

УДК 616.381-002-089.168

## **РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА TLR-4 МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ ІЗ ВИСОКИМ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕНЬ ПРИ ГОСТРІЙ ІНТРААБДОМІНАЛЬНІЙ ПАТОЛОГІЇ**

В.Д. Шейко, Д.А. Ситнік, Р.А. Прихідько, О.А. Шкурупій, О.А. Шликова, О.В. Ізмайлова

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)

На сучасному етапі розвитку абдомінальної хірургії проблема діагностики та лікування гнійно-запальних ускладнень (ГЗУ) після первинної санації черевної порожнини займає особливе місце. Поряд із удосконаленням хірургічної техніки, розширенням показань до хірургічних втручань та збільшенням їх об'єму, ГЗУ залишаються самою частою причиною релапаротомій [1, 3, 5]. Серед загальної кількості ускладнень ГЗУ складають 48,6-77,2%, що є причиною смерті 47-89% хірургічних хворих [6, 8, 14]. Особливе значення ця проблема набуває по відношенню до хворих похилого та старечого віку, які оперовані в екстреному порядку на фоні декомпенсації супутніх захворювань [8, 10, 13]. Першочерговим завданням при лікуванні хворих із гострою інтраабдомінальною патологією (ГІАП) є раннє прогнозування та профілактика розвитку ГЗУ. В умовах лавиноподібно наростаючої інтоксикації, при ГЗУ відбувається активація експресії гена TLR-4, який активується Грам-негативною флорою, мононуклеарними клітинами периферійної крові [2, 4, 6, 9, 11, 12]. Вивчення експресії гена TLR-4 при ГЗУ дозволить оптимізувати діагностичну та лікувальну тактику.

**Мета дослідження:** вивчити рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові у післяопераційному періоді після хірургічного лікування ГІАП і оцінити його значимість при прогнозуванні розвитку ГЗУ.

**Матеріали та методи.** Рівень експресії гена TLR-4 до та після стимуляції лігандом визначали у 77 хворих. Проведено дослідження зв'язку між рівнем експресії гена TLR-4 та частотою виникнення ГЗУ після хірургічного лікування ГІАП у хворих із середнім та високим ризиком виникнення ГЗУ, згідно оригінального способу запропонованого нами [7]. При цьому 36 (46,8%) хворих склали групу із високим ступенем ризику виникнення ГЗУ після первинної санації черевної порожнини з приводу ГІАП, а 41 (53,2%) – із середнім ступенем ризику. Для порівняння динаміки рівня експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові по відношенню до  $\beta$ -актину дослідження проводили на 1 добу післяопераційного періоду, та на 4 добу післяопераційного періоду (термін максимального прояву симптомів інтраабдомінальних інфекційних ускладнень та декомпенсації супутньої патології).

Для визначення рівня експресії гена TLR4 проводили виділення загальної РНК із суспензії мононуклеарів периферійної крові до стимуляції та через 24 години після стимуляції ЛПС за допомогою комплекту реагентів «РИБО-золь-В» (AmpliSens, Росія). Для отримання кДНК в реакції оберненої транскрипції використовували праймер оліго(dT)<sub>18</sub> та обернену транскриптазу M-MuLV (SibEnzyme, Росія). Аналізували експресію генів TLR4 методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу з використанням детектувального ампліфікатора ДТ-322 («ДНК-Технология», Росія) в присутності барвника SYBR Green I, шляхом відносного кількісного аналізу. Для ПЛР використовували праймери (SibEnzyme, Росія). В якості референтного гену використовували ген  $\beta$ -актину. Для аналізу даних застосовували відносний Ct метод з розрахунком за формулою:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [6].

До дослідження включені хворі, які відповідали наступним критеріям: 1. Хворі з ГІАП, яка ускладнилася розвитком перитоніту, і потребувала в ургентному порядку ліквідації джерела перитоніту та санації черевної порожнини; 2. Вік пацієнтів від 18 до 93 років включно. Із дослідження виключено пацієнтів, у яких внаслідок декомпенсації тяжкої супутньої патології та розвитку тяжкої поліорганної недостатності, смерть настала у найближчому післяопераційному періоді (перші 1-3 доби).

Чоловіків було 43 (55,8%), жінок – 34 (44,2%). Середній вік пацієнтів становив  $53 \pm 0,97$  років. Хворі обох груп за статтю, віком, етіологічним чинником основного захворювання, причинами, які призвели до ГЗУ, тяжкістю стану, який оцінювався за допомогою шкали APACHE II, показниками Мангеймського перитоніального індексу, були порівняні.

**Результати та їх обговорення.** На першу добу після первинної санації у 32 (41,6%) хворих рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові по відношенню до  $\beta$ -актину після стимуляції лігандом був вище 1,0. З них у 28 (87,5%) хворих початково був високий ризик ГЗУ, а у 4 (12,5%) – середній. У 45 (58,4%) рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові по відношенню до  $\beta$ -актину після стимуляції лігандом був менше 1,0. При цьому у 8 (17,8%) хворих початково був високий ризик ГЗУ, а у 37 (82,2%) – середній. Серед пацієнтів, у яких був високий ризик виникнення ГЗУ, рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові по відношенню до  $\beta$ -актину після стимуляції лігандом був у 28 раз вище порівняно з таким у здорових донорів (табл. 1).

При цьому, рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові по відношенню до  $\beta$ -актину після стимуляції лігандом у хворих із середнім ступенем ризику виникнення ГЗУ, суттєво не збільшувався порівняно з групою здорових донорів (табл. 1).

Таблиця 1

**Рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові у пацієнтів із гострими інтраабдомінальними захворюваннями на першу добу після оперативного втручання**

Групи хворих	Здорові донори, n = 10	Проспективна підгрупа	
		Середній ступінь ризику ГЗУ, n = 41	Високий ступінь ризику ГЗУ, n = 36
Рівень експресії гена TLR-4	1	4 $p_1 > 0,25$	28 $p_1 < 0,001$

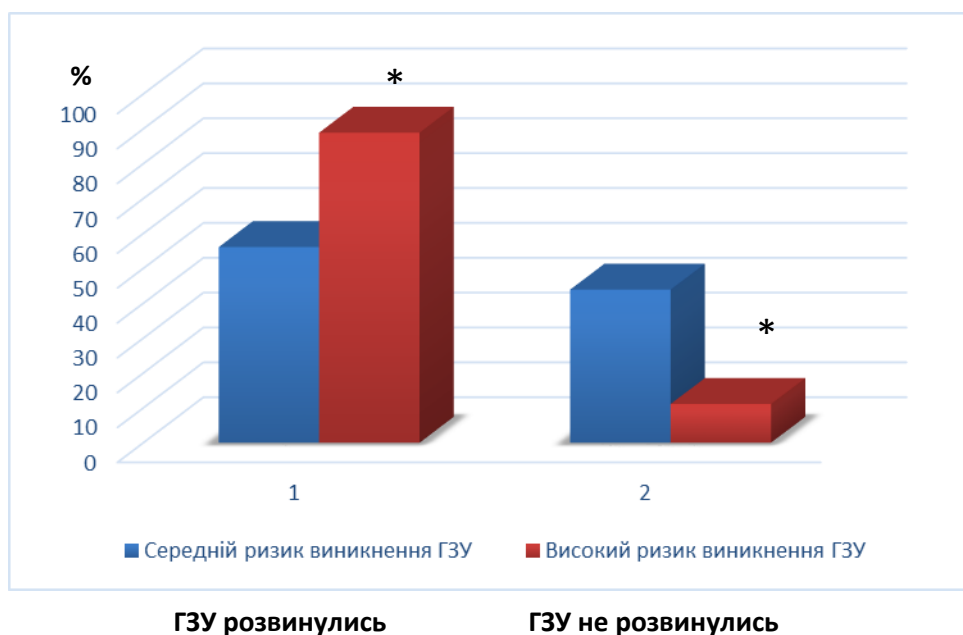
більше 1,0		$p_2 < 0,05$	
Рівень експресії гена TLR-4 менше 1,0	9	37 $p_1 > 0,25$ $p_2 < 0,05$	8 $p_1 < 0,05$

Примітки:

1.  $p_1$  – показник вірогідних відмінностей результатів порівняно зі значеннями здорових донорів.
2.  $p_2$  – показники вірогідних відмінностей результатів порівняно з високим ступенем ризику.

Період максимального прояву симптомів ГЗУ та декомпенсації супутніх захворювань, які спостерігаються за власними спостереженнями, згідно даних, отриманих при аналізі ретроспективної групи хворих, переважно на 3-5 добу після первинного оперативного втручання з приводу ГІАП, були визначені як «контрольний період». Якраз у цей період проводили основну частину діагностичних заходів.

На четверту добу після первинної санації черевної порожнини серед пацієнтів, у яких на основі використаної нами прогностичної шкали, встановлено високий ступінь ризику; незважаючи на проведенне адекватне лікування, ГЗУ розвинулись у 32 (88,9%) хворих. При цьому лише у 4 (11,1%) пацієнтів ГЗУ не розвинулись (рис. 4.1).



**Рис. 1. Частота виникнення гнійно-запальних ускладнень у хворих із гострими інтраабдомінальними захворюваннями (четверта доба).**

1. - \* - вірогідні відмінності між групами ( $\chi^2$ ).

У підгрупі з початковим середнім ступенем ризику ГЗУ у 23 (56,1%) хворих виникли ГЗУ. При цьому у 18 (43,9%) ГЗУ не розвинулись.

На четверту добу після первинної лапаротомії відмічались суттєві зміни рівня експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові (табл. 2).

Таблиця 2

**Рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові у пацієнтів із гострими інтраабдомінальними захворюваннями на четверту добу після оперативного втручання**

Групи хворих	Здорові донори, n = 10	Проспективна підгрупа			
		Середній ступінь ризику ГЗУ, n = 41		Високий ступінь ризику ГЗУ, n = 36	
		Розвинулись, n = 23	Не розвинулись, n = 18	Розвинулись, n = 32	Не розвинулись, n = 4
Рівень експресії гена TLR-4 більше 1,0	1	21 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	0 $p_1 > 0,25$ $p_2 < 0,002$	31 $p_1 < 0,001$	0 $p_1 > 0,25$

Рівень експресії гена TLR-4 менше 1,0	9	2 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$	18 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,002$	1 $p_1 < 0,002$	4 $p_1 > 0,25$
---------------------------------------	---	-----------------------------------	-------------------------------------	--------------------	-------------------

Примітки:

1.  $p_1$  – показник вірогідних відмінностей результатів порівняно зі значеннями здорових донорів.
2.  $p_2$  – показники вірогідних відмінностей результатів порівняно з високим ступенем ризику.

Аналізуючи кількісні показники рівня експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові, слід відзначити, що серед пацієнтів із високим ризиком ГЗУ і у яких розвинулись ГЗУ відмічалось суттєве збільшення частоти експресії гена TLR-4 до 95% у порівнянні зі здоровими донорами (табл. 4,7). При цьому в підгрупі, де не розвинулись ГЗУ, частота рівня експресії гена TLR-4 лишалась на рівні групи донорів.

Дослідження рівня експресії гена TLR-4 при середньому ступеню ризику показало, що у хворих, у яких на четверту добу розвинулись ГЗУ спостерігалось збільшення цього показника до 95%. При сприятливому перебігу післяопераційного періоду рівень експресії гена TLR-4 лишався на рівні здорових донорів (табл. 4.7).

Виявлена позитивна кореляція між частотою підвищення рівня експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові після стимуляції лігандом та формування ГЗУ у пацієнтів з ГІАП ( $r = 0,86$ ).

Встановлено, що підвищений рівень експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові після стимуляції лігандом може свідчити про генетично детермінований високий ризик розвитку ГЗУ.

## **Висновки.**

1. Дослідження експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові в динаміці післяопераційного періоду після хірургічного втручання з приводу ГІАП дає змогу оцінити адекватність проведеного лікування та індивідуалізувати вибір лікувальної тактики.
2. Активація експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові може бути використана у якості критерію прогнозування несприятливого перебігу післяопераційного періоду у хворих з високим та середнім ризиком розвитку ГЗУ і дозволяє своєчасно корегувати тактику їх лікування.

## **Перелік літератури.**

1. Гаин Ю.М. Проблема абдоминального сепсиса в хирургии: диагностика, оценка тяжести, прогнозирование / Ю.М. Гаин, С.А. Алексеев, В.Г. Богдан // Белорусский медицинский журнал. – 2003. – №2., С. 18 – 21.
2. Должковий С.В. Експресія та поліморфізм tlr-4 у пацієнтів за тяжкої форми гострого панкреатиту / С.В. Должковий // Клінічна хірургія. – 2012. – № 10 (Додаток). – С. 19.
3. Каминский И.В. Послеоперационный перитонит / И.В. Каминский, Н.Н. Торотадзе // Клінічна хірургія. – 2008. - № 11-12. – С. 43.
4. Келина Н.Ю. Изменения гематологических показателей в реактивной стадии разлитого перитонита в ранний послеоперационный период / Н.Ю. Келина, Н.В. Безручко, Е.Р. Кулюцина // Вестник интенсивной терапии. - 2002. - №2. - С. 32 - 35.
5. Лупальцов В.И. Миниинвазивные методы лечения гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений у больных при разлитом перитоните / В.И. Лупальцов, А.И. Ягнюк, Р.С. Ворощук, И.А. Дехтярук // Клінічна хірургія. – 2012. - № 10. – С. 5 – 7.

6. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму / М.А. Андрейчин, М.Д. Бех, В.В. Дем'яненко [і співавт.]. - Методичні рекомендації: МОЗ України, Київ. 1998. - С.1 - 31.
7. Пат. 63558 Україна, МПК А61В 5/0205, А61В 10/00. Спосіб прогнозування розвитку післяопераційного перитоніту при гострій абдомінальній патології / Шейко В.Д., Ситнік Д.А., Прихідько Р.А.; заявник та патентовласник Вищий державний навчальний заклад України "Українська медична стоматологічна академія", м. Полтава. - № у 201103682; заявл. 28.03.2011; опубл. 10.10.2011. – Бюл. № 19, 2011.
8. Савельев В.С. Перитонит. // Под редакцией Савельева В.С., Гельфанда Б.Р., Филимонова М.И. – 2006. – Москва, Литтерра. – 208 с.
9. Barber R.C. Characterization of a single nucleotide polymorphism in the lipopolysaccharide binding protein and its association with sepsis / R.C. Barber, G.E. O'Keefe // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003. V. 167. P. 1316 – 1320.
10. Damianov D. Postoperative peritonitis / Damianov D., Aleksandrova A., Nedin D. // Khirurgiia (Sofia). – 1996. - 49:2. - P21—23.
11. Linder M.M. Der Mannheimer Peritonitis-Index. An instrument for the intraoperative prognosis of peritonitis / Linder M.M., Washa H., Feldmann U. // Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin. - 1987. - Vol.58. №2. - P.84 - 92.
12. Moldawer L.L. Emerging evidence of a more complex role for proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the sepsis response / L.L. Moldawer, R.M. Minter, J.E. Rectenwald // P. 145-154. in: Multiply organ failure: pathophysiology, prevention, and therapy. Ed. by A.E. Baue, E. Faist, D.E. Fry. Springer-Verlag New York, 2000, 697 p
13. Rakoff-Nahoum S. Recognition of commensal microflora by TLRs is required for intestinal homeostasis / S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh [et al.] // Cell. – 2004. – Vol. 118. – P. 229-241.
14. Wittman D.H. Management of secondary peritonitis. / Wittman D.H., Schein M., Condon R.E. // Ann Surg. – 1996. – Vol.224: 1: 10. – P.18.



## РЕЗЮМЕ

### РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА TLR-4 МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ ІЗ ВИСОКИМ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕНЬ ПРИ ГОСТРІЙ ІНТРААБДОМІНАЛЬНІЙ ПАТОЛОГІЇ

В.Д. Шейко, Д.А. Ситнік, Р.А. Прихідько, О.А. Шкурупій, О.А. Шликова,  
О.В. Ізмайлова

Проведено дослідження рівня експресії гена TLR-4 мононуклеарами периферійної крові у 77 хворих, які оперовані з приводу гострої інтраабдомінальної патології, на 1-шу та 4-ту добу післяопераційного періоду. Встановлено динамічні зміни у післяопераційному періоді рівня експресії гена TLR-4 у хворих із гострою інтраабдомінальною патологією. Несприятливий перебіг раннього післяопераційного періоду у пацієнтів з початковим високим і середнім ступенем ризику виникнення гнійно-септичних ускладнень супроводжується активацією експресії гена TLR-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові.

Ключові слова: гнійно-септичні ускладнення, гостра інтраабдомінальна патологія, рівень експресії гена TLR-4.

## SUMMARY

### THE LEVEL OF EXPRESSION GENE TLR-4 BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH HIGH RISK OF DEVELOPMENT PURULENT-INFLAMMATORY COMPLICATIONS IN ACUTE INTRA-ABDOMINAL PATHOLOGY

V.D. Sheyko, D.A. Sytnik, R.A. Pryhidyko, A.A. Shkurupy, O.A. Shlykova,  
O.V. Izmaylova

Investigated the level of expression gene TLR-4 by peripheral blood mononuclear cells in 77 patients who were operated on for acute intra-abdominal pathology, on the 1st and 4th postoperative day. Installed dynamic changes in the postoperative period, the level of expression of TLR-4 in patients with acute intra-abdominal pathology. Unfavorable during the early postoperative period in patients with initially high and medium risk of purulent-

septic complications is accompanied by activation of expression gene TLR-4 mononuclear cells of peripheral blood.

The keywords: purulent-septic complications, acute intra-abdominal pathology, level of expression gene TLR-4.