

На правах рукописи

Радивилко Артем Сергеевич

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ  
ЗНАЧИМОСТЬ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА В  
ФОРМИРОВАНИИ ПОЛИОРГАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ  
ТЯЖЕЛОЙ СОЧЕТАННОЙ ТРАВМЕ**

14.01.20 – анестезиология и реаниматология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Григорьев Евгений Валерьевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Шевченко Владимир Петрович**  
(Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна, главный научный сотрудник отдела анестезиологии и реаниматологии)

доктор медицинских наук **Мартыненко Виктор Яковлевич**  
(Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина, ответственный за нейрореанимацию отделения реанимации и интенсивной терапии)

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Томск)

Защита диссертации состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_\_\_\_ ч. на заседании диссертационного совета Д 208.062.03 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; тел/факс (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83); <http://ngmu.ru/dissertation/366>

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

М. Н. Чеканов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Сочетанная травма составляет 8 – 14 % от всех повреждений и является причиной более 60 % летальных исходов от травм (Соколов В. А., 2006). Полиорганная недостаточность (ПОН) встречается более чем у 80 % пострадавших с тяжелыми травмами и сопровождается высокой летальностью (30 – 85 %) (Глумчер Ф. С., 2002; Агаджанян В. В., 2008). Прогресс методов интенсивной терапии достоверно повлиял на исход ПОН, однако остается определенный пул пострадавших, у которых имеет место прогрессирование органных нарушений и которые являются предметом пристального изучения (Marshall J. C. et al, 1995; Moore F. A., 2009).

Главный путь снижения летальности – это предупреждение и устранение возможности развития основных компонентов ПОН. Существующие методы даже в своей совокупности не позволяют осуществлять раннюю диагностику и прогнозирование ПОН у пострадавших с ТСТ. Очевидно, что поиск предикторов ПОН является крайне востребованным (Flint, 2004; Rocker G., 2004). Выявление максимально ранних маркеров ПОН позволит своевременно начать комплексную терапию этого осложнения (Ioanas M. et al., 2004).

Формирование ПОН у пострадавших с ТСТ происходит на фоне шока в процессе реализации системного воспалительного ответа (СВО) (Lenz A., 2007). Важнейшим механизмом перехода от СВО к ПОН является апоптоз, который развивается в органах-мишенях (Keel M., 2005; Голубев А. М., 2006). Последние работы показывают обширную органонаправленную апоптозную активность при СВО/ПОН (Schneider E. M., 2011). Однако проблема программированной гибели клеток остается открытой, так как клинические исследования крайне малочисленны и противоречивы (Чурляев Ю. А., 2009; Musial K., 2011). Поэтому представляется актуальной конкретизация значения апоптоза в формировании посттравматической ПОН и определение прогностической информативности существующих систем (интегральные шкалы APACHE II, SOFA, ISS, критерии ПОН) в сочетании с уровнем сывороточных маркеров апоптоза.

**Цель исследования.** Повышение эффективности интенсивной терапии пострадавших с тяжелой сочетанной травмой путем разработки и внедрения алгоритма раннего прогноза тяжести и длительности полиорганной недостаточности.

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать частоту, виды, сроки возникновения и варианты развития полиорганной недостаточности у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой в первые – пятые сутки посттравматического периода до развития септических осложнений.

2. Изучить клинико-патогенетическую значимость сывороточных концентраций белков-регуляторов апоптоза при тяжелой сочетанной травме в формировании полиорганной недостаточности.

3. Провести сравнительную оценку прогностической информативности интегральных шкал (APACHE II, SOFA, ISS), критериев полиорганной недостаточности и содержания белков-регуляторов апоптоза при тяжелой сочетанной травме и обосновать целесообразность их включения в прогностический алгоритм.

4. Разработать и внедрить алгоритм раннего прогноза тяжести и длительности полиорганной недостаточности при тяжелой сочетанной травме.

**Научная новизна.** Установлено, что ранняя ПОН (до 48 часов после травмы) является обязательным и потенциально обратимым осложнением ТСТ. Определены два варианта течения посттравматического периода у пострадавших с ТСТ: благоприятный (с длительностью ПОН не более двух суток, низким процентом инфекционных осложнений и летальных исходов) и неблагоприятный (с длительностью ПОН от трех суток и более, высоким процентом септических осложнений и летальных исходов). Доказано, что ключевым фактором прогрессирования ПОН после 48 часов посттравматического периода является дыхательная недостаточность в форме острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Впервые у всех пострадавших с ТСТ определены высокие уровни маркеров апоптоза, ответственных как за внешний, так и за внутренний путь активации. Выявлены корреляционные зависимости изменений концентраций сывороточных маркеров апоптоза и длительности посттравматической ПОН. Установлено, что у пострадавших с благоприятным течением посттравматического периода в динамике повышается уровень FasL и p53 и снижается уровень Fas и Bcl-2. Противоположная динамика наблюдается в группе с неблагоприятным течением посттравматического периода. Впервые методом множественного регрессионного анализа определены наиболее информативные предикторы

длительности и тяжести посттравматической ПОН из всего массива показателей (интегральные шкалы, критерии ПОН, уровень сывороточных маркеров апоптоза).

**Теоретическая и практическая значимость.** Разработан алгоритм, позволяющий на ранних сроках прогнозировать благоприятный и неблагоприятный варианты течения посттравматического периода, связанные с длительностью ПОН, что предоставит возможность начать упреждающую терапию осложнений ТСТ и приведет к снижению летальности. Установленные лабораторные иммунохимические изменения (связь уровня сывороточных маркеров апоптоза с тяжестью и длительностью ПОН) углубляют научные представления о механизмах развития ПОН при ТСТ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Полиорганная недостаточность является закономерным явлением после тяжелой сочетанной травмы и наблюдается у всех пострадавших. Полиорганная недостаточность является признаком неблагоприятного прогноза, если не проявляет тенденции к регрессии через 48 часов с момента травмы.

2. Развитие посттравматической полиорганной недостаточности связано с органным повреждением по типу программированной клеточной гибели.

3. Наиболее значимыми предикторами поздней посттравматической полиорганной недостаточности являются баллы по шкале ISS, наличие дыхательной недостаточности (ДН) на вторые сутки после травмы в виде острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и динамика содержания сывороточных маркеров апоптоза.

**Апробация.** Результаты работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции «Современные методы диагностики и лечения в реаниматологии» (Москва, 2009), на конференции «Технологии жизнеобеспечения при критических состояниях» (Москва, 2010), на VI съезде ассоциации анестезиологов-реаниматологов Северо-Запада России (Санкт-Петербург, 2011), на Всероссийской конференции с международным участием «Беломорский симпозиум IV» (Архангельск, 2011), на областной научно-практической конференции анестезиологов-реаниматологов (Кемерово, 2013).

Обсуждение диссертационной работы проводилось на совместном заседании кафедры анестезиологии и реаниматологии Кемеровской

государственной медицинской академии и лаборатории критических состояний Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний 20.09.2014.

**Внедрение.** Результаты исследования внедрены в клиническую практику отделений реанимации Городской клинической больницы № 3 (г. Кемерово) и Городской клинической больницы № 2 (г. Кемерово). Основные результаты и положения диссертации включены в учебный процесс кафедры анестезиологии и реаниматологии Кемеровской государственной медицинской академии и кафедры анестезиологии и реаниматологии Сибирского государственного медицинского университета.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 19 таблиц и 8 рисунков. Указатель литературы представлен 216 источниками, из которых 147 – зарубежных авторов.

**Личный вклад автора.** Весь материал, представленный в диссертации, собран, обработан, проанализирован и интерпретирован лично автором.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Настоящее исследование основано на анализе клинических наблюдений, результатов лабораторных и инструментальных методов исследований 103 пострадавших, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии МБУЗ ГКБ № 2 и МБУЗ ГКБ № 3 г. Кемерово с 2008 по 2010 год. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Кемеровской государственной медицинской академии.

Критерии включения в исследование: пострадавшие с ТСТ. Критерии исключения: возраст менее 16 и более 59 лет; превалирование тяжелой ЧМТ (менее 7 баллов по шкале ком Глазго); сопутствующая декомпенсированная хроническая соматическая патология; умершие в первые двое суток посттравматического периода.

Определение тяжести повреждения проводилось по шкале ISS

(Boyd C. R., 1987); оценка тяжести состояния – на основе системы APACHE-II (Knaus et al., 1985); наличие органной дисфункции, ее тяжесть и эволюцию ПОН оценивали по критериям A. Baue (2000) и шкале SOFA (Vincent et al., 1996). У всех пострадавших проводилось определение биохимических показателей, исследование газового состава крови, кислотно-щелочного состояния, клинический анализ крови, мочи. По показаниям проводились ультразвуковое и рентгенологическое исследование.

Лабораторными маркерами апоптоза являлись плазменные уровни белков-регуляторов апоптоза (Fas, FasL, Bcl-2, p53). Венозная кровь забиралась при поступлении, далее на вторые, третьи и пятые сутки. Кровь центрифугировали и сохраняли сыворотку до проведения исследования при температуре минус 25 °С. Определение проводилось методом иммуноферментного анализа на планшетном фотометре Multiskan-EX (Labsystems, Финляндия) наборами фирмы Bender Medsystems (Австрия) в соответствии с инструкциями. Контрольную группу составили 11 здоровых доноров в возрасте от 23 до 47 лет (средний возраст 36 лет). Из них 9 мужчин и 2 женщины (81 % и 19 % соответственно).

Лечебные мероприятия при поступлении пострадавших в стационар заключались в максимально полной и быстрой нормализации объема циркулирующей крови, гемодинамики, транспорта кислорода, показателей газообменной и вентиляционной функции легких, адекватном обезболивании, профилактике гнойно-септических осложнений, ТЭЛА. Всем пострадавшим в зависимости от характера и локализации повреждений был выполнен необходимый объем оперативных вмешательств.

Ретроспективно пострадавшие разделены на две группы в зависимости от длительности ПОН. В первую вошли 45 человек с длительностью ПОН до двух суток, вторую группу составили 58 пациентов с длительностью ПОН трое и более суток. По тяжести состояния, объему оперативных вмешательств, возрасту, полу пострадавшие в исследуемых группах были сопоставимы.

Характеристика пострадавших с ТСТ в исследуемых группах представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика исследуемых групп (Me, процентиля 25; 75)

Показатели	Первая группа	Вторая группа
Количество пациентов, n (%)	45 (43,6)	58 (56,4)
Мужчины, n (%)	32 (71,1)	44 (75,8)
Средний возраст (годы)	37 (27; 45)	40,5 (27; 54)
Степень тяжести травмы ISS (баллы)	25 (20; 33)	36 (27; 43)
Степень тяжести состояния APACHE II	9 (5; 12)	10,5 (7; 17)
SOFA (баллы)	3 (1; 4)	4 (3; 6)
Травматичные операции, n (%)	23 (51,1)	27 (46,5)
Длительность ПОН, сут.	1 (1; 2)	5 (3; 8)
Гнойно-септические осложнения, n (%)	6 (13,33)	29 (50)
Летальные исходы, n (%)	0	27 (46,5)

Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью статистических пакетов SAS 9.3, STATISTICA-10 и SPSS-20. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Deskриптивные статистики для нормально распределенных данных в тексте представлены как  $M (m)$ , где  $M$  – среднее, а  $m$  – стандартное отклонение. Для данных, распределение которых отличается от нормального – медиана и интерквартильная широта (значения 25 и 75 перцентилей). Проверка нормальности распределения проводилась с использованием критериев Колмогорова-Смирнова. Для сравнения центральных параметров использовались параметрические и непараметрические методы: дисперсионный анализ, в т.ч. с критерием Краскела-Уоллиса и критерий Ван дер Вардена. Исследование взаимосвязи между парами качественных признаков проводилось с использованием анализа парных таблиц сопряженности. Помимо оценок критерия Пирсона Хи-квадрат и достигнутого уровня статистической значимости, вычислялась оценки интенсивности связи ( $V$ -коэффициент Крамера). Для оценки корреляционных парных зависимостей между показателями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для анализа взаимосвязи между признаками использовалась модель логистической регрессии с пошаговым алгоритмом включения и исключения предикторов. Для сравнения эффективности критериев ранней диагностики ПОН был использован метод подсчета площади под кривой (AUROC).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Структура ПОН при ТСТ.** С первых суток признаки ПОН наблюдали у всех пострадавших. В обеих группах при поступлении преобладали явления травматического шока: ССН и метаболические нарушения. Частота ССН снижалась в обеих группах ко вторым суткам (4 % в первой группе и 31 % во второй группе). В первой группе ЦН и ДН регрессировала, во второй отмечено увеличение числа ДН, в два раза выросло число случаев ОПН, ОПечН и коагулопатии. Частота ЦН во второй группе оставалась стабильно высокой (41 %). На третьи сутки после травмы в первой группе встречались единичные случаи ДН и ОПН, у 31 % – коагулопатия. Во второй группе 4 пострадавших умерли от прогрессирующей ПОН (преобладала недостаточность 6 систем). У остальных сохранялись признаки ПОН: у 20 % ССН и метаболические нарушения, стабильно высоким оставалось число случаев ЦН и ДН (89 % и 63 %), прогрессировала ОПН (48 %). На пятые сутки во второй группе осталось 79,3 % больных. У всех умерших преобладала пяти и шести органной недостаточность, обязательным компонентом которой являлась ДН, ЦН с присоединением ОПН и ОПечН, метаболическими нарушениями.

**Анализ сопряженности компонентов ПОН** показал, что ДН первых суток сильно линейно связана с наличием ДН вторых и последующих суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,25 – 0,42). В меньшей степени ДН первых суток связана с ОПечН вторых и третьих суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,24 – 0,26).

На вторые сутки сохраняющаяся ССН показывает многочисленные связи со многими видами органной недостаточности последующих суток. Наиболее сильная зависимость отмечается с ССН третьих суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,55), ЦН вторых суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,33) и ОПН третьих суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,33). Сохраняющаяся или прогрессирующая ДН на вторые сутки связана с ДН третьих – пятых суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,56 – 0,79) и ЦН вторых и последующих суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,34 – 0,55). Обращает на себя внимание наличие связей ДН вторых суток практически со всеми видами органной недостаточности третьих и пятых суток, что подтверждает ведущую роль ДН в формировании ПОН.

Церебральная недостаточность вторых суток интенсивно связана со всеми видами органной недостаточности третьих суток ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,2 – 0,69), за исключением коагулопатии. Церебральная недостаточность является

как следствием, так и причиной прогрессирующей ПОН. Сохраняющаяся на вторые сутки ЦН в большей степени связана с имеющейся, но не превалирующей ЧМТ ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,33). Описанная выше сильная связь ДН с ЦН вторых и последующих суток свидетельствует о наличии как центральных нарушений дыхания, так и гипоксической энцефалопатии.

В случае сохранения и прогрессирования признаков ПОН более двух суток наблюдается картина множественных горизонтальных (одновременные нарушения) и вертикальных (последовательные нарушения) связей практически всех видов органной недостаточности (рисунок 1). В первую очередь это касается ДН и ЦН на третьи сутки ( $p < 0,05$ , V-Крамера 0,4 – 0,68).

На пятые сутки интенсивность связи между видами органной недостаточности достигает максимальных значений, что свидетельствует о развернутой картине ПОН.

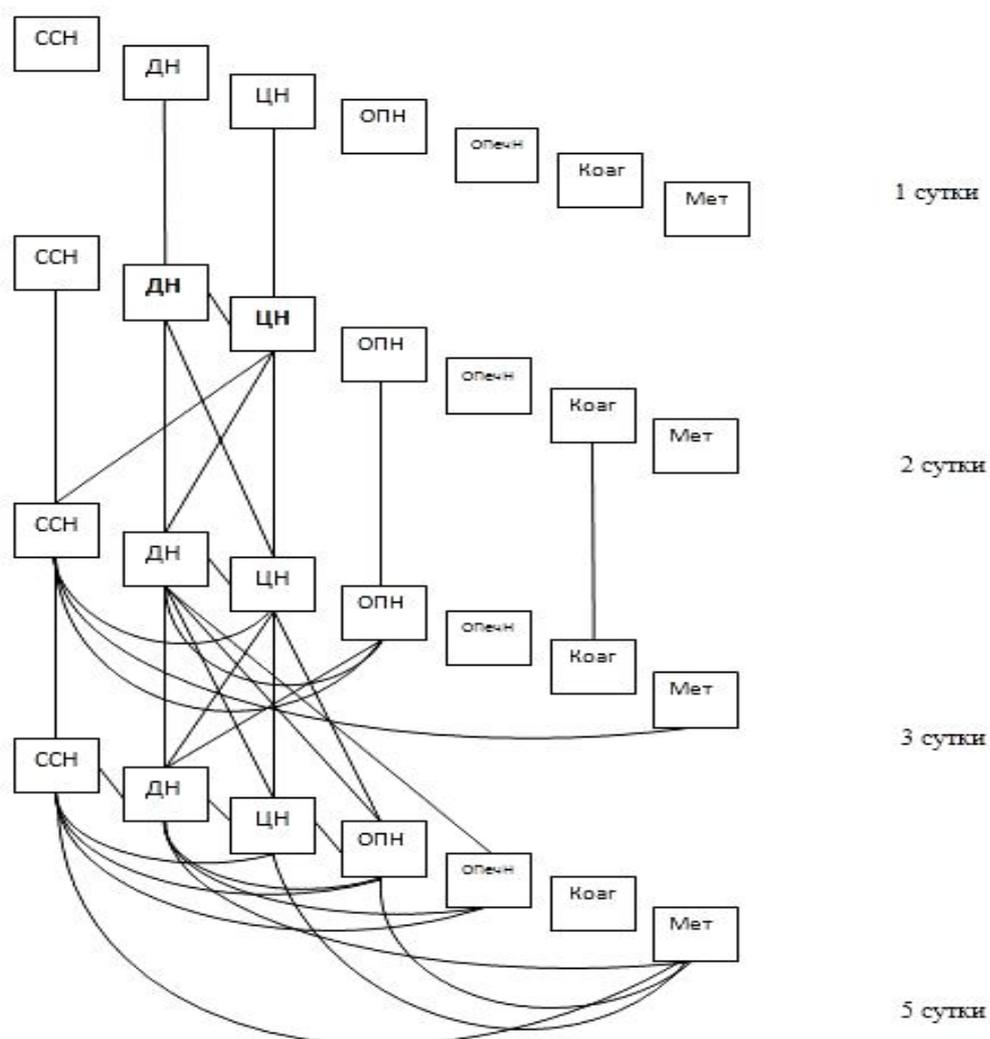


Рисунок 1 – Сильные межсистемные связи в разные сроки после травмы

**Анализ сопряжённости видов органной недостаточности и длительности ПОН** на разных сроках посттравматического периода представлен в таблице 2. В таблицу вошли пары сопряженных признаков с достигнутым уровнем статистической значимости  $p < 0,05$ , для которых значение V-критерия Крамера не менее 0,4.

Таблица 2 – Результаты анализа сопряжённости признака «Длительность ПОН» с другими качественными показателями

Название второго признака	Уровень значимости «р»	V-критерий Крамера
ДН вторые сутки	<0,001	0,68
ЦН вторые сутки	<0,001	0,57
ДН третьи сутки	<0,001	0,82
ЦН третьи сутки	<0,001	0,65
ОНП третьи сутки	<0,001	0,47
ДН пятые сутки	<0,001	0,68
ЦН пятые сутки	<0,001	0,53
ОПН пятые сутки	<0,001	0,42
Мет пятые сутки	<0,001	0,4

Анализ показал, что длительность ПОН связана с ДН и ЦН первых и вторых суток. Причем для вторых суток связь сильнее более чем в два раза ( $p < 0,001$ ; V-Крамера 0,57-0,68). Это подтверждает ключевое значение ДН и ЦН именно вторых суток для прогрессирования ПОН. Показатели третьих и пятых суток статистически значимо и сильно связаны с длительностью ПОН, но являются констатацией факта трансформации ранней ПОН в позднюю.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что большое количество сильных связей между видами органной недостаточности (в первую очередь ДН и ЦН) начинает формироваться после 24–48 часов после травмы. До этого срока имеет место потенциально обратимая полиорганная дисфункция (ранняя ПОН). На третьи и последующие сутки отмечается появление сильных связей практически между всеми видами органной недостаточности, что свидетельствует о взаимном отягощении и трансформации ранней ПОН в позднюю. Ключевыми факторами прогрессирования ПОН и терапевтическими мишенями являются ДН и ЦН, развивающиеся до 48 часов после травмы.

**Осложнения и исходы.** В исследовании было выявлено 35 инфекционных осложнений (33,9 %). В 33 случаях источником сепсиса

являлись верхние и нижние дыхательные пути, в 4 случаях перитонит (2 несостоятельности кишечных швов, 2 панкреонекроза) и в 3 – инфекции мягких тканей. В зависимости от длительности ПОН септические осложнения распределялись по группам следующим образом (таблица 3).

Таблица 3 – Септические осложнения у пострадавших с ТСТ

Осложнения	Первая группа (n = 45)		Вторая группа (n = 58)	
	n	%	n	%
Гнойно-септические осложнения	6	13,33	29	50
Легкие	6	100	27	96,42
Мягкие ткани	—	—	3	10,71
Органы брюшной полости	—	—	4	14,3
Сроки возникновения, сутки	8,33 ± 4,84 (5 – 18)		7,29 ± 4,44 (5 – 25)	

Наиболее часто среди гнойно-септических осложнений встречались пневмонии (94 %). Инфекционные осложнения другой локализации во второй группе (инфекции мягких тканей, перитониты) только в одном случае не сочетались с пневмонией. Необходимо отметить, что пневмонии в 82 % развивались у пострадавших с тяжелой травмой грудной клетки, в большинстве случаев сопровождающейся ушибом легких и ИВЛ более 48 часов. Раневая инфекция всегда возникала в местах обширного повреждения мягких тканей, а перитониты – при закрытой травме живота.

Летальность от ТСТ часов составила 26,2 % (27 умерших (46,5 %) во второй группе). Наибольшее число смертей пришлось на период от 3 до 5 суток (44,4 %). В эти сроки инфекционных осложнений не было. В период от 6 до 10 суток умерло 7 пострадавших (25,9 % летальных исходов). Из них инфекционные осложнения зарегистрированы у 3, остальные умерли от прогрессирующей ПОН. После 11 суток (29,7 %) во всех случаях летальных исходов были выявлены инфекционные осложнения. У всех умерших в период от 3 до 5 суток сохранялась ПОН, которая проявлялась недостаточностью пяти-шести органов у 75 %, недостаточностью двух–трех органов у 25 %. Ведущим было сочетание ДН и ЦН (100 %).

Анализ особенностей течения посттравматического периода позволил определить 2 варианта: благоприятный (с длительностью ПОН до двух суток (ранняя ПОН), обратимым характером органной дисфункции, низким

процентом инфекционных осложнений (13,3 %) и без летальных исходов) и неблагоприятный (с длительностью ПОН трое и более суток (поздняя ПОН), высоким процентом септических осложнений (50 %) и летальных исходов (46,5 %).

**Оценка содержания сывороточных маркеров апоптоза у пострадавших с ТСТ.** Если патогенез первичной посттравматической ПОН и вторичной септической ПОН хорошо изучены, то механизмы формирования вторичной ПОН, в основе которой лежит неинфекционный СВО и апоптоз, изучены недостаточно. Поэтому следующим этапом нашей работы стала оценка содержания сывороточных маркеров апоптоза у пострадавших с ТСТ. Было установлено статистически значимое повышение в крови уровней Fas, FasL, Vcl-2, p53 по сравнению с контрольными значениями (таблица 4).

Таблица 4 – Динамика содержания сывороточных маркеров апоптоза

Показатель	Первые сутки	Вторые сутки	Третьи сутки	Пятые сутки
	Первая группа, n = 45			
Fas пг/мл	297,35 (75,3)*#	247,33 (63,12)*#	204,14 (76,57)*#	146,9 (46,37)*#
FasL пг/мл	162,3 (55,6)*#	112,69 (30,78)*#	159,5 (39,18) *#	109,73 (23,28)*#
Vcl-2 нг/мл	26,98 (6,95)*#	24,06 (7,2)*	27,07 (9,22)*#	36,07 (9,88)*#
p53 U/ml	10,34 (5,2)*	4,99 (2,89)*#	3,78 (4,46)*#	3,3 (1,74)*#
Вторая группа, n = 58				
Fas пг/мл	247,31 (66,15)*#	161,84 (87,91)*#	151,45 (37,19)*#	235,12 (85,68)*#
FasL пг/мл	140,07 (49,08)*#	154,55 (62,07)*#	180,86 (35,55)*#	289,79 (52,5)*#
Vcl-2 нг/мл	38,37 (9)*#	23,1 (5,58)*	23,79 (7,53)*#	12,6 (6,93)*#
p53 U/ml	9,45 (5,37)*	7,08 (4,48)*#	8,47 (5,3)*#	10,33 (10,49)*#
Примечание. * результат статистически значимо отличается от контрольных значений ( $p < 0,05$ ); # статистически значимая межгрупповая разница ( $p < 0,05$ ).				

**FasL/Fas.** Установлено, что у пострадавших первой и второй группы концентрация белков системы FasL/Fas в первые сутки была выше контрольных значений (297,35 и 247,31 пг/мл;  $p < 0,05$ ). На вторые сутки содержание Fas снижается в обеих группах (247,33 и 161,84 пг/мл). В дальнейшем содержание Fas в первой группе имеет тенденцию к снижению, достигая минимума к пятым суткам, но оставаясь выше контрольных значений (146,9 пг/мл;  $p < 0,05$ ). Во второй группе содержание Fas повышалось начиная с третьих суток (151,45 пг/мл), к пятым достигая исходного уровня (235,12 пг/мл).

Содержание FasL в двух группах изменялось разнонаправлено. В первой группе отмечено снижение к пятым суткам (109,73 пг/мл) после транзиторного подъема на третьи сутки (159,5 пг/мл). Во второй группе устойчивое повышение содержания FasL с первых суток до двукратного увеличения к пятым (289,79 пг/мл). На всех периодах наблюдения уровень FasL/Fas оставался статистически значимо выше контрольных значений ( $p < 0,05$ ). Таким образом, у пострадавших первой и второй группы отмечается разнонаправленное изменение концентраций белков системы FasL/Fas.

Мы предполагаем, что в ответ на повышение FasL происходит выброс растворимой формы Fas (sFas) как защитный механизм от возможных аутоиммунных повреждений. В эксперименте было показано, что sFas проявляет цитотоксичность в культуре лимфоцитов, в то время как FasL частично блокирует этот эффект (Telegina E., 2011). При повышенной экспрессии FasL и недостатке sFas обширный апоптоз в органах и тканях приводит к развитию ПОН, а при избытке sFas массовая гибель лимфоцитов может вызывать иммуносупрессию.

**Vcl-2 и p53.** В зависимости от длительности посттравматической ПОН в сыворотке пострадавших с первых суток отмечена статистически значимая разница в содержании белка Vcl-2 по сравнению с контрольными значениями ( $p < 0,05$ ). Если в динамике во второй группе этот показатель снижался в два раза от исходного ко вторым суткам (23,1 нг/мл), то в первой группе такого значительного снижения не наблюдалось. На третьи сутки содержание Vcl-2 не претерпевало значительных изменений в обеих группах, а к пятым суткам отмечена разнонаправленная динамика – повышение в первой группе (36,07 нг/мл, в 1,4 раза выше исходного значения) и снижение во второй (12,6 нг/мл, в 3 раза ниже исходного значения).

Содержание проапоптотического белка p53 в обеих группах в первые сутки не отличалось, но было в пять раз выше контрольных значений (10,34 и 9,45 U/ml;  $p < 0,05$ ). На протяжении всего периода наблюдений в первой группе отмечалось постоянное снижение содержания белка, но не достигающее показателей контроля к пятым суткам (3,3 U/ml). Во второй группе после снижения на вторые сутки, с третьих по пятые сутки происходило повышение уровня p53 до исходных значений (10,33 U/ml). То есть также имеет место разнонаправленное изменение содержания белков Vcl-2 и p53 в двух группах:

повышение в динамике содержания Bcl-2 и снижение p53 в первой группе и противоположные изменения во второй группе.

Основной функцией Bcl-2 является сохранение целостности митохондрий путем ингибирования высвобождения проапоптотических факторов (Youle R.J., 2008). Высокий уровень внутриклеточного белка Bcl-2 во второй группе в первые сутки нельзя рассматривать только как следствие цитолиза, т. к. уровни другого внутриклеточного белка-регулятора p53 статистически значимо не отличаются. Во второй группе повышение уровня Bcl-2 в первые сутки может являться показателем выраженности антиапоптотической реакции по принципу отрицательной обратной связи. Однако большим значением для исхода обладает повышение уровня Bcl-2 в группе с регрессом признаков ПОН и снижение в группе с неблагоприятным исходом, что подтверждает антиапоптотический характер этого белка. Белок p53 является транскрипционным фактором, запускающим внутренний путь апоптоза (Eberle J., 2008). Возможно, увеличение уровня p53, индуцированное гипоксией, приводит к повышению концентрации антиапоптотического белка Bcl-2.

Это клиническое исследование не ставило целью идентифицировать источники сывороточных маркеров апоптоза. Механизмы их секреции можно только предполагать, также как и их участие в аутокринных и паракринных взаимодействиях. Установлено, что в зависимости от длительности ПОН концентрации маркеров апоптоза претерпевают однотипные, однонаправленные изменения, что позволяет предположить возможность их использования в качестве предикторов длительности и тяжести ПОН.

**Сравнительная оценка показателей посттравматического периода у пострадавших первой и второй групп.** На следующем этапе было проведено сравнение групповых средних факторов, описывающих исходное состояние пострадавших и динамику уровней сывороточных маркеров апоптоза для выявления факторов, пригодных для включения в алгоритм ранней диагностики и прогнозирования длительности ПОН. Анализ показал, что обе подгруппы различны по центральным мерам шкал ISS и SOFA ( $p < 0,05$ ), что является закономерным, т. к. эти показатели отражают тяжесть травмы и первичной органной недостаточности, связанной непосредственно с травмой.

Сравнение межгрупповых средних, описывающих уровень маркеров

апоптоза, показало, что в первые сутки после травмы группы статистически значимо отличались по уровню Fas ( $p = 0,0015$ ), FasL ( $p = 0,0214$ ), Bcl-2 ( $p < 0,0001$ ). На вторые сутки уровень Fas в обеих группах снижается (в большей степени во второй группе), уровень FasL претерпевает разнонаправленные изменения (снижение в первой и повышение во второй группе). Эти изменения определяют сохраняющуюся статистически значимую межгрупповую разницу в плазменной концентрации растворимых маркеров. Уровень белка p53, исходно одинаковый в двух группах, на вторые сутки различается ( $p = 0,0011$ ). Третьи и пятые сутки характеризуются статистически значимыми различиями между уровнем всех маркеров апоптоза как растворимых форм, так и внутриклеточных.

Таким образом, выявленные статистически значимые различия в группах в значении интегральных шкал (ISS, SOFA) и уровне маркеров апоптоза позволяют предположить использование их в качестве предикторов поздней ПОН.

**Корреляционные зависимости показателей посттравматического периода с длительностью ПОН.** Для этого был проведен расчет ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ). Анализ полученных данных подтвердил наличие положительной корреляционной связи умеренной силы между длительностью посттравматической ПОН и количеством баллов по шкале ISS ( $\rho = 0,42$ ;  $p < 0,0001$ ) и SOFA ( $\rho = 0,41$ ;  $p < 0,0001$ ). Статистически значимая корреляционная связь наблюдалась между длительностью ПОН и уровнем Fas ( $\rho = -0,25$ ;  $p = 0,0083$ ) и FasL ( $\rho = 0,42$ ;  $p < 0,0001$ ) в первые сутки. Если для растворимой фракции рецептора эта связь слабая отрицательная, то для растворимой формы его лиганда она заметная положительная.

Из показателей вторых суток самой сильной является корреляционная связь с уровнем Fas ( $\rho = -0,42$ ;  $p < 0,0001$ ), в меньшей степени с концентрацией FasL ( $\rho = 0,36$ ;  $p = 0,0002$ ) p53 ( $\rho = 0,25$ ;  $p = 0,0092$ ). На третьи и пятые сутки отмечены множественные корреляционные связи между длительностью ПОН и уровнем всех маркеров апоптоза от умеренной до высокой, что является дополнительным подтверждением роли апоптоза в патогенезе ПОН.

**Логистическая регрессия в анализе связи показателей посттравматического периода и ранней ПОН.** Наличие статистически значимых связей между длительностью ПОН и другими качественными и

количественными признаками обосновало формирование спектра потенциальных предикторов для уравнений логистической регрессии. Пошаговый порядок включения отобранных предикторов с указанием процента верного предсказания на каждом шаге также отражен в таблице 5, по которой можно проследить динамику предсказательной ценности предикторов.

Таблица 5 – Вероятность отнесения пострадавших к первой группе

Шаг	Предиктор	Статистика Вальда Хи-квадрат	Коэффициент регрессии	Процент верного предсказания	Достигнутый уровень значимости
1	ДН вторые сутки	6,04	-1,59	69,0	0,0139
2	Fas вторые сутки	7,53	1,77	94,3	0,0061
3	Vcl-2 первые сутки	6,0	-1,59	96,2	0,0142
4	p53 вторые сутки	5,84	-1,62	97,0	0,0157
5	ISS	5,59	-2,91	98,3	0,018
6	FasL, вторые сутки	5,41	-2,68	99,5	0,02
Примечание. Somers'D = 0,989; Hosmer and Lemeshow Goodness-of-Fit Test Statistic = 0,19 with 7 DF (p = 1,0); Residual Chi-Square = 24,23 with 21 DF (p = 0,2817).					

Из всех факторов первых и вторых суток в уравнение вошло 6 предикторов: наличие ДН на вторые сутки ( $p = 0,0139$ ), концентрация Fas на вторые сутки ( $p = 0,0061$ ), содержание Vcl-2 в первые сутки ( $p = 0,0142$ ), содержание p53 на вторые сутки ( $p = 0,0157$ ), баллы по шкале ISS ( $p = 0,018$ ) и уровень FasL на вторые сутки ( $p = 0,02$ ). Процент верного предсказания на основании показателей первых и вторых суток составил 99,5 %. При оценке модулей стандартизованного коэффициента регрессии выявляется доминирующее влияние количества баллов по шкале ISS (2,91) и лабораторного признака – уровня FasL на вторые сутки (2,68). Полученные модели отличного качества (AUC более 0,9) только при условии одновременного использования всех уровней диагностики: от интегральных шкал оценки тяжести состояния при поступлении, динамической оценки ПОН (критерии А. Вае, 2000) и определения плазменных уровней маркеров апоптоза методом ИФА. Чувствительность и специфичность теста 95 % и 89 % соответственно (рисунок 2).

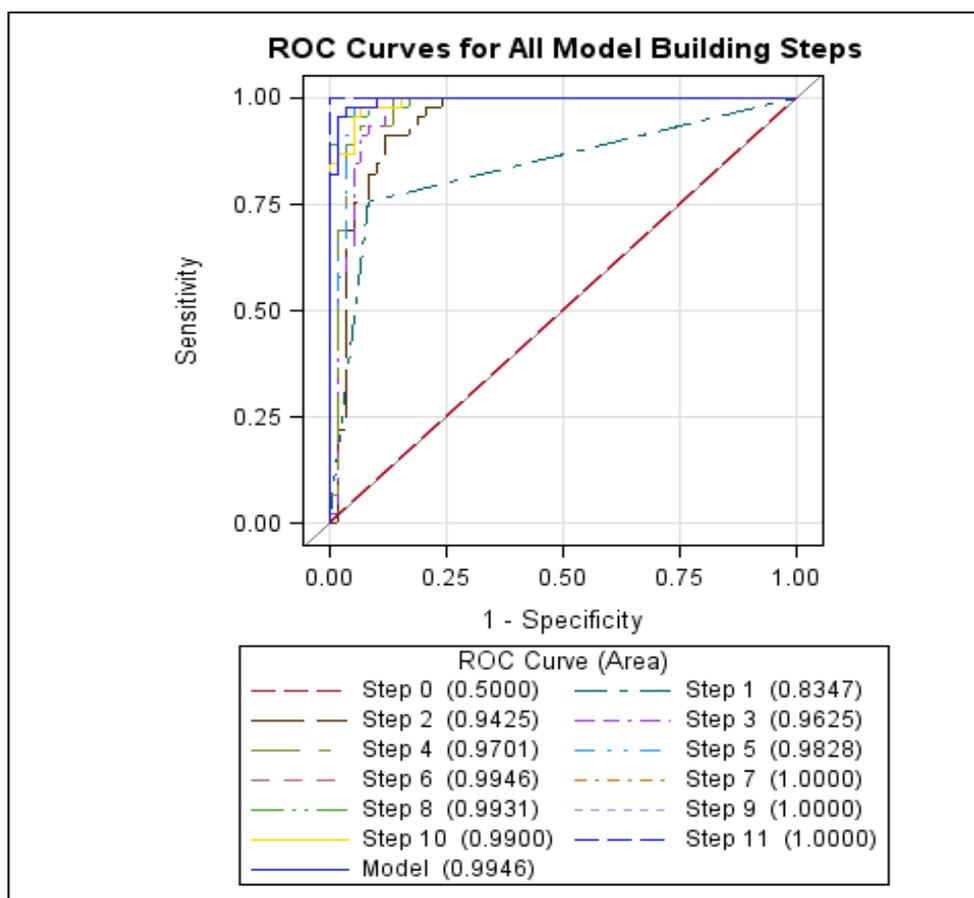


Рисунок 2 – ROC-кривая пошагового отбора предикторов: вероятность отношения к первой группе на основании факторов первых и вторых суток

**Алгоритм прогнозирования благоприятного и неблагоприятного вариантов течения посттравматического периода.** Для создания алгоритма прогнозирования варианта течения посттравматического периода, связанного с длительностью ПОН, были выбраны наиболее значимые (с наивысшим вкладом в процент верного прогнозирования) предикторные переменные различного уровня диагностики (от клинического до иммунохимического): баллы по шкале ISS и сывороточный уровень белка Vcl-2 для первых суток и наличие ДН и сывороточные уровни белков Fas и p53 для вторых суток. В качестве критериев для отбора были приняты средние значения для количественных признаков, категории «Да/Нет» – для качественных (рисунок 3).

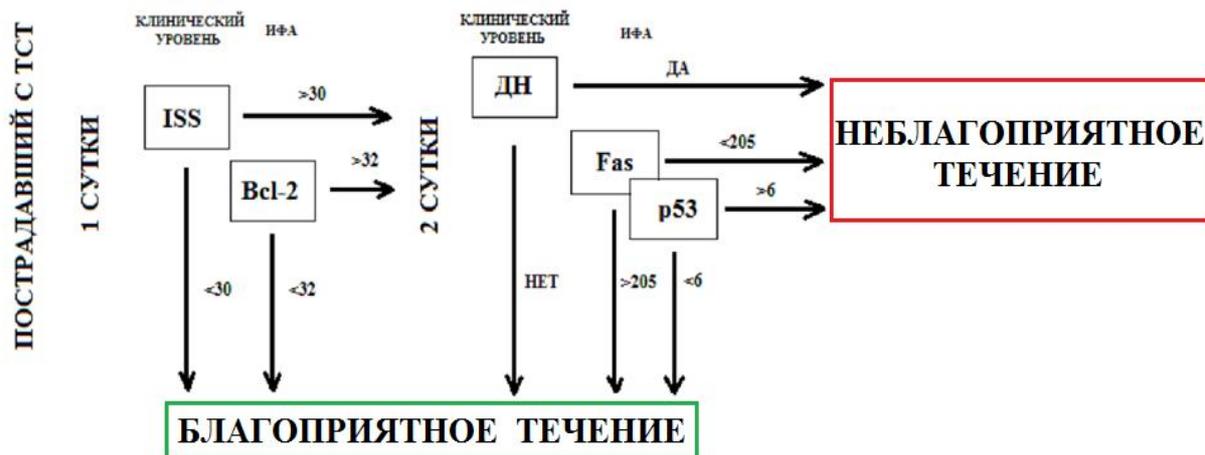


Рисунок 3 – Алгоритм прогнозирования благоприятного и неблагоприятного вариантов течения посттравматического периода

## ВЫВОДЫ

1. У всех пострадавших с первых суток после тяжелой сочетанной травмы определяются признаки полиорганной недостаточности. Ранняя полиорганная недостаточность (до 48 часов) является обязательным, потенциально обратимым следствием тяжелой сочетанной травмы. Ключевым фактором поздней полиорганной недостаточности (более 48 часов после травмы) является дыхательная недостаточность в форме острого респираторного дистресс-синдрома. В зависимости от длительности полиорганной недостаточности выделяются два варианта течения посттравматического периода: благоприятный (полиорганная недостаточность регрессирует в пределах 48 часов, больные характеризуются низким процентом гнойно-септических осложнений (13,3 %) и летальных исходов) и неблагоприятный (полиорганная недостаточность не регрессирует в пределах 48 часов, пациенты характеризуются высоким процентом гнойно-септических осложнений (50 %) и летальных исходов (46,5 %)).

2. Развитие посттравматической полиорганной недостаточности связано с органным повреждением по типу запрограммированной клеточной гибели. Апоптоз развивается как по внешнему, так и по внутреннему пути, о чем свидетельствуют высокие уровни белков – индукторов внешнего (Fas, FasL) и внутреннего (Bcl-2, p53) механизмов.

3. Определены наиболее ранние, значимые и независимые предикторы

поздней посттравматической полиорганной недостаточности. Создана прогностическая модель (в первые сутки баллы по шкале ISS более 36, уровень Vcl-2 более 39,2 нг/мл; на вторые сутки признаки острого респираторного дистресс-синдрома ( $pO_2/FiO_2 < 200$  или наличие билатеральных инфильтратов), уровень Fas менее 146,8 пг/мл, p53 более 6,2 U/мл и FasL более 150,2 пг/мл) с процентом верного предсказания 99,5 %; AUROC 0,99; чувствительность и специфичность теста 95 % и 89 % соответственно.

4. На основе модели логистической регрессии создан алгоритм раннего прогнозирования варианта течения посттравматического периода, основанный на длительности полиорганной недостаточности. Количество баллов по шкале ISS более 30 в совокупности с увеличением концентрации Vcl-2 более 32 нг/мл в первые сутки прогнозируют высокий (90,2 %) риск развития неблагоприятного течения посттравматического периода и прогрессирование полиорганной недостаточности. Наличие признаков острого респираторного дистресс-синдрома в совокупности со снижением концентрации Fas менее 205 пг/мл и повышением концентрации p53 более 6 U/мл на вторые сутки свидетельствуют о крайне высоком (94,4 %) риске неблагоприятного варианта течения посттравматического периода. Клиническое применение алгоритма и практических рекомендаций позволит начать упреждающую терапию осложнений тяжелой сочетанной травмы.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При поступлении пострадавшего с тяжелой сочетанной травмой комплекс стандартного мониторинга витальных показателей расширяется за счет оценки тяжести травмы по шкале ISS и концентрации сывороточных маркеров апоптоза. При определении в первые сутки после травмы количества баллов по шкале ISS более 30 в совокупности с увеличением концентрации Vcl-2 более 32 нг/мл прогнозируют высокий риск развития неблагоприятного течения посттравматического периода и вероятность прогрессирования полиорганной недостаточности. Наряду со стандартными реанимационными и противошоковыми мероприятиями подобной категории больных обеспечивают:

- расширенный инвазивный гемодинамический мониторинг с расчетом параметров доставки и потребления кислорода: достижение  $DO_2$  не менее 520 мл/мин/м<sup>2</sup>, коэффициента экстракции кислорода не менее 25 % и среднего АД не менее 70 мм. рт. ст. в течение первых 12 часов за счет инфузионно-

трансфузионной терапии, трансфузии компонентов крови и подбора дозировок катехоламиновой поддержки;

- раннюю респираторную поддержку с обеспечением минимально возможной  $FiO_2$  и использованием концепции «безопасной искусственной вентиляции легких» (дыхательный объем 6–7 мл/кг массы тела, оптимальный уровень ПДКВ, рестриктивная инфузионная терапия).

2. На вторые сутки после травмы констатация клинико-лабораторных признаков острого респираторного дистресс-синдрома ( $pO_2/FiO_2 < 200$ ) в сочетании со снижением концентрации Fas менее 205 пг/мл и повышением концентрации p53 более 6 U/мл свидетельствуют о крайне высоком риске неблагоприятного варианта течения посттравматического периода и прогрессирования полиорганной недостаточности. Наряду со стандартными реанимационными и противошоковыми мероприятиями, подобной категории пострадавших необходимо обеспечить:

- продолжение респираторной поддержки с использованием концепции «безопасной искусственной вентиляции легких»;

- энтеральную нутритивную поддержку (белок 1–2 г/кг массы тела, соотношение белок/небелковые калории 1/140, глутамин в/в 1 г/кг массы тела);

- профилактическую антибактериальную терапию (цефалоспорины III генерации или защищенные аминопенициллины);

- контроль гликемии на уровне 4–10 ммоль/л.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Радивилко, А. С.** Системный воспалительный ответ и апоптоз в патогенезе посттравматической полиорганной недостаточности / **А. С. Радивилко, Е. В. Григорьев** // **Сибирский медицинский журнал.** – 2014. – № 1. – С. 18–23.

2. **Радивилко, А. С.** Динамика сывороточных маркеров апоптоза у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой / **А. С. Радивилко, Е. В. Григорьев** // **Медицина и образование в Сибири (электронный журнал).** – 2014. – № 4. – [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1465](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1465).

3. **Радивилко, А. С.** Диагностическая значимость плазматических концентраций маркеров апоптоза у пострадавших с политравмой / **А. С. Радивилко, А. В. Киселева, Е. В. Григорьев** // **Вестник Кузбасского научного центра.** – Кемерово, 2010. – Вып. № 1. – С. 135–136.

4. Динамика сывороточных маркеров апоптоза при благоприятном прогнозе сочетанной травмы / А. В. Киселева, Ю. А. Чурляев, Т. И. Борщикова, Н. Н. Епифанцева, **А. С. Радивилко**, О. А. Дербенева, Е. В. Григорьев // Медицина неотложных состояний. – 2011. – № 6 (37). – С. 107–110.

5. **Радивилко, А. С.** Сывороточные маркеры апоптоза в прогнозировании синдрома полиорганной недостаточности при тяжелой сочетанной травме / **А. С. Радивилко**, А. В. Киселева, Е. В. Григорьев // Беломорский симпозиум : сборник материалов. – Архангельск, 2011. – С. 23–24.

6. Diagnostic and prognostic significance of serum apoptosis markers in the patients with severe trauma injury / E. Grigoryev, **A. Radivilko**, A. Kiseleva, G. Vavin // Critical Care : 30st International Symposium on intensive care and emergency medicine. – 2010. – № 14. – P. 286.

Диагностическая и прогностическая значимость сывороточных маркеров апоптоза у пострадавших с тяжелой травмой / Е. Григорьев, **А. Радивилко**, А. Киселева, Г. Вавин // Интенсивная терапия : 30-й международный симпозиум по интенсивной терапии и неотложной медицинской помощи. – 2010. – № 14. – С. 286.

7. Kiseleva, A. SAPO-1/Fas and sFas-L ratio, level of Bcl-2 and p53 as a predictors of multiple organ dysfunction syndrome in polytrauma / A. Kiseleva, E. Grigoryev, Y. Churlyayev, **A. Radivilko**. // Critical Care : 31st International Symposium on intensive care and emergency medicine. – 2011. – № 15. – P. 417.

Киселева, А. Соотношение sApo -1/ Fas и sFas - L и уровень Bcl-2 и p 53 в качестве предикторов синдрома полиорганной недостаточности при политравме / А. Киселева, Е. Григорьев, Ю. Чурляев, **А. Радивилко** // Интенсивная терапия : 31-й международный симпозиум по интенсивной терапии и неотложной медицинской помощи. – 2011. – № 15. – С. 417.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДН	– дыхательная недостаточность	ТСТ	– тяжелая сочетанная травма
ОПН	– острая почечная недостаточность	ЦН	– церебральная недостаточность
ОПечН	– острая печеночная недостаточность	APACHE	– acute physiology and chronic health evaluation
ПОН	– полиорганная недостаточность	ISS	– injury intensity score
СВО	– системный воспалительный ответ	SOFA	– sepsis-related organ failure
ССН	– сердечно-сосудистая недостаточность		