



В. В. Бойко,
Д. О. Євтушенко,
І. В. Криворотько,
І. А. Тарабан,
Д. В. Мінухін,
Н. М. Воскресенська

Харківський національний
медичний університет

ДУ «Інститут загальної
та невідкладної хірургії
ім. В. Т. Зайцева НАМНУ»,
м. Харків

© Колектив авторів

ЕПІГЕНОМНІ ФАКТОРИ РОЗВИТКУ СПАЙКОВОЇ ХВОРОБИ ОЧЕРЕВИНИ

Резюме. Етіологія розвитку СХО — найбільш частого післяопераційного ускладнення — може визначатися епігеномними порушеннями, що торкаються різних ланок резистентності й імуногенетичного контролю.

Мета дослідження: вивчення можливих механізмів формування спайок в черевній порожнині для розробки індивідуальних методів профілактики розвитку післяопераційних ускладнень.

Матеріали та методи досліджень. Для вивчення епігеномних факторів в розвитку СХО вивчався імунний статус хворих, оперованих на органах черевної порожнини. В групу порівняння увійшли 55 хворих з ускладненим перебігом спайкової хвороби очеревини, в основну групу увійшли 59 хворих, оперованих на органах черевної порожнини на тлі спайкової хвороби очеревини, перебіг якої був бесимптомним.

Результати досліджень та їх обговорення. Виявлені епігеномні фактори, асоційовані з ризиком розвитку СХО: належить збільшення концентрації гострофазових білків — церулоплазміну, гаптоглобіну, С-реактивного білка, С3-фрагмента білків системи комплементу, зміни експресії генів молекул адгезії (CD31 збільшився на 10 %, CD54 збільшився до 24,1 % у зіставленні з групою порівняння — 13,25 %).

Висновки. Результати наших досліджень показали, що у пацієнтів СХО є різноманітний спектр епігеномних тригерних факторів. До епігеномних факторів, асоційованих з ризиком розвитку СХО, належить збільшення концентрації гострофазових білків — церулоплазміну, гаптоглобіну, С-реактивного білка, С3-фрагмента білків системи комплементу, зміни експресії генів молекул адгезії (CD31 збільшився на 10 %, CD54 збільшився до 24,1 % у зіставленні з групою порівняння — 13,25 %).

Ключові слова: спайкова хвороба очеревини, прогнозування, епігеномні фактори.

Вступ

Утворення спайок в черевній порожнині у хворих прооперованих на органах черевної порожнини є поширеним серед захворювань черевної порожнини, прояви якого можуть спостерігатися протягом тривалого часу. Запобігання спайок залишається не вирішеною проблемою у пацієнтів, яким виконуються оперативні втручання на органах черевної порожнини, завжди є ризик розвитку спайкової хвороби очеревини. Дане ускладнення розвивається у 67-91 % пацієнтів, які перенесли операції відкритим доступом, в різні терміни післяопераційного періоду [1, 3, 5]. Інші автори відзначають, що спайковий процес очеревини є неминучим післяопераційним ускладненням у всіх хворих [2, 4]. Великий спектр запропонованих методів лікування та профілактики цієї патології не вирішує повністю питання лікування та профілактики спайкового процесу у черевній порожнині.

Мета досліджень

Вивчення можливих механізмів формування спайок в черевній порожнині для розробки індивідуальних методів профілактики розвитку післяопераційних ускладнень.

Матеріали та методи досліджень

Для вивчення епігеномних факторів в розвитку СХО вивчався імунний статус хворих, оперованих на органах черевної порожнини. У групу порівняння увійшли 55 хворих з ускладненим перебігом спайкової хвороби очеревини, в основну групу увійшли 59 хворих, оперованих на органах черевної порожнини на тлі спайкової хвороби очеревини, перебіг якої був бесимптомним. Фагоцитарну активність нейтрофілів визначали в лейкоцитарній суспензії, отриманій з гепаринізованій крові. Шляхом підрахунку відсотка клітин, що вступили в фагоцитоз, розраховували фагоцитарний індекс. Середнє число дріжджових клітин, що є в нейтрофілах крові, складало фагоцитарне число.



Киснезалежний метаболізм нейтрофілів досліджували в реакції спонтанного та стимульованого відновлення ними нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) за методикою А.Н. Маянського. Під час реакції НСТ відновлюється до нерозчинного диформаза, що відкладається в клітинах у вигляді темно-синіх гранул, які візуально визначаються шляхом мікроскопування.

Визначення вмісту сироваткових імуноглобулінів класів А, М і G здійснювали турбодиметричним методом за допомогою імуноферментного аналізатора Stat Fax 3200.

Визначення змісту аутоімунних антитіл (тест лімфоцитоксичності) проводили за методом Терасакі. Визначення органоантитіл проводили методами ІФА з використанням панелі моноспецифічних антитіл фірми «Навина» й імунофлюоресцентним методом з використанням набору чіпових слайдів специфічних антитіл до тканини печінки, нирок, шлунка фірми «Євроімун». Лейкоцитограму визначали шляхом мікроскопії тонкого мазка крові, забарвленого за Романовським-Гімза.

Клітинний імунітет оцінювали за експресією маркерів диференціювання CD2+, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ і співвідношенню CD4+/CD8+ методом непрямої імунофлюоресценції з використанням специфічних моноклональних антитіл, мічених FITC. Визначення концентрації пептидів середньої молекулярної маси здійснювали методом спектрофотометрії. С-реактивний білок визначали за реакцією аглютинації з антитілами до С-реактивного білка, які адсорбовані на нейтральних частинках латексу (латекс-тест). Кількісне визначення досягали методом кратних розведень сироватки крові і повторення реакції аглютинації. Визначення концентрації сероглікоїдів в сироватці крові проводили фотометричним методом.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведено нами дослідження особливостей метаболізму, які можуть бути провідними

в розвитку порушення моделювання позаклітинного матриксу, який призводить до утворення спайок. Такими факторами можуть бути як генетичні, так і епігеномні.

Нами вивчений спектр епігеномних факторів у розвитку СХО. Результати оцінки зміни концентрації білків і білкових сполук сироватки крові, що беруть участь у синтезі міжклітинного матриксу, виявляли варіацію концентрацій сероглікоїдів (табл. 1).

ГАГ 1, 2, 3 фракції в обстежуваних пацієнтів відрізнялися від контрольних референтних значень.

ГАГ 3 були в 2 рази нижчими за референтні значення, та ця тенденція зберігалася в ранньому післяопераційному періоді.

Гострофазові білки, які виконують транспортну й окисидантну функцію, були вдвічі нижчими за контрольні значення, що свідчить про низький антиоксидантний резерв.

Гаптоглобін перевищував вдвічі контрольні значення, що може впливати на агрегаційну функцію, хемотаксис регуляторних імунологічних клітин.

У пацієнтів СХО було змінено співвідношення функціональних субпопуляцій Т-лімфоцитів, що виконують регуляторну функцію: хелперну, кілерну, супресорну. Експресія кластерів диференціювання CD була знижена порівняно з референтними значеннями. У доопераційному періоді основний кластер диференціювання CD 3 Т-лімфоцитів був знижений у 3 рази, ця тенденція зберігалася аж до 9-ї післяопераційної доби, коли відзначили двократне збільшення експресії цих рецепторів (табл. 2).

Хелперна функція CD 4 була знижена вдвічі протягом усього періоду обстеження. CD 8 Т-кілери знижені вдвічі, що виконують санітарну функцію елімінації чужорідних антигенів, а також знищення старіючих мутантних клітин у зоні альтерації тканин. Протягом усіх термінів обстеження регуляторний індекс CD 4 до CD 8 був знижений вдвічі.

Таблиця 1

Показники концентрації білків та білкових сполук, сероглікоїдів у сироватці крові

Показники	Групи	Контрольні значення	До операції	1-а доба після операції	5-а доба після операції	7-9-а доба після операції
С-реактивний білок		4,2±1,8	1,20±0,7,1	4,56±14,27	3,84±6,5	2,96±5,7
Сероглікоїди		4,0±1,0	3,5±0,7	2,58±0,47	2,78±0,89	5,17±3,8
ГАГ загальні		12,2±0,9	11,3±0,63	8,05±0,87	10,95±2,6	13,6±0,98
ГАГ 1 фракція		5,85±0,45	7,5±0,36	5,6±0,80	7,0±1,69	8,5±0,31
ГАГ 2 фракція		3,9±0,4	2,08±0,22	1,2±0,08	2,2±0,56	3,0±0,67
ГАГ 3 фракція		2,8±0,3	1,65±0,2	1,25±0,11	1,75±0,35	2,1±0,04
Хондроїтин-сульфати		0,05±0,001	0,218±0,05	0,100±0,03	0,152±0,06	0,247±0,056
Церулоплазмін		315,0±75,0	129,3±12,3	106,02±43,8	122,9±18,86	171,05±48,8
Гаптоглобін		1,09±0,08	1,54±0,3	2,56±0,99	3,82±3,13	1,32±0,18

Таблиця 2

Показники експресії кластерів диференціювання CD

Показники	Контрольні значення	До операції	1-а доба після операції	5-а доба після операції	7-9-а доба після операції
CD2 ⁺ , абс.ч x 10 ⁶ /л	400,00±95,00	312±37,1	240,0±63,42	284,0±94,2	250,0±14,1
CD2 ⁺ , %	16,30±3,40	18,7±1,8	18,0±3,74	19,8±5,1	13,5±2,1
CD3 ⁺ , абс.ч x 10 ⁶ /л	1100,0±450,00	559,4±57,6	512,0±176,42	450±117,3	415,0±210,2
CD3 ⁺ , %	62,00±6,50	33,01±2,26	31,3±3,91	31,6±6,8	22,5±3,5
CD4 ⁺ , абс.ч x 10 ⁶ /л	600,00±195,00	315,3±40,8	296,0±101,9	274±74,7	240,0±56,5
CD4 ⁺ , %	38,30±6,50	18,5±1,7	18,0±2,6	18,6±3,9	13,0±1,41
CD8 ⁺ , абс.ч x 10 ⁶ /л	300±98,00	235,6±23,6	218,0±76,98	176,0±49,3	175,0±77,7
CD8 ⁺ , %	23,40±4,40	14,47±1,1	13,4±1,46	13,0±3,65	9,5±2,15
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,5±0,5	1,35±0,13	1,34±0,10	1,64±0,27	1,6±0,98

Таблиця 3

Показники динаміки фагоцитозу

Показники	Контрольні значення	До операції	1-а доба після операції	5-а доба після операції	7-9-а доба після операції
Фагоцитарний індекс, %	68,2±7,4	80,58±3,1	77,8±9,1	88,8±2,3	87,0±7,0
Фагоцитарне число	3,6±0,01	3,4±0,3	3,14±0,38	4,35±0,38	4,271±0,7
Індекс завершеності фагоцитозу	1,1±0,04	1,03±0,03	0,98±0,04	0,87±0,06	0,85±0,25
НСТ сп, %	13,2±1,4	37,0±4,6	40,8±9,1	24,5±2,7	25,0±4,04
НСТ ст, %	28,6±6,4	54,0±4,4	74,2±8,1	53,5±7,78	51,0±6,4
СЦК сп	1,6±0,3	0,57±0,09	0,65±0,18	0,33±0,06	0,42±0,05
СЦК ст	1,5±0,4	0,99±0,11	1,52±0,27	0,81±0,07	0,85±0,06
Індекс стимуляції	7,2±2,2	1,74±0,28	2,14±0,45	2,26±0,41	2,53±1,18
С3-фрагмент комплементу	1,25±0,1	1,53±0,33	1,49±0,2	1,48±0,22	1,33±0,12

Таблиця 4

Динаміка концентрації CD31, CD54, CD11a, CD11 b (Група порівняння)

Показники	Контрольна група	До операції	1-а доба після операції	5-7-а доба після операції	7-9-а доба після операції
CD31 ⁺ , %	12,2 ± 3,3	19,1±2,1	40,75±18,62	25,5±5,8	13,0±2,2
CD54 ⁺ , %	10,2±1,1	20,6±3,5	13,25±3,10	23,5±5,6	10,0±1,8
CD11a ⁺ , %	97,0±2,1	81,5±3,8	87,5±8,28	87±14,1	69±17,2
CD11b ⁺ , %	19,6±6,2	35,6±5,2	45,5±10,57	42,5±11,0	22±4,3

Таким чином, страждали всі регуляторні функції Т-системи імунітету: як в клітинах Т-хелперах, так і властивості Т-кілерів. У таблиці подано результати, які характеризують фактори вродженого первинного імунітету, визначають бар'єрну й антигенпрезентуючу функцію.

На всіх етапах обстеження було достовірне зниження перетравлювальної функції гранулоцитарних нейтрофілів, що є додатковим чинником ризику у створенні антигенного вантажу (табл. 3).

Причиною неспроможності ендцитозу була зміна резервної окислювальної функції ферментів антигенпрезентуючих фагоцитуючих клітин. Спонтанний та стимульований тест НСТ, який характеризує утворення активних форм O₂, що беруть участь у формуванні процесингу антигенів були максимально знижені в спонтанному тесті, а в стимульованому екзогенним зімозаном, ці тенденції спостерігали аж до 5-ї післяопераційної доби.

Можуть відбуватися епігеномні порушення експресії кластерів диференціювання CD, інтегринів, молекул адгезії на різних клітинних популяціях, подана в таблиці концентрація адгезивних молекул свідчить про достовірне збільшення їх експресії щодо референтних значень.

Що характерно, адгезивні молекули CD 54 зросли в 1,5-2 рази на всіх етапах обстеження в ранньому післяопераційному періоді. CD 11 були знижені в ці самі терміни, що свідчить про зниження хемотаксису й адгезії фагоцитуючих клітин, функцію яких ми досліджували (фагоцитоз, функція НСТ), а кластер диференціювання CD 31, які є фактором, що перешкоджає адгезії тромбоцитів, був компенсаторно підвищеним (табл. 4).

Висновки

Таким чином, результати наших досліджень показали, що у пацієнтів СХО є різноманітний спектр епігеномних тригерних факторів.



Етіологія розвитку СХО — найбільш частого післяопераційного ускладнення — може визначатися епігеномними порушеннями, що торкаються різних ланок резистентності й імуногенетичного контролю. У деяких випадках значною мірою такі епігенетичні фактори, як метилювання, впливають на експресію гена.

До епігеномних факторів, асоційованих з ризиком розвитку СХО, належить збільшення концентрації гострофазових білків — церулоплазміну, гаптоглобіну, С-реактивного білка, С3-фрагмента білків системи комплементу, зміни експресії генів молекул адгезії (CD31 збільшився на 10 %, CD54 збільшився до 24,1 % у зіставленні з групою порівняння — 13,25 %).

ЛІТЕРАТУРА

1. Застосування протизлукового гелю при резекції тонкої кишки на тлі злукового процесу в експерименті / В. Г. Мішалов, П. Л. Бик, І. М. Лешишин, В. М. Голінко / Хірургія України. — 2013. — № 4. — С. 107—118
2. Плечев, В.В. Хирургия спаечной болезни: руководство / В. В. Плечев, В. М. Тимербулатов, Р. З. Латыпов. — Уфа, 2015. — 738 с
3. Adhesions after abdominal surgery: a systematic review of the incidence, distribution and severity / К. Okabayashi, Н. Ashrafian, Е. Zacharakis [et al.] // Surg. Today. — 2014. — Vol. 44. — P. 405-420.
4. Hellebrekers, B.W.J. Pathogenesis of postoperative adhesion formation / B.W.J. Hellebrekers, T. Kooistra // Br. J. Surg. — 2011. — Vol. 98. — P. 1503-16. DOI: 10.1002/bjs.7657
5. Predictors of intra-abdominal adhesions / F. Shehata, A. Zarei, E. Shalom, P.G. Tulandi // Gynecol. Surg. — 2011. — Vol. 8. — P. 405-408. DOI: 10.1007/s10397-011-0669-5
6. Wiseman, D.M. Advances, retreats and challenges in adhesions research / D.M. Wiseman // INNOVA. — 2017. — № 2 (3). — P. 7-29. DOI: 10.21626/innova/2016.2/0

**ЭПИГЕНОМНЫЙ
ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ
СПАЕЧНОЙ БОЛЕЗНИ
БРЮШИНЫ**

**В. В. Бойко, Д. А. Евтушенко,
И. В. Криворотько,
И. А. Тарабан, Д. В. Минухин,
Н. М. Воскресенская**

Резюме. Этиология развития СББ — наиболее частого послеоперационного осложнения — может определяться эпигеномными нарушениями, касающихся различных звеньев резистентности и иммуногенетического контроля.

Цель исследования: изучение возможных механизмов формирования спаек в брюшной полости для разработки индивидуальных методов профилактики развития послеоперационных осложнений.

Материалы и методы исследований. Для изучения эпигеномных факторов в развитии СББ изучался иммунный статус больных, оперированных на органах брюшной полости. В группу сравнения вошли 55 больных с осложненным течением спаечной болезни брюшины, в основную группу вошли 59 больных, оперированных на органах брюшной полости на фоне спаечной болезни брюшины, ход которой был бессимптомным.

Результаты и их обсуждение. Обнаруженные эпигеномные факторы, ассоциированные с риском развития СББ: принадлежит увеличение концентрации острофазовых белков — церулоплазмина, гаптоглобина, С-реактивного белка, С3-фрагмента белков системы комплемента, изменения экспрессии генов молекул адгезии (CD31 увеличился на 10 %, CD54 увеличился до 24,1 % в сравнении с группой сравнения — 13,25 %).

Выводы. Результаты наших исследований показали, что у пациентов СББ имеется широкий спектр эпигеномных триггерных факторов. К эпигеномным факторам, ассоциированным с риском развития СББ, относится на увеличение концентрации острофазовых белков — церулоплазмина, гаптоглобина, С-реактивного белка, С3-фрагмента белков системы комплемента, изменения экспрессии генов молекул адгезии (CD31 увеличился на 10 %, CD54 увеличился до 24,1 % в сравнении с группой сравнения — 13,25 %).

Ключевые слова: спаечная болезнь брюшины, прогнозування, эпигеномный факторы.

EPIGENOMIC FACTORS FOR
THE DEVELOPMENT OF
PERITONEAL ADHESIONS

*V. V. Boyko, D. O. Yevtushenko,
I. V. Kryvorotko, I. A. Taraban,
D. V. Minukhin,
N. M. Voskresenska*

Summary. The etiology of the development of adhesive disease — the most common postoperative complication — can be determined by epigenomic disorders related to various links of resistance and immunogenetic control.

Purpose of the study. To study the epigenomic factors in the development of adhesive disease, the immune status of patients operated on in the abdominal cavity was studied. The comparison group included 55 patients with a complicated course of peritoneal commissural disease, the main group consisted of 59 patients operated on on the abdominal organs on the background of peritoneal commissural disease, the course of which was asymptomatic.

Results and its discussion. The revealed epigenomic factors associated with the risk of developing adhesive disease: belongs to an increase in the concentration of acute phase proteins - ceruloplasmin, haptoglobin, C-reactive protein, C3 fragment of the complement system proteins, changes in the expression of adhesion molecule genes (CD31 increased by 10 %, CD54 increased to 24.1 % in comparison with the comparison group — 13.25 %).

Conclusions. The results of our studies showed that patients with adhesive disease have a wide range of epigenome trigger factors. Epigenomic factors associated with the risk of developing adhesive disease include an increase in the concentration of acute phase proteins - ceruloplasmin, haptoglobin, C-reactive protein, C3 fragment of the complement system proteins, changes in the expression of adhesion molecule genes (CD31 increased by 10 %, CD54 increased to 24, 1 % compared with the comparison group - 13.25 %)

Key words: *adhesive disease of the peritoneum, prognosis, epigenomic factors.*