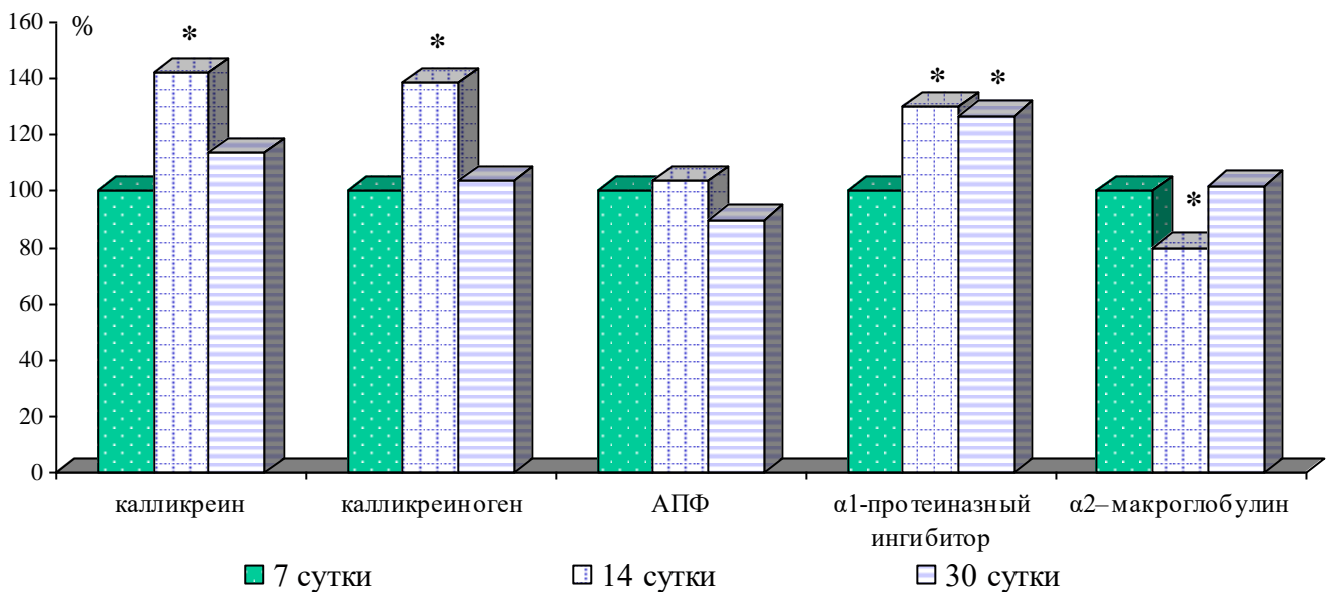


Рис. 2. Активность протеиназ и их ингибиторов в плазме крови практически здоровых детей в течение первого месяца после рождения

\* - уровень статистической значимости по сравнению с 7 сутками ( $p < 0,05$ )

Для оценки состояния протеолиза были рассчитаны протеиназно-ингибиторные индексы (ПИИ), представляющие отношение КК/АПФ, КК/ $\alpha_1$ -ПИ, КК/ $\alpha_2$ -МГ и  $\alpha_1$ -ПИ/ $\alpha_2$ -МГ. На 14 сутки после рождения практически здоровых детей наблюдалось повышение всех ПИИ относительно 7 суток. Соотношение

КК и АПФ свидетельствует о преобладающем влиянии КК на гемодинамику, способствующего вазодилатации, наиболее выраженном на 14 сутки. В этот же срок повышается отношение КК к ингибиторам, также характеризующее активацию кининогенеза.

При перинатальной энцефалопатии активация кининогенеза более выражена чем у здоровых детей. Активность КК и ККГ пуповинной крови доношенных и недоношенных новорожденных с ПЭ повышалась в большей степени, чем в контроле, но активность АПФ и  $\alpha_1$ -ПИ была снижена (рис. 3). Дилатация кровеносных сосудов, связанная со значительной активацией кининогенеза, снижение активности АПФ и  $\alpha_1$ -ПИ, наряду с фетоплацентарной недостаточностью и недоношенностью, являются, вероятно, факторами нарушения нормальных родов и последующего развития нервной и дыхательной систем. Известно, что гиперактивация ККС приводит к нарушению беременности и родовой деятельности [Абрамченко В. В., 1997; Денисова В. С., 2006].

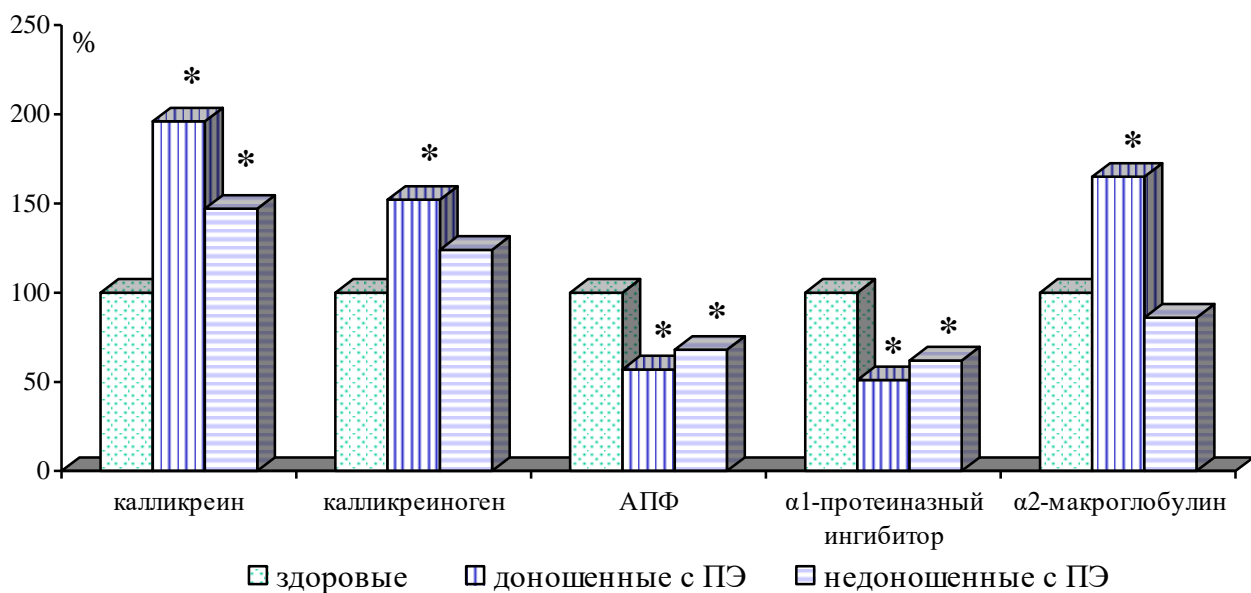


Рис. 3. Активность ферментов и ингибиторов протеолиза в пуповинной крови новорожденных детей с перинатальной энцефалопатией

\* - уровень статистической значимости по сравнению со здоровыми ( $p < 0,05$ )

Калликреин-кининовая система крови является центральным звеном в комплексе гуморальных систем, регулирующих гомеостаз, участвует в адаптивно-защитных реакциях организма при гипоксических состояниях.

Образование кининов под действием калликреина плазмы крови приводит к увеличению кровообращения в миокарде, почках, мозге, органов брюшной полости, мышцах, секреторных железах [Магомедова М. П., 1995; Дзизинский А. А., 2001]. В периферической крови доношенных детей с ПЭ высокая активность КК сохранялась до 30 суток. Активность КК у недоношенных детей с ПЭ превышала контрольные значения в 2,6-2,9 раза на 7 сутки после рождения и сохранялась в течение 12 месяцев (рис. 4).

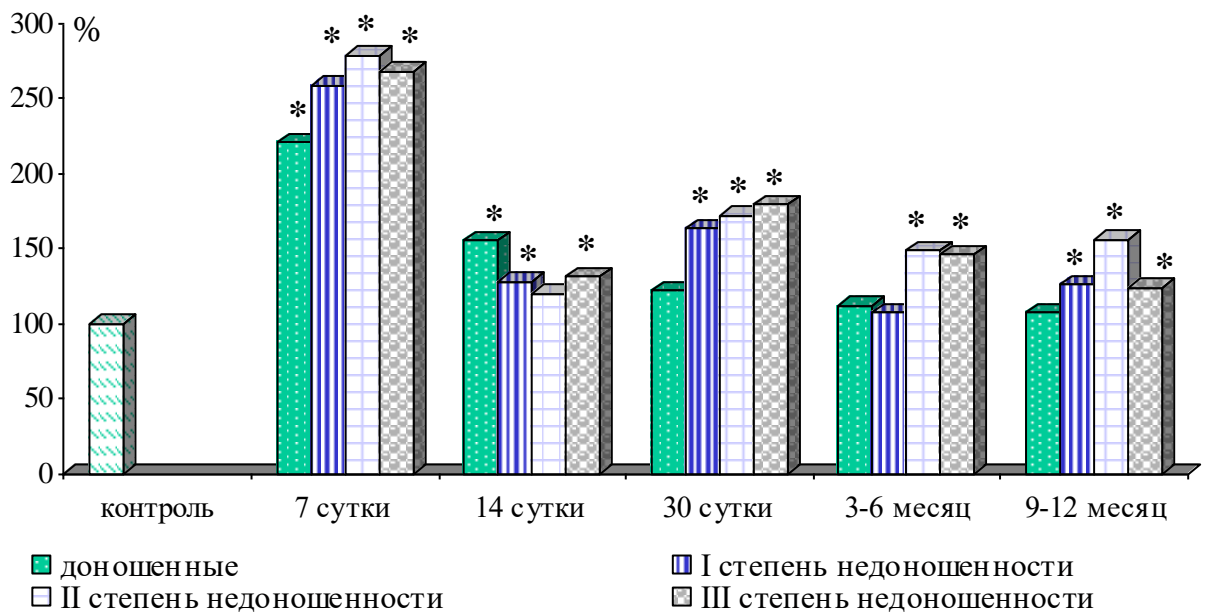


Рис. 4. Активность калликреина плазмы крови доношенных и недоношенных детей с перинатальной энцефалопатией

\*- достоверность различий по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

РАС, являясь антагонистом ККС, также участвует в перераспределении кровотока к наиболее нуждающимся органам, в частности головному мозгу и легким [Павлюк В. П., 1990; Поляк М. Г., 1987]. Повышение активности АПФ сыворотки крови происходит во всех группах новорожденных (рис. 5). У доношенных детей с ПЭ этот показатель увеличивался в 1,4 раза по сравнению со здоровыми детьми только на 7 сутки после рождения. У недоношенных детей высокая активность АПФ сохранялась до 12 - месячного возраста. Повышение активности АПФ имеет существенное значение для оценки возможных сосудистых осложнений новорожденных детей. Повышение значений

активности АПФ на 7 сутки после рождения выявлена у 21% доношенных новорожденных с ПЭ. Количество детей с высокой активностью АПФ в группах недоношенных детей составило 23%-28%. В дальнейшем (через 9-12 месяцев) количество доношенных детей с ПЭ с высокой активностью АПФ снижалось до 10%. Однако в группах недоношенных детей с ПЭ через 9-12 месяцев после рождения их число увеличивалось до 30%, что убедительно свидетельствует о вкладе недоношенности в становлении регуляции вазоактивных систем.

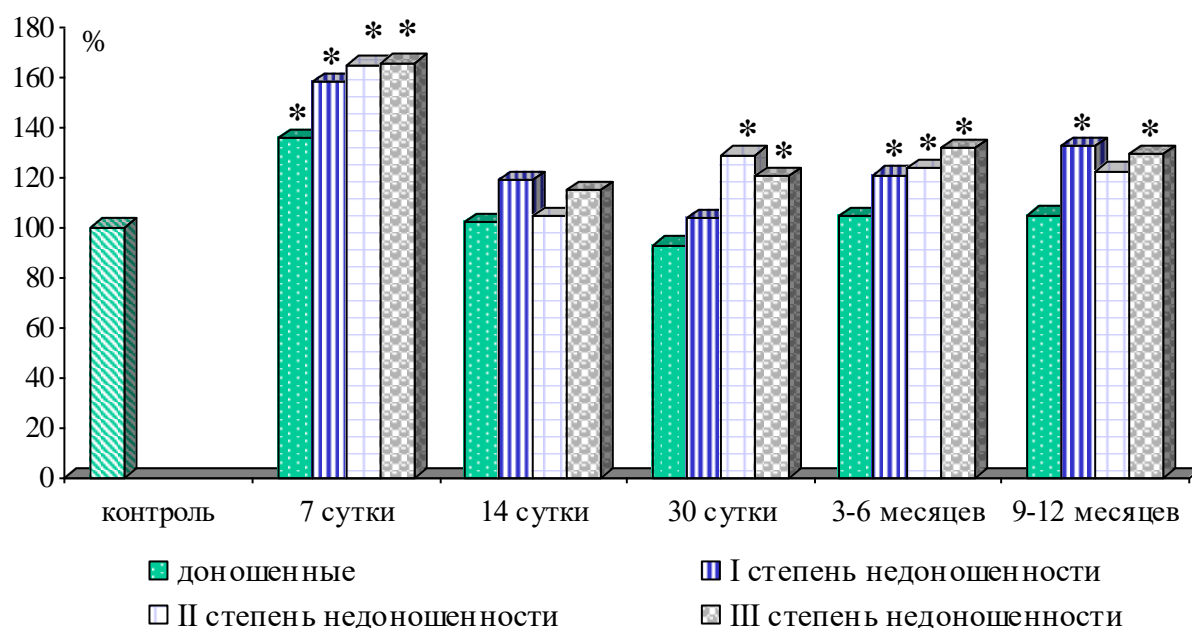


Рис. 5. Активность ангиотензинпревращающего фермента сыворотки крови (в % к контролю) доношенных и недоношенных детей с перинатальной энцефалопатией  
\* - достоверность различий по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

В связи с тем, что при перинатальной энцефалопатии новорожденных одновременно наблюдается активация ККС и РАС, рассчитано отношение активности калликреина к ангиотензинпревращающему ферменту у новорожденных детей, которое при перинатальной энцефалопатии было выше, чем в группе здоровых детей. Наиболее выраженное повышение этого показателя наблюдалось на 7 сутки после рождения (рис 6). У доношенных детей с ПЭ индекс КК/АПФ был в 1,9 раза выше, чем в группе здоровых детей, при I, II и III степени недоношенности этот показатель повышался в 1,9-2,8 раза. Увеличение отношения КК/АПФ

свидетельствует о более выраженной активации кининогена и о преобладающем влиянии ККС на гемодинамику новорожденных с ПЭ по сравнению с РАС.

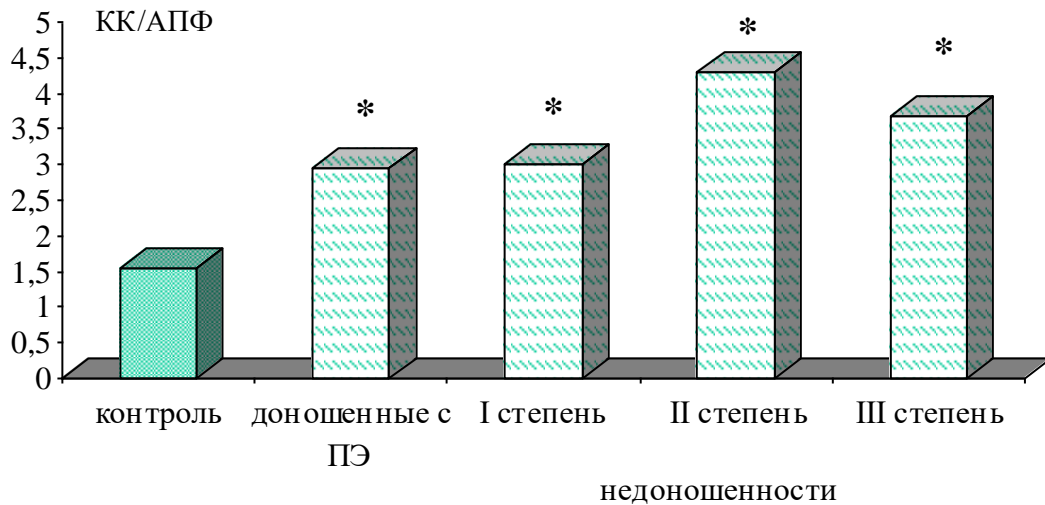


Рис. 6. Индекс КК/АПФ периферической крови новорожденных детей с перинатальной энцефалопатией на 7 сутки после рождения

\*- уровень статистической значимости по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Контроль за активностью протеолитических систем осуществляют внутриклеточные и внеклеточные ингибиторы, к которым относятся  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ. При перинатальной энцефалопатии на фоне высокой активности протеиназ активность их ингибиторов в периферической крови изменялась в меньшей степени. Наиболее выраженное повышение активности  $\alpha_1$ -ПИ в плазме крови детей с перинатальной энцефалопатией обнаружено на 7 сутки и 9-12 месяцы после рождения (рис. 7).

Следует отметить, что через 7 суток этот показатель повышался у доношенных и недоношенных II степени ( $p < 0,05$ ). В группе недоношенных III степени активность  $\alpha_1$ -ПИ снижалась. Через 9-12 месяцев обнаружено угнетение этого ингибитора у детей II и III степени недоношенности с ПЭ. Недостаточность  $\alpha_1$ -ПИ может приводить к значительной активации протеолитических процессов. Количество детей с пониженной активностью у доношенных с ПЭ составило 11%, а в группах недоношенных новорожденных – 22-41% детей. Высокие значения отношения КК/ $\alpha_1$ -ПИ свидетельствуют о нарушении контроля над протеолитическими процессами крови при гипоксии.



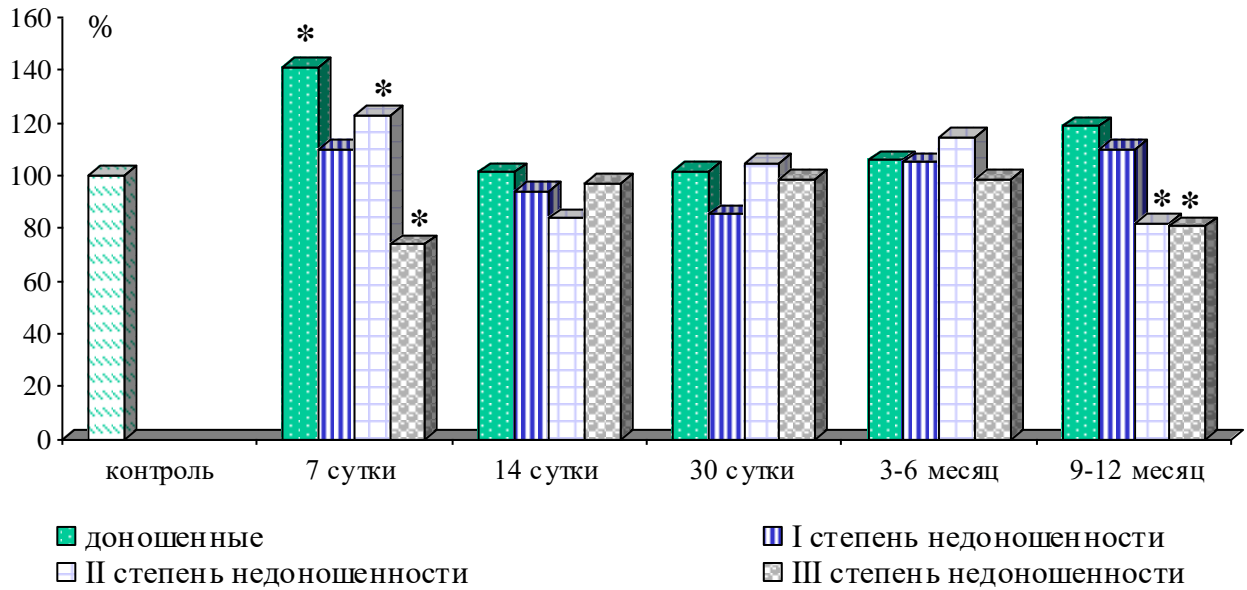


Рис. 7. Активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора плазмы крови доношенных и недоношенных детей с перинатальной энцефалопатией

\* - уровень статистической значимости по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Активность  $\alpha_2$ -МГ снижается у доношенных и детей I, III степени недоношенности детей через 7 суток, повышается у новорожденных II степени недоношенности и через 14 суток после рождения при III степени недоношенности (рис. 8).

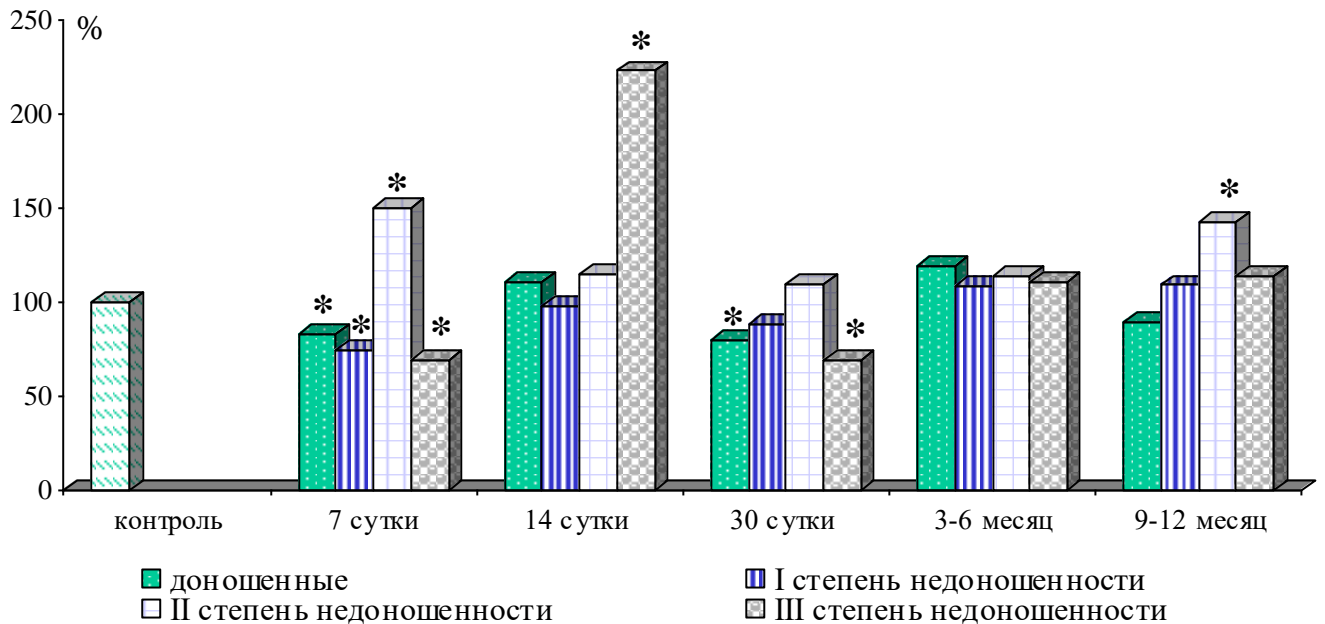


Рис. 8. Активность  $\alpha_2$ -макроглобулина плазмы крови доношенных и недоношенных детей с перинатальной энцефалопатией

\*- уровень статистической значимости по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Обращает внимание тот факт, что индекс КК/ $\alpha_2$ -МГ при гипоксии возрастает через 7 суток после рождения после рождения доношенных и недоношенных детей. В последующие периоды значение этого индекса во всех группах снижалось.

Существуют определенные трудности в оценке активности протеиназ и их ингибиторов в ликворе. Кининовая система ликвора отличается от плазмы крови тем, что в цереброспинальной жидкости содержатся мало активные кининазы, что способствует накоплению кининов в ограниченном участке мозга [Веремеенко К. Н., 1977; Посохов В. В., 1985; Шукевич Д. Л., 2003].

Активность КК и АПФ ликвора как у доношенных, так и у недоношенных с ПЭ была ниже, чем в периферической крови (рис. 9). Снижение активности протеиназ в ликворе новорожденных детей с ПЭ сопровождается повышением ингибиторной активности, зависящей от степени недоношенности новорожденного. Необходимо отметить, что в ликворе наблюдается одновременное повышение активности обоих ингибиторов. Низкие значения КК/ $\alpha_2$ -МГ характеризуют преобладание ингибиторного звена протеолиза.

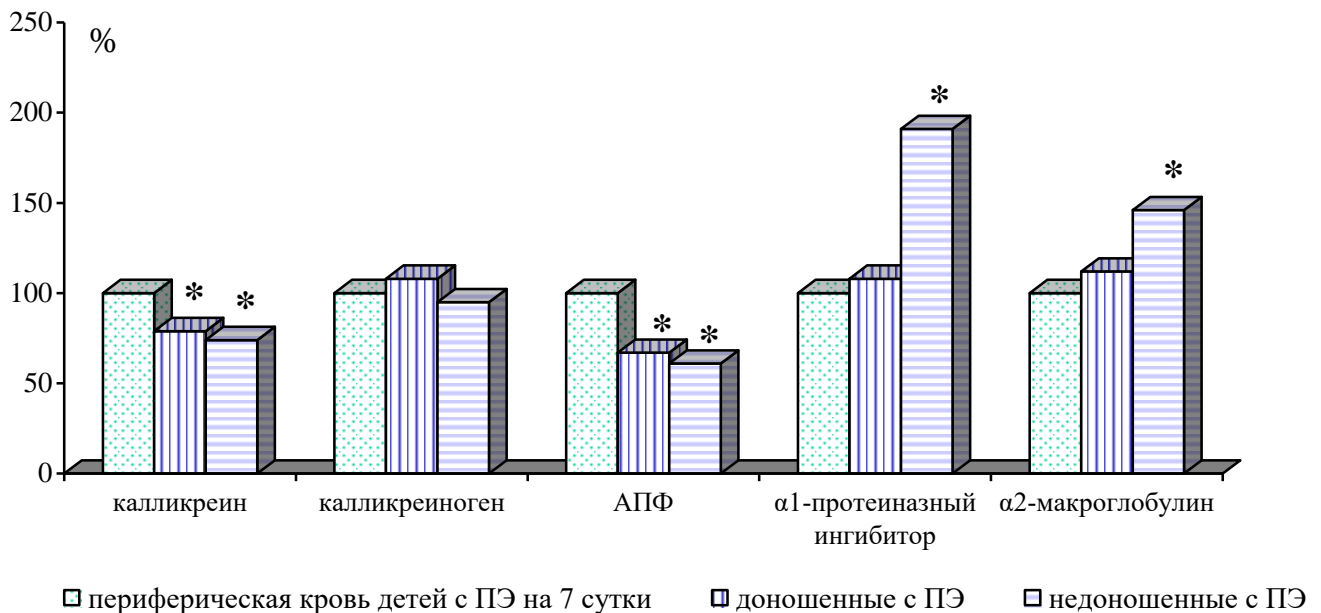


Рис. 9. Активность ферментов и ингибиторов протеолиза ликвора новорожденных детей с перинатальной энцефалопатией

\* - уровень статистической значимости по сравнению со здоровыми ( $p < 0,05$ )

Известно, что в условиях кислородной недостаточности тканевых структур активируются гликолитические процессы, приводящие к развитию внутриклеточного ацидоза и выходу специфических белков, к которым относится нейрон-специфическая енолаза (НСЕ) [Ганнушкина И. В., 2007; Карякина Г. М., 2007]. Этот фермент у плода обнаруживается в нервной и легочной ткани, у взрослых - преимущественно в нейроэндокринных структурах. Появление этого белка в спинномозговой жидкости и сыворотке крови оценивают как повреждений нейронов и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).

Содержание НСЕ в сыворотке крови, определяемое с помощью иммуноферментного анализа, повышается у доношенных и недоношенных детей с ПЭ через 7 суток после рождения в 2,9-5,7 раз по сравнению со здоровыми детьми и сохраняется до 3-х - месячного возраста. Следует отметить, что в этот же период увеличивается активность КК и АПФ. Уровень НСЕ у недоношенных был более высоким, чем у доношенных детей (табл. 2).

Таблица 2

Содержание нейрон-специфической енолазы (мкг/л) сыворотки крови детей с перинатальной энцефалопатией ( $M \pm m$ )

Группы новорожденных	Сутки после рождения		
	7	30	90
Практически здоровые (n=16)	0,51 ± 0,09	0,36 ± 0,11 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	—
Доношенные (n=6)	1,33 ± 0,50 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	0,91 ± 0,34 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	0,59 ± 0,06 p <sub>2</sub> >0,05
Недоношенные I степени (n=11)	2,90 ± 0,62 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	0,93 ± 0,16 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	0,47 ± 0,11 p <sub>2</sub> >0,05
Недоношенные II степени (n=15)	3,24 ± 0,45 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	1,87 ± 0,35 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	0,58 ± 0,13 p <sub>2</sub> >0,05
Недоношенные III степени (n=15)	2,99 ± 0,53 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	1,48 ± 0,48 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	0,63 ± 0,09 <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>

Примечание:

p<sub>1</sub> - уровень статистической значимости по сравнению с контролем на 7 сутки;  
p<sub>2</sub> - уровень статистической значимости по сравнению с контролем

Снижение уровня НСЕ в сыворотке крови происходит через 30 дней у доношенных детей в отличие от недоношенных детей. На основании этих данных можно сделать заключение, что определение НСЕ при перинатальной энцефалопатии является одним из важных показателей повреждения нейронов и нарушения ГЭБ. КК и АПФ, очевидно, отражают состояние сосудистой гемодинамики. Наличие корреляционной связи между НСЕ и АПФ ( $r=0,67$ ) позволяет предположить, что одной из причин повреждения нервной ткани является нарушение кровообращения.

Статистический анализ данных позволил установить корреляционные связи фетоплацентарной недостаточности (ФПН) с НСЕ, КК, ККГ,  $\alpha_1$ -ПИ. Кроме того, АПФ в большей степени, чем КК, связан с ФПН. На основе дисперсионного анализа и показателя Снедекора определена степень влияния ФПН и гестации на изучаемые показатели периферической крови (рис. 10).

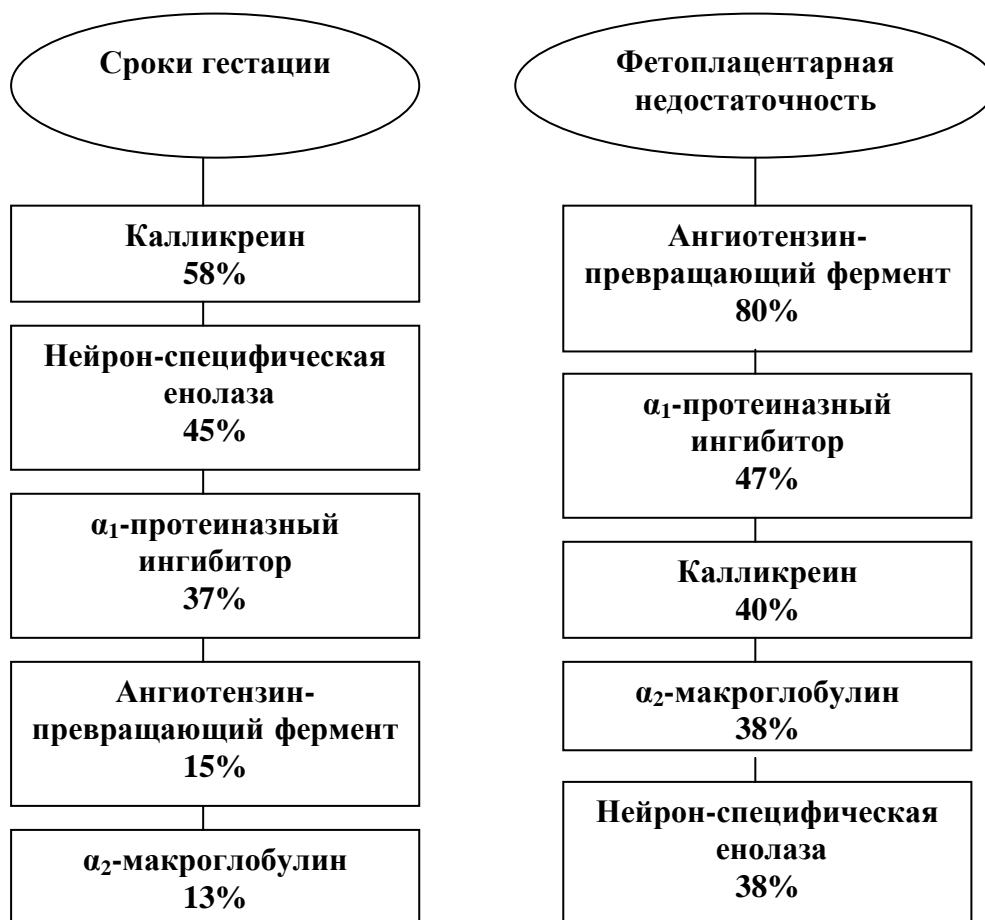


Рис 10. Влияние сроков гестации и фетоплацентарной недостаточности на показатели протеолиза (в % - показатель Снедекора)

Снижение сроков гестации и соответственно увеличение степени недоношенности прежде всего приводит к значительной активации КК (58%) и нейрон-специфической енолазы (45%). ФПН в большей степени влияет на АПФ (80%) и  $\alpha_1$ -ПИ (47%). Регрессионный анализ выявил функциональную связь между показателями протеолиза у практически здоровых новорожденных. Коэффициент детерминации при этом составил 0,54, при перинатальной энцефалопатии наблюдалось нарушение связи между компонентами протеолиза (коэффициент детерминации=0,32), что свидетельствует о наличии дисбаланса в системе протеолиза.

Получены высокие индексы чувствительности, специфичности и диагностической эффективности метода для определения АПФ,  $\alpha_1$ -ПИ и НСЕ, которые позволяют использовать эти показатели как прогностические критерии сосудистых осложнений и повреждения нервной ткани.

Таким образом, протеолитические ферменты и их ингибиторы принимают участие в регуляции гемодинамики для адекватной доставки кислорода в организм новорожденного ребенка. Активность кининогенеза возрастает при родах, обеспечивает вазодилатацию сосудов и способствует родовой деятельности. Дисбаланс в регуляции протеолиза, выявленный при перинатальной энцефалопатии возможно, приводит к нарушению механизмов адаптации новорожденного при переходе на легочной тип дыхания. Более выраженные изменения в регуляции протеолитических ферментов отмечаются у недоношенных детей. Преобладание дилатации кровеносных сосудов, связанное со значительной активацией кининогенеза, снижение активности АПФ и  $\alpha_1$ -ПИ в пуповинной крови, наряду с ФПН и недоношенностью, могут также являться факторами нарушения нормальных родов и последующего развития недостаточности нервной и дыхательной систем. Длительно сохраняющаяся высокая активность АПФ приводит к избыточному накоплению ангиотензина II, способного повреждать эндотелий сосудов. Недостаточная реакция ингибиторов на активацию протеиназ влияет на развитие сосудистых осложнений в отдаленный период жизни ребенка. Данные по протеиназно-ингибиторным

индексам подчеркивают существенную роль калликреина при родах и развитии перинатальной энцефалопатии. Высокий уровень НСЕ коррелирует с тяжестью перинатальных повреждений ЦНС, гестационным возрастом ребенка. Система протеолиза ликвора отличается низкой протеолитической активностью и высоким ингибиторным потенциалом по отношению к периферической крови.

Наличие связи между фетоплацентарной недостаточностью, степенью недоношенности ребенка, состоянием протеолиза крови и уровнем нейрон-специфической енолазы раскрывает их роль в патогенезе перинатальной энцефалопатии и прогнозировании сосудистых нарушений в период постнатальной адаптации ребенка. Полученные результаты имеют теоретическое и практическое значение для биохимии, патологической физиологии, педиатрии и неврологии.

### **Выводы**

1. Активация калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в пуповинной и периферической крови здоровых новорожденных обусловлена повышением активности калликреина, калликреиногена, ангиотензинпревращающего фермента,  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и снижением активности  $\alpha_2$ -макроглобулина при родах и на 14 сутки после рождения.
2. Перинатальная энцефалопатия новорожденных сопровождается более выраженной активацией кининогенеза в плазме крови и снижением активности ангиотензинпревращающего фермента и ингибиторов протеолиза в пуповинной крови. В ликворе значительно повышается активность ингибиторов, наиболее выраженная при III степени недоношенности.
3. Содержание нейрон-специфической енолазы, отражающей степень повреждения нервной ткани, увеличивается при перинатальной энцефалопатии и зависит от степени недоношенности ребенка.
4. Увеличение отношения КК/АПФ, КК/ $\alpha_1$ -ПИ и КК/ $\alpha_2$ -МГ при перинатальной энцефалопатии характеризует дисбаланс протеолитических систем и преобладание процессов кининогенеза.

5. Диагностическую значимость при перинатальной энцефалопатии имеют повышенная активность ангиотензинпревращающего фермента и низкая активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора в плазме крови новорожденных. Чувствительность и специфичность этих показателей (68-83%) позволяет прогнозировать развитие сосудистых осложнений у ребенка.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Протеолитические системы крови недоношенных новорожденных детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы / Т. Е. Гунбина, Е. И. Кондратьева, Т. Е. Тропова и др. // Вопросы современной педиатрии: Сб.материалов X Съезда педиатров России. – Москва. - 2005. – том 4. – приложение № 1. – С. 133.
2. Регуляция протеолитических систем крови новорожденных детей с гипоксическим поражением ЦНС / Т. Е. Гунбина, Ю. С. Никифорова, Д. С. Ожегова и др. // Вятский медицинский вестник: материалы IX итоговой научно-практической конференции. – Киров. - 2005. - № 1. – С. 68.
3. Калликреин-кининовая и ренин-ангиотензиновая системы у новорожденных детей с гипоксической энцефалопатией / Т. Е. Гунбина, Ю. С. Никифорова, В. В. Горев и др. // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы XI межвузовской конференции молодых ученых. – Санкт-Петербург. – 2005. – часть 1. – С. 11-12.
4. Регуляция вазоактивных ферментов плазмы крови новорожденных детей с гипоксической энцефалопатией / Т. Е. Гунбина, Д. С. Ожегова, Ю. С. Никифорова и др. // Науки о человеке: материалы VI конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск. - 2005. – С. 30-31.
5. Гунбина, Т. Е. Гемодинамические нарушения при гипоксической энцефалопатии новорожденных детей / Т. Е. Гунбина, Г. А. Суханова, Е. И. Кондратьева // Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция: материалы четвертой Российской конференции. – Москва. – 2005. – С. 33.
6. Роль систем протеолиза в развитии сосудистых осложнений при гипоксической энцефалопатии новорожденных детей / Т. Е. Гунбина, Е. И. Кондратьева, Г. А. Суханова и др. // Современные технологии в педиатрии и детской хирургии: материалы четвертого Российского конгресса. – Москва. – 2005. – С. 138-139.
7. Ожегова, Д. С. Процессы протеолиза и антиоксидантная система защиты крови у новорожденных с гипоксической энцефалопатией / Д. С. Ожегова, Т. Е. Гунбина, И. В. Салтыкова // Вестник РГМУ. Периодический медицинский журнал. – Москва. – 2006. – № 2. - С. 297-298.
8. Роль систем протеолиза в диагностике гипоксического поражения ЦНС новорожденных детей / Т. Е. Гунбина, В. В. Горев, Т. Н. Хлынина и др. // Сб.материалов V всероссийской университетской научно-практической конференции молодых ученых и студентов по медицине. – Тула. – 2006. – С. 78-79.

9. Гунбина, Т. Е. Биохимические показатели состояния гемодинамики при гипоксии у новорожденных / Т. Е. Гунбина, Л. Е. Макоклюй, Н. А. Павлова // Молодежь и наука: итоги и перспективы: материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Саратов. – 2006. – С. 68.
10. Варианты реагирования системы протеолиза крови новорожденных при гипоксически-ишемической энцефалопатии / Т. Е. Гунбина, Г. А. Суханова, Е. И. Кондратьева и др. // Вестник Томского государственного университета. – 2006. - № 1. – С. 39-41.
11. Гунбина, Т. Е. Роль протеолиза в механизмах нарушений гемодинамики при гипоксически-ишемической энцефалопатии у детей / Т. Е. Гунбина // Актуальные проблемы патофизиологии. – Санкт-Петербург. – 2007. – С. 39-41.
12. Гунбина, Т. Е. Особенности регуляции компонентов протеолиза у детей-близнецов с гипоксически-ишемической энцефалопатией / Т. Е. Гунбина, В. В. Горев // Актуальные проблемы патофизиологии. – Санкт-Петербург. – 2007. – С. 41-43.
13. Значение протеиназ и их ингибиторов в регуляции гемодинамики новорожденных / Т. Е. Гунбина, В. В. Горев, А. И. Рубанова, Е. А. Ковригина // Вестник РГМУ. Периодический медицинский журнал. – 2007. – № 2. – С. 293.
14. Гунбина, Т. Е. Ферменты и ингибиторы протеолиза пуповинной, периферической крови и ликвора новорожденных при гипоксии / Т. Е. Гунбина // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине», Казань, 25-26 апреля 2007 г. – С. 290-291.
15. Активность калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем крови новорожденных с гипоксически-ишемической энцефалопатией / Г. А. Суханова, Е. И. Кондратьева, Т. Е. Гунбина и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. - № 2. – С. 114-117.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**$\alpha_2$ -МГ** -  $\alpha_2$ -макроглобулин  
 **$\alpha_1$ -ПИ** -  $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор  
**АПФ** - ангиотензинпревращающий фермент  
**КК** - калликреин  
**ККС** – калликреин-кининовая система  
**НСЕ** – нейрон-специфическая енолаза  
**ПЭ** – перинатальная энцефалопатия  
**РАС** - ренин-ангиотензиновая система  
**ФПН** – фето-плацентарная недостаточность  
**ЦНС** - центральная нервная система