

© І.А. Криворучко, С.М. Тесленко, М.М. Тесленко, В.М. Чеверда, 2014

УДК: 616.37-089.168.1.1-06:616.37-002-07:611.018.74

І.А. КРИВОРУЧКО, С.М. ТЕСЛЕНКО, М.М. ТЕСЛЕНКО, В.М. ЧЕВЕРДА
Харківський національний медичний університет, кафедра хірургії №2, Харків

РОЛЬ МАРКЕРІВ ПОШКОДЖЕННЯ ЕНДОТЕЛІУ В ПРОГНОЗУВАННІ ГОСТРОГО ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИТУ ПІСЛЯ ПРЯМИХ ВТРУЧАНЬ НА ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ З ПЕРЕВАЖНИМ УРАЖЕННЯМ ЇЇ ГОЛОВКИ

Дослідження виконано у 18 хворих на хронічний панкреатит та 14 хворих на рак підшлункової залози. Результати досліджень вказують, що хронічний панкреатит і рак підшлункової залози поєднані з розвитком ендотеліальної дисфункції, яка протікає на фоні активації процесів перекисного окислення ліпідів, накопичення активних форм кисню та токсичних продуктів обміну NO_2 , NO_3 , NH_3 і інших, які корелюють із ступенем тяжкості перебігу хвороби і наявності ускладнень захворювання. Пацієнти з наростаючим рівнем VEGF мають сприятливий прогноз, оскільки при наявному обсязі деструктивних змін у підшлунковій залозі і рівні ендотоксикозу організм формує обмежувальний бар'єр навколо вогнищ деструкції, ендотелій зберігає регуляторну здатність. Зниження VEGF в плазмі крові при гострому післяопераційному панкреатиті свідчить про недостатній функції ендотелію і може служити маркером розвитку SIRS. Це також свідчить про те, що в сформованих умовах організм хворого не здатний вибудувати повноцінний обмежувальний бар'єр навколо вогнищ деструкції в підшлунковій залозі. Надалі це призводить до прориву медіаторів і ендотоксинів з вогнища запалення в системний кровотік і викликає розширення зони ушкодження і обваження SIRS.

Ключові слова: гострий післяопераційний панкреатит, ендотеліальна дисфункція, прогноз

Вступ. Одним із завдань сучасної хірургічної гастроентерології є не тільки забезпечення добрих і відмінних безпосередніх результатів, а й створення умов для ефективної реабілітації пацієнтів у ранньому післяопераційному періоді і запобігання післяопераційних ускладнень у хворих, що перенесли радикальні операції на підшлунковій залозі з приводу хронічного панкреатиту і раку з переважним ураженням головки залози. Проблема лікування в стаціонарі хворих з гострим післяопераційним панкреатитом є однією з найбільш серйозних в хірургічній гастроентерології. Гострий післяопераційний панкреатит (ГПП) – одне з найважчих і важко прогнозованих ускладнень в абдомінальній хірургії. Число хворих з даною патологією неухильно зростає, особливо після втручань на підшлунковій залозі, що виконуються з приводу раку та хронічного панкреатиту, а ГПП у цієї категорії хворих становить 8-30% [4]. Традиційна тактика ведення хворих з даною патологією не задовольняє вимоги хірургів. Необхідне вдосконалення не тільки методів діагностики, лікування та профілактики ГПП, а також впровадження нових методів, заснованих, насамперед, на вивченні патогенезу розвитку місцевих і системних ускладнень захворювання.

Ендотеліальна дисфункція є патологічним станом, що виникає на фоні порушення продукції ендотеліальних факторів. Це призводить до порушення функції органів і систем організму, які виникають на фоні дисбалансу між продукцією судинорозширюючих, ангіопротекторних, ангіопрولیферативних факторів, з одного боку, і вмістом судино звужуючих, протромботичних, проліферативних, з іншого. Ендотелій бере участь у регуляції судинного тону, про-

никності судин, адгезії тромбоцитів і лейкоцитів, ангіогенезі, тромборезистентності, імунній відповіді, синтезі медіаторів запалення та їх інгібіторів, а також здійснює бар'єрні функції. Важливою функцією ендотелію є продукція оксиду азоту (NO), що підтримує базальний тонус судин і бере участь у здійсненні вазодилатації у відповідь на дію різноманітних стимулів. В останні роки у науковій літературі з'явилась велика кількість робіт, які свідчать про важливу роль оксиду азоту, як поліфункціонального регулятора структурно метаболічних процесів [1, 2, 4], а згідно із сучасними уявленнями, хімічний медіатор NO відіграє універсальну роль модулятора фізіологічних функцій серцево-судинної, нервової, імунної, м'язової, дихальної, травної та інших систем організму. Цей месенджер має відношення до розвитку багатьох патологічних процесів, він виступає як патогенетичний регуляторний і медіаторний фактор формування порушень гомеостатичної функції організму, як аутокринна сигнальна молекула, NO бере участь у проведенні сигналу від мембранних рецепторів до молекул внутрішньоклітинних структур, в тому числі і по гуанілатциклазному шляху, як паракринний фактор, NO вносить частку в злагоджену роботу оточуючих клітин, беручи участь в утворенні молекулярних систем міжклітинної сигналізації [2]. Оксид азоту відповідає за тонус судин, міжклітинну комунікацію, модуляцію нейротрансмісії, рівень імунної цитотоксичності, секрецію медіаторів і гормонів. Ця молекула може бути пагубною як для клітин, включаючи ракові, так і для внутрішньоклітинних патогенних мікроорганізмів. Установлено, що цитотоксичність NO є результатом утворення великої кількості цих

молекул, що супроводжується ініціацією апоптозу. Подвійна дія NO проявляється в його здатності захищати клітину від апоптозних сигналів і здійснювати апоптоз. Буде або ні молекула NO володіти цитотоксичними функціями та чи проявиться її цитотоксичність, залежить від типу клітини, фази її розвитку, біоелектричного потенціалу, локальної концентрації NO і інших активних форм кисню [2]. В останній час отримано багато нових даних про метаболізм NO в живій клітині і структурі NO-синтази. Установлено, що оксид азоту діє як важливий регулятор таких загальноклітинних процесів, як експресія генів і функціональної активності мітохондрій. В організмі NO синтезується із амінокислоти L-аргініну. Цей процес представляє собою комплексну окислювальну реакцію, що каталізується ферментом NO-синтазою, який є поліфункціональною оксидоредуктазою, яка нагадує по ряду властивостей систему цитохром-P450-редуктазу [2]. На теперішній час ідентифіковано три ізоферменти NOS, які названі у відповідності з типами клітин, в яких вони були вперше виявлені: нейрональна (nNOS), індукцйбельна (iNOS) або макрофагальна (mNOS) і ендотеліальна (eNOS). Всі ізоформи NOS каталізують утворення NO у відповідь на рецепторну, хімічну, біологічну або фізичну стимуляцію. Вільний радикал NO в клітині швидко взаємодіє з молекулярним киснем, супероксидним аніон-радикалом і металами, що вміщують гем, та негемовими білками [5, 6].

Ангіогенез – утворення нових кровоносних судин, обумовлене ембріогенезом, загоєнням ран, регенерацією органів і жіночим репродуктивним циклом. У постнатальний період цей процес в організмі людини знаходиться під жорстким контролем, оскільки як надмірне утворення кровоносних судин, так і недостатність їх розвитку можуть призвести до серйозних захворювань. У результаті великого числа досліджень, проведених в останні роки, показано, що порушення ангіогенезу характерно для різних видів злоякісних новоутворень, макулярних дистрофій, атеросклерозу, артритів, ускладнень СНІДу і цукрового діабету, хвороби Альцгеймера і понад 70 хронічних захворювань. За даними Фонду ангіогенезу (США) кількість людей з такими порушеннями сягає більше одного мільярда [7].

Мета дослідження. Вивчити роль ендотеліальної дисфункції у механізмі формування хронічного панкреатиту і раку підшлункової залози та визначення можливості використання маркерів пошкодження ендотелію для оцінки ефективності лікування та прогнозування ГПП в ранньому післяопераційному періоді після прямих втручань на підшлунковій залозі з переважними ураженнями її головки.

Матеріали та методи. Клінічними, лабораторно-інструментальними методами у 18 пацієнтів діагностовано хронічний панкреатит, який в 6

випадках був ускладнений жовтяницею. В 14 хворих діагностовано і гістоморфологічно підтверджено рак підшлункової залози, який у 13 пацієнтів був ускладнений жовтяницею. Для дослідження ендотеліальної дисфункції виділено 2 групи пацієнтів: до першої групи увійшли хворі на хронічний панкреатит, до другої – на рак підшлункової залози. До групи порівняння включено 17 пацієнтів аналогічного віку та статі. Програма дослідження стану ендотеліальної дисфункції у хворих із хронічним панкреатитом і раком підшлункової залози передбачала: визначення в сироватці крові як хворих, так і умовно-здорових пацієнтів продуктів окислення оксиду азоту – нітритів (NO₂), нітратів (NO₃), S-нітрозотіолу, ендотеліальної (eNOS) і індукцйбельної (iNOS) NO-синтази, а також одного із токсичних продуктів окислювального дезамінування амінокислот (L-глутаміну і L-аспарагіну) пуринових азотистих основ – аміаку (NH₃).

Вміст у сироватці крові NO₂, NO₃, S-нітрозотіолу та активність eNOS і iNOS визначався у відповідності із рекомендаціями [6]. Аміак в сироватці крові визначався методом іонообмінної хроматографії на іонітах. Після розподілу амінокислот на іонітах, реєстрація їх кількості і аміаку здійснювалась на автоматичному аналізаторі амінокислот Т-339 (Чехословаччина). Для дослідження концентрації фактора росту ендотелію судин (VEGF) кров у обстежуваних пацієнтів відбирали в ранкові години до прийому їжі з ліктьової вени для отримання плазми без добавок та протягом години після забору пробірки з кров'ю доставляли в лабораторію для наступної обробки. Концентрацію VEGF в плазмі крові визначали із застосуванням набору реактивів для твердофазного імуноферментного аналізу «VEGF-ІФА-БЕСТ» (ЗАТ «Вектор-Бест», Новосибірськ), а також набору «Human VEGF Quantikine ELISA» («R&D Systems», США). Дослідження виконувались до операції за 3–5 добу та на 10–14 добу після неї. Статистичне опрацювання отриманих результатів дослідження виконувалась з використанням методів варіаційної статистики і метода Стьюдента-Фішера по програмі «Біостатистика». Відмінності між вибірками вважалися статистично вірогідними при значенні для $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Всім хворим виконані такі операції: у 3 хворих на хронічний панкреатит виконано дуоденозберігаючу резекцію головки підшлункової залози, у 2 – її Бернський варіант, у 2 – панкреатодуоденальну резекцію і у 11 – резекцію вентральної частини головки за Фреєм; у всіх 14 хворих на рак головки підшлункової залози виконано панкреатодуоденальну резекцію з лімфодисекцією D2.

Дослідження стану ендотеліальної дисфункції у хворих на хронічний панкреатит і рак підшлунко-

вої залози виявили підвищення в плазмі крові аміаку, нітритів, нітратів, S-нітрозотіолу, ендотеліальної (eNOS) NO-синтази. Перебіг хронічного панкреатиту супроводжувався підвищенням індуцибельної (iNOS) No-синтази, тоді як в умовах перебігу раку підшлункової залози цей показник значно знижувався порівняно з групою умовно-здорових пацієнтів (табл. 1, 2).

Оцінка показників ендотеліальної дисфункції при хронічному панкреатиті характеризувалась зростанням аміаку на 65,4 %; нітритів на 75,5 %; нітратів – на 40,7 %; S-нітрозотіолу – на 65,2 %; ендотеліальної NO-синтази – на 19 %; індуцибельної NO-синтази – на 89,5 %. Ці дані свідчать про накопичення у хворих з хронічним панкреатитом великої кількості оксиду азоту, який здатний із сульфгідрильними групами білків, шляхом їх нітрозолування утворювати S-нітрозотіоли. Внаслідок блокування SH-груп білків може

змінюватись їх активність і порушуватись їх регуляторна функція. Аналіз отриманих даних вказує на високу вірогідність підвищення у хворих при хронічному панкреатиті ускладненого жовтяницею великих концентрацій активних форм кисню – пероксинітриду, нітрозопероксикарбонату, гідроксильного радикалу і інших реакційно здатних радикалів на тлі зростання оксиду азоту та зниження глутатіону і інших сполук у органах і тканинах, що містять тіол, та підвищенні рівня VEGF у плазмі крові в середньому на 116,7 % ($p < 0,05$).

Результати аналізу показників ендотеліальної дисфункції у хворих на рак підшлункової залози виявили в сироватці крові аміаку – 156,7 %, нітратів – 142,9 %, нитритів – 133,3 %, S-нітрозотіолу – 286,9 %, ендотеліальної No-синтази – 112,1 % на тлі зниження активності індуцибельної No-синтази – 44,7 %, що детально представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Стан ендотеліальної дисфункції у хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози до операції

Показники	Групи спостереження, M \pm m.		
	Умовно здорова (n=17)	Хронічний панкреатит (n=18)	Рак підшлункової залози (n=14)
NH ₃ (нмоль/л)	23,1 \pm 1,6	38,2 \pm 3,4 *	59,3 \pm 4,2 *
NO ₂ (мкм/л)	14,7 \pm 1,2	25,8 \pm 1,7 *	35,7 \pm 2,1 *
NO ₃ (мкм/л)	24,6 \pm 1,5	34,6 \pm 2,3 *	57,4 \pm 3,7 *
S-нітрозотіол (мкм/л)	0,23 \pm 0,02	0,38 \pm 0,07 *	0,89 \pm 0,07 *
eNOS (пмоль/хв·мг білка)	0,58 \pm 0,04	0,69 \pm 0,08 *	1,23 \pm 0,11 *
iNOS (пмоль/хв·мг білка)	0,38 \pm 0,03	0,72 \pm 0,06 *	0,21 \pm 0,02 *
VEGF (пг/мл)	133,3 \pm 25,75	288,9 \pm 43,8 *	487,6 \pm 87,9 *

Примітка: * різниця вірогідна, $p < 0,05$

Дослідження виявило зростання концентрації аміаку в сироватці крові хворих на рак підшлункової залози більше ніж у 2 рази. Це може вказувати на розвиток ендогенної інтоксикації та порушення механізмів знешкодження аміаку, високі рівні якого з прогностично-значущими критеріями при оцінці ступеня важкості перебігу хвороби. В усіх випадках рак підшлункової залози супроводжувався більш високими концентраціями в сироватці крові вмісту нітритів, нітратів, S-нітрозотіолу порівняно з групою хворих на хронічний панкреатит ($p < 0,05$). При цьому середній рівень VEGF був вище на 265,8 % показників контролю ($p < 0,05$) та на 68,8 % – показників у хворих на хронічний панкреатит. Аналіз динамічного показника індуцибельної No-синтази показав підвищення активності ферменту при хронічному панкреатиті та його суттєве зниження при раку підшлункової залози, що є важливим критерієм в диференціальній діагностиці хронічного панкреатиту та раку підшлункової залози (табл. 1).

Результати досліджень вказують, що хронічний панкреатит і рак підшлункової залози поєднані з ендотеліальною дисфункцією, яка розвивається на фоні активації процесів перекисного окислення ліпідів, накопичення активних форм кисню та токсичних продуктів обміну NO₂, NO₃, NH₃ і інших, які корелюють із ступенем тяжкості перебігу хвороби і наявності ускладнень захворювання. Прогностично-значимим показником у диференціальній діагностиці хронічного панкреатиту і раку підшлункової залози може бути індуцибельна NO-синтаза, а прогностичним критерієм формування ускладнених форм перебігу захворювання – рівень S-нітрозотіолів та VEGF крові. При дослідженні виявлено значне підвищення показників, що вивчалися, у хворих при розвитку ГПП та значне зниження індуцибельної NO-синтази у порівнянні із контролем (табл. 2). При цьому, рівень VEGF у середньому на 162,4 % був вищим у хворих, у яких розвинувся ГПП ($p < 0,05$) на 3-5 добу післяопераційного періоду (табл. 2, рис. 1).

Стан ендотеліальної дисфункції у хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози після операції (3-5 доба)

Показники	Групи спостереження, М±m.		
	Умовно здорова (n=17)	Хворі без розвитку ГПП (n=22)	З розвитком ГПП (n=10)
NH ₃ (нмоль/л)	23,1±1,6	27,2±4,4 *	69,3±5,1 *
NO ₂ (мкм/л)	14,7±1,2	19,3±2,6 *	45,6±3,8 *
NO ₃ (мкм/л)	24,6±1,5	30,4±3,3 *	67,2±4,8 *
S-нітрозотіол (мкм/л)	0,23±0,02	0,48±0,04 *	0,99±0,05 *
eNOS (пмоль/хв·мг білка)	0,58±0,04	0,65±0,03 *	1,57±0,09 *
iNOS (пмоль/хв·мг білка)	0,38±0,03	0,51±0,04 *	0,16±0,01 *
VEGF (пг/мл)	133,3±25,75	258,7±58,73 *	678,8±145,4 *

Примітка: * різниця вірогідна, $p < 0,05$

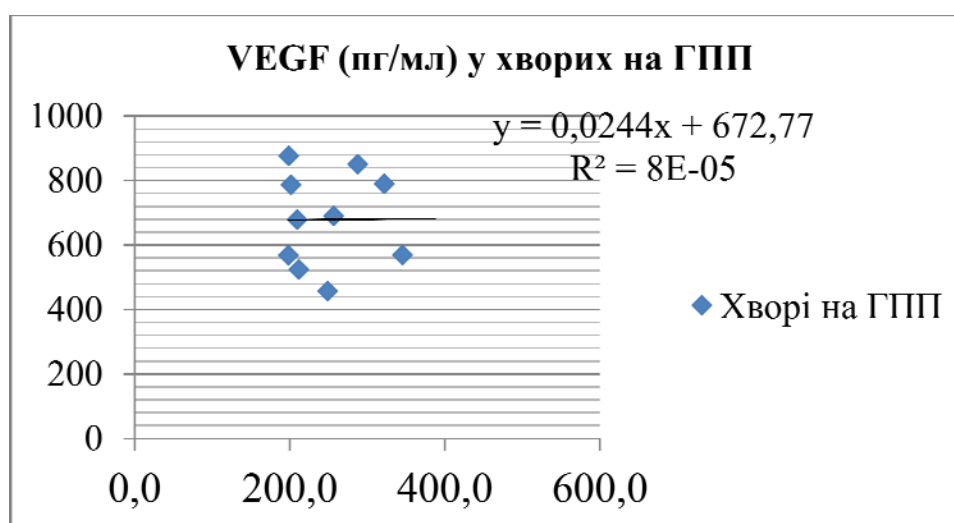


Рис. 1. Розподіл значень VEGF у плазмі крові у хворих при розвитку ГПП (3-5 доба після операції).

За результатами дослідження рівня VEGF плазми крові в динаміці у групі з ГПП виділено дві підгрупи: до першої увійшли пацієнти, у яких рівень VEGF зростає на 10-14 добу після операції, в другу – особи, у яких рівень VEGF знижувався або залишався на колишньому рівні у ці строки дослідження. У 1 підгрупу включені 5 хворих, у яких після дослідження рівень VEGF плазми крові піднявся з $642,9 \pm 180,6$ до $1051 \pm 85,61$ пг/мл (критерій Манна-Уїтні $U_{\text{емп.}} = 0$ – в зоні значущості, $p \leq 0,01 - \leq 0,05$). Всім пацієнтам у цій підгрупі було проведено комплексну консервативну терапію, і на тлі лікування настав регрес ГПП на 10-14 добу після операції без розвитку гнійно-септичних ускладнень. У другу підгрупу увійшли 5 хворих, у яких відзначено зниження рівня VEGF плазми крові з $627 \pm 133,8$ до $303,3 \pm 57,36$ пг/мл (критерій Манна-Уїтні $U_{\text{емп.}} = 0$ – в зоні значущості, $p \leq 0,01 - \leq 0,05$). В цієї підгрупі 2 з 5 хворих загинули на тлі інфекційно-токсичного шоку і прогресуючої поліорганної недостатності.

Попередні дослідження свідчать, що пацієнти з наростаючим рівнем VEGF мають сприятливий прогноз, оскільки при наявному обсязі деструк-

тивних змін у підшлунковій залозі і рівні ендотоксикозу організм формує обмежувальний бар'єр навколо вогнищ деструкції, ендотелій зберігає регуляторну здатність. Зниження VEGF в плазмі крові при ГПП говорить про недостатній функції ендотелію і може служити маркером розвитку SIRS. Це також свідчить про те, що в сформованих умовах організм хворого не здатний вибудувати повноцінний обмежувальний бар'єр навколо вогнищ деструкції в підшлунковій залозі. Надалі це призводить до прориву медіаторів і ендотоксинів з вогнища запалення в системний кровотік і викликає розширення зони ушкодження і обваження SIRS.

Висновки.

1. Маркер пошкодження ендотелію – VEGF – при динамічному дослідженні можна застосовувати для прогнозування розвитку септичних ускладнень при ГПП.

2. Зниження рівня VEGF плазми крові або відсутність його підвищення свідчить про обваження SIRS, неефективності лікувальних заходів і має несприятливе прогностичне значення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гуревич К.Г. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функции / К.Г. Гуревич, Н.Л. Шимановский // Вопросы биологии, медицины и фармакологической химии. — 2000. — №4 — С. 16—21.
2. Киселик І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів у хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології / І.О. Киселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // Лабораторна діагностика — 2001. — №3 — С. 43—45.
3. Ковальова О.М. Діагностика ендотеліальної функції — оцінка вазоактивного пулу оксиду азоту / О.М. Ковальова, Г.В. Демиденко, Т.В. Горбач // Методичні рекомендації МОЗ України. — Київ, 2007. — С. 20.
4. Криворучко И.А. Панкреатит. Травмы поджелудочной железы / И.А. Криворучко, В.В. Бойко, Н.И. Березка [и др.] // Харьков. — 2006. — С. 444.
5. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма / И.Ю. Мальшев // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии — 1997. — №1 — С. 49—56.
6. Невзорова В.А. Роль оксида азота в регуляции легочных функций / В.А. Невзорова, М.В.Зуев, Б.И. Гельцер // Терапевтический архив. — 1997. — Т.69, №3 — С. 68—73.
7. <http://www.angio.org/learn/angiogenesis> интернет ресурс

I.A. KRIVORUCHKO, S.N. TESLENCO, N.N. TESLENCO, V.M. CHEVERDA

Kharkiv National Medical University, Department of Surgery №2, Kharkiv

ROLE OF ENDOTHELIAL DAMAGE MARKERS IN PREDICTING ACUTE POSTOPERATIVE PANCREATITIS AFTER DIRECT INTERVENTION IN THE PANCREAS WITH A PRIMARY LESION OF THE HEAD

The research was conducted in 18 patients with chronic pancreatitis and 14 patients with pancreatic cancer. The research results indicate that chronic pancreatitis and pancreatic cancer combined with the development of endothelial dysfunction that occurs on the background of activation of lipid peroxidation, accumulation of reactive oxygen species and toxic metabolic products NO₂, NO₃, NH₃ and others that are correlated with the severity of the disease and the presence of complications of the disease. Patients with progressive levels of VEGF have a favorable prognosis, since the existing amount of destructive changes in the pancreas and the level of endotoxemia body forms a restrictive barrier around foci of destruction, the endothelium maintains regulatory power. Reduction of serum VEGF in acute postoperative pancreatitis implies a lack of endothelial function and may serve as a marker of SIRS. It also indicates that under the circumstances, the patient's body is not able to build a complete restrictive barrier around foci of destruction in the pancreas. Further, this leads to a breakthrough mediators of endotoxin and inflammatory focus in the systemic circulation and cause expansion of the damage and weighting SIRS.

Key words: acute postoperative pancreatitis, endothelial dysfunction, prognosis

Стаття надійшла до редакції: 4.04.2014 р.