

© Коллектив авторов, 2017

УДК 616.381-002-06.236-092.9: 611.018.74

Терещенко О.А.¹, Боташев А.А.¹, Помещик Ю.В.³, Сергиенко В.И.², Петросян Э.А.¹

Состояние эндотелия сосудов при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом

¹ — ФГБОУ ВО МЗ РФ «Кубанский государственный медицинский университет», 350063, г. Краснодар, ул. Седина, д.4² — ФГБУ «Научно-клинический центр физико-химической медицины», ФМБА России, 119435, г. Москва, Малая Пироговская, д.1а³ — Институт молекулярных наук им. А.И. Виртанена, Университет Восточной Финляндии (P.O. Box 1627, 70211, г. Куопио, Финляндия)

Цель исследования — изучение механизма развития эндотелиальной дисфункции (ЭД) при экспериментальном желчном перитоните (ЖП), осложненном абдоминальным сепсисом. **Методика.** Эксперименты выполнены на 24 собаках массой $13,7 \pm 1,2$ кг. Животные разделены на 2 группы. В контрольную группу для определения лабораторных показателей нормы включено 24 собаки, из которых 4 были выведены из опыта после забора желчи из желчного пузыря. В основную группу вошло 20 оставшихся животных с моделью 24-часового ЖП, осложненного абдоминальным сепсисом. Суть модели заключалась в предварительном создании очага деструкции мягких тканей на наружной поверхности тазовой конечности, путем внутримышечного введения 10% раствора CaCl_2 из расчета 0,25 мл/кг. Через 48 ч после создания очага деструкции в брюшную полость трижды, через каждые 8 ч вводили полученную от животных желчь из расчета 1,5 мл/кг. В крови определяли количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) [8], содержание метаболитов оксида азота (NO) [8], уровень фактора Виллебранда (vWF) и эндотелина-1 (Et-1) методом ИФА с использованием наборов («Cusabio Biotech» Canine Elisa Assay Kit). **Результаты.** В ходе исследования установлено повышение количества ДЭ в крови в 3,25 раза, Et-1 в 1,55 раза, vWF в 1,3 раза и продукции NO в 1,37 раза относительно контроля. **Заключение.** Получены убедительные данные, что в ранние сроки развития экспериментального желчного перитонита, осложненного абдоминальным сепсисом, происходит нарушение структурно-функциональной организации эндотелия сосудов, являющееся отражением системной воспалительной реакции с появлением в крови высокоспецифичных маркеров эндотелиальной дисфункции, которые можно рассматривать в качестве нового направления диагностики в абдоминальной хирургии.

Ключевые слова: желчный перитонит, абдоминальный сепсис, эндотелиальная дисфункция.

Для цитирования. Терещенко О.А., Боташев А.А., Помещик Ю.В., Сергиенко В.И., Петросян Э.А. Состояние эндотелия сосудов при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 78—81.

Для корреспонденции: Петросян Эдуард Арутюнович, доктор мед. наук, проф. каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ, e-mail: superego_ksmu@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 23.06.2016

Tereschenko O.A.¹, Botashev A.A.¹, Pomeschik U.V.³, Sergienko V.I.², Petrosyan E.A.¹

State vascular endothelium in experimental biliary peritonitis, a complication of abdominal sepsis

¹ — Federal State Educational Establishment Higher Education Ministry of Health of the Russian Federation «Kuban State Medical University», 350063, Krasnodar, Sedin, 4² — Federal State Institution «Scientific-Clinical Center of Physical-Chemical Medicine» FMBA Russia, 119435, Moscow, Malaya Pirogov, 1a³ — Institute for Molecular Sciences them. Al Virtanen, University of Eastern Finland (P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland)

The purpose of research — to study the mechanism of the development of endothelial dysfunction (ED) in experimental bile peritonitis (DGP), complicated abdominal sepsis. **Methods.** The experiments were performed on 24 dogs, weighing $1,2 \pm 13,7$ kg. The animals were divided into 2 groups. In a control group to determine the rate of laboratory parameters included 24 animals, of which 4 were derived from the experience of collection of bile from the gallbladder. The study group included 20 remaining animals with a model 24-hour gallbladder complicated with abdominal sepsis. The essence of the model was to create pre-chamber soft tissue destruction in the outer surface of the pelvic limbs, by intramuscular injection of 10% CaCl_2 solution at the rate of 0.25 ml/kg. At 48 hours after creation chamber in the abdominal cavity degradation thrice after every 8 hours the animals received it introduced bile rate of 1.5 ml/kg. The blood was determined by the number of desquamated endothelial cells (DE) [8], the content of nitric oxide metabolites (of NO) [8], the level of von Willebrand

factor (of vWF) and endothelin-1 (of Et-1) ELISA using kits («Cusabio Biotech» Canine Elisa Assay Kit). **Results.** During the study animals with a 24-hour JP, abdominal sepsis complicated by increasing the number set in the blood of 3.25 times DE, Et-1 1.55 times, vWF and 1.3 times the NO production in 1.37 times the animal group intact. **Conclusion.** There is good evidence that in the early stages of development of experimental bile peritonitis, complicated abdominal sepsis, there is damage to the structural and functional organization of the vascular endothelium, which are a reflection of the systemic inflammatory response with the appearance in the blood of highly specific markers of endothelial dysfunction, which can be regarded as a new diagnostic areas in the abdominal surgery.

Keywords: bile peritonitis, abdominal sepsis, endothelial dysfunction.

For citation. Tereshchenko O.A., Botashev A.A., Pomeschik Y.V., Sergienko V.I., Petrosyan E.A. Status of vascular endothelium in experimental bile peritonitis, complicated abdominal sepsis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (1): 78—81. (in Russ.).*

For correspondence: Edward A. Petrosyan, Dr. med., professor of topographic anatomy and operative surgery Federal State Educational Establishment Higher Education Ministry of Health of the Russian Federation «Kuban State Medical University» Health Ministry; e-mail: superego_ksmu@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Received 23.06.2016

Введение

Проблема желчного перитонита актуальна на фоне мировой тенденции роста количества больных с желчнокаменной болезнью, которой страдают 10—15% населения земного шара [1—3]. В мире ежегодно выполняется до 2,5 млн операций при желчнокаменной болезни. Большинство операций проводится лапароскопически, осложнения, при которых встречаются в 1,5 раза чаще, чем при открытых операциях. Одним из серьезных осложнений при лапароскопических операциях является желчный перитонит, который встречается в 0,5% случаев, но летальность при этом осложнении достигает 10—34% [4—6].

В основе неудачных результатов лечения перитонита лежит эндотелиальная дисфункция, которая является одним из универсальных механизмов в патогенезе многих заболеваний. Одновременно стали появляться статьи, в которых ставится вопрос: «Почему в течение первых 5 лет после перенесенного перитонита в молодом возрасте у 35% пациентов внезапно возникают различные сердечно-сосудистые заболевания, из которых 65% пациентов умирают от их осложнений в течение 10 лет?» [7]. Изучение механизмов развития эндотелиальной дисфункции при экспериментальном желчном перитоните представляет особый интерес в диагностике и профилактике развития сердечно-сосудистых осложнений в абдоминальной хирургии.

Цель исследования — изучение механизма развития эндотелиальной дисфункции при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом.

Методика

Эксперименты выполнены на 24 собаках, массой $13,7 \pm 1,2$ кг. Животные были разделены на 2 группы. В контрольную группу для определения лабораторных показателей нормы включены 24 собаки, из которых 4 были выведены из опыта после забора желчи из желчного пузыря. В основную группу вошли 20 оставшихся животных с моделью 24-часового желчного перитонита. Суть модели заключалась в предварительном создании очага деструкции мягких тканей на наружной поверхности тазовой конечности, путем внутримышечного введения 10% раствора хлорида кальция из расчета 0,25 мл/кг. Через 48 ч после создания очага деструкции в брюшную полость трижды вводили полученную у животных желчь из расчета 1,5 мл/кг. Введение желчи осуществляли через каждые 8 ч.

В крови определяли количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) [8], содержание метаболитов оксида азота (NO) [8], уровень фактора Виллебранда (vWF) и эндотелина-1 (Et-1) методом ИФА с использованием наборов («Cusabio Biotech» Canine Elisa Assay Kit) для лабораторной диагностики у собак в соответствии с протоколами фирмы разработчика на аппарате Stat Fax 4200 (США). Исследования проводили до и после воспроизведения у животных желчного перитонита. Исследования проводились в соответствии с основными правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Министерства соцразвития России №708н от 23.08.2010 г. и принципами Хельсинской Декларации Всемирной медицинской ассоциации 1989 г.

Статистический анализ выполнен в программе «Statistica 6.0 for Windows». Оценку статистической значимости различий для нормально распределенных признаков проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для выяснения взаимосвязей между показателями применялся метод корреляционного анализа по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Состояние животных с 24-часовым желчным перитонитом было охарактеризовано как тяжелое. При лапаротомии в брюшной полости определялось до 200—250 мл мутного серозно-фибринозного выпота с примесью желчи с запахом кишечной палочки, что может быть результатом транслокации микроорганизмов из просвета кишечника в брюшную полость с развитием портальной бактериемии (абдоминального сепсиса) [10]. При макроскопическом осмотре брюшина тусклого цвета, отечна с множественными очагами геморагии, покрытыми фибрином.

Общеизвестно, что мишенями флоготенных цитокинов в крови при острых хирургических заболеваниях в первую очередь являются эндотелиоциты сосудистой стенки [11].

В ходе исследования у животных с 24-часовым желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом, установлено статистически значимое повышение количества десквамированных эндотелиоцитов в плазме крови (в 3,25 раза относительно животных интактной группы) и уровня эндотелина-1 в 1,55 раза (см. таблицу).

Увеличение количества десквамированных эндотелиоцитов может быть результатом повреждения эндотелия сосудов, в то время, как повышение концентрации эндотелина-1, направленно на регулирование процессов неоангиогенеза сосудов в ответ на повреждение эндотелия. Подобное объяснение находит подтверждение в работе [12], в которой указывается, что эндотелин-1 образуется под действием многих факторов (активные формы кислорода, адреналин, тромбин, ангиотензин, вазопрессин) и секретируется

в толщу сосудистой стенки, где расположены специфические высокоаффинные рецепторы.

Все вещества, секретируемые эндотелием и участвующие в гемостазе и тромбозе, можно, в известной степени условно, разделить на 2 группы — тромбогенные и атромбогенные. К тромбогенным веществам, инициирующим адгезию и агрегацию тромбоцитов, относится фактор Виллебранда [13], который связывает субэндотелиальный коллагеновый матрикс и тромбоцитарный рецептор и, таким образом, обеспечивает прикрепление тромбоцитов к поврежденному участку эндотелия сосудистой стенки [14].

Так, у животных с экспериментальным желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом, отмечается статистически значимое повышение содержания фактора Виллебранда в плазме крови (в 1,3 раза) относительно животных интактной группы (таблица), что может служить маркером эндотелиальной дисфункции и повышенного риска тромбообразования. При проведении корреляционного анализа у животных с желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом, установлена сильная прямая корреляционная связь между количеством десквамированных эндотелиоцитов и уровнем эндотелина-1 с одной стороны, и концентрацией фактора Виллебранда ($r = 0,88, p < 0,001$ и $r = 0,76, p < 0,01$), с другой, что свидетельствует о патогенетической зависимости факторов повреждения эндотелия сосудистой стенки от концентрации фактора Виллебранда, который способствует уменьшению проницаемости сосудов, путем адгезии тромбоцитов к эндотелию.

Таким образом, указанные факторы могут служить маркерами подтверждения эндотелиальной дисфункции при желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом и отражать степень прогрессирования заболевания и его прогноз.

Общеизвестно, что эндотелиальные клетки чувствительны к различным повреждающим факторам (свободные радикалы, воспалительные цитокины и др.). Наиболее вероятным механизмом, повреждающим в эндотелии при перечисленных негативных факторах, является активация синтеза индуцибельной NO-синтазы нейтрофилами/макрофагами в ответ на инфекцию [15].

Таблица

Исследуемые показатели контрольных животных и животных основной группы с экспериментальным желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом

Исследуемые показатели	Исследуемые группы животных	
	Контрольная группа	Основная группа
ДЭ, $\times 10^4$ /л	$3,2 \pm 0,2$	$10,4 \pm 0,7^*$
Et-1, пг/мл	$31,1 \pm 1,6$	$48,2 \pm 2,3^*$
vWF, хМЕ/мл	$1,39 \pm 0,2$	$1,84 \pm 0,1^*$
NO, мкмоль/л	$3,88 \pm 0,10$	$5,30 \pm 0,18^*$

Примечание. * — статистически значимые отличия от показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

В ходе исследования у животных с экспериментальным желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом установлено статистически значимое увеличение продукции оксида азота в крови (в 1,37 раза) относительно животных контрольной группы (таблица). Полученный результат можно объяснить, как активацией индуцибельной NO-синтазы макрофагами/нейтрофилами при транслокации микрофлоры из просвета тонкой кишки в брюшную полость и далее в кровяное русло, так и реакцией париетальной брюшины на рефлекторную боль вызванную введением желчи в брюшную полость. Не исключено, что гиперпродукция оксида азота с одной стороны, направлена на уничтожение микрофлоры и окисление токсинов, а с другой стороны — на ингибирование экспрессии тканевого фактора, молекул клеточной адгезии, агрегации тромбоцитов и каскадных расстройств в системе гемостаза. При проведении корреляционного анализа у животных с желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом установлена сильная прямая корреляционная связь между содержанием оксида азота и уровнем эндотелина-1 в крови ($r = 0,82$, $p < 0,001$), что может свидетельствовать о запуске механизма нейтрализации болевого вазоконстрикторного эффекта эндотелина-1, вазодилататорным эффектом оксида азота. Все это указывает, что гиперпродукция оксида азота, не только отражает процессы, происходящие в очаге повреждения эндотелия сосудов, но и влияет на выраженность воспалительного процесса и исход заболевания.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в ранние сроки развития экспериментального желчного перитонита, осложненного абдоминальным сепсисом, происходит повреждение структурно-функциональной организации эндотелия сосудов, являющееся отражением системной воспалительной реакции с появлением в крови высокоспецифичных маркеров эндотелиальной дисфункции, которые можно рассматривать в качестве нового направления диагностики в абдоминальной хирургии.

Сведения об авторах:

Терещенко Олег Анатольевич, доктор мед. наук, доцент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

Боташев Алибек Амырбиевич, доктор мед. наук, каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

Помещик Юрий Владимирович, канд. мед. наук, науч. сотр. Института молекулярных наук им. А.И. Виртанена, Университет Восточной Финляндии (Куопио, Финляндия)

Сергиенко Валерий Иванович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, научный руководитель ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва

References

- Galperin E.I., Vetshev P.S. *Guidelines for biliary tract surgery*. Moscow: Vidar; 2006. (in Russian)
- Vetshev P.S. *Guidelines for biliary tract surgery*. Moscow: Vidar; 2006. (in Russian)
- Grigorieva I.N., Malyutina S.K., Voevoda M.I. Role of hyperlipidemia in cholelithiasis. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2010; 4: 64-8. (in Russian)
- Bagnenko S.F., Mosyagin V.B., Karpova E.A. Bile peritonitis as a complication of laparoscopic cholecystectomy. *Endoscopic surgery*. 2000; 2: 6-7. (in Russian)
- Kurbonov K.M., Daminova N.M., Abdulloev D.A., Isoev A.O. Surgical treatment of patients with complicated forms of cholelithiasis. *Surgery*. 2007; 8: 38-2. (in Russian)
- Amorotti C., Mosca D., Di Blasio P. Spontaneous and postoperative bile peritonitis. Surgical technique. *Minerva Chir*. 2002; 57(1): 41-9.
- Savelyev V.S., Petukhov V.A. Endothelial dysfunction: state of the art. *Surgery*. 2008; 1: 3-11. (in Russian)
- Petrishchev N.N. *Endothelial dysfunction. Causes, mechanisms pharmacological correction* / under. Ed. N.N. Petrishcheva. St. Petersburg. 2003; 184. (in Russian)
- Golikov P.P., Nikolaeva N.Yu., Gavrilenko I.A. et al., Nitric oxide and lipid peroxidation as factors of endogenous intoxication in case of emergency. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2000; 2: 6-9. (in Russian)
- Botashev A.A., Tereshchenko O.A., Petrosyan E.A. Status of the bacterial ecosystem of the small intestine in animals with experimental bile peritonitis. *Journal of intensive care*. 2012; 5: 5-7. (in Russian)
- Abakumov M.M., Bulova G.V., Borovkova M.V., Grabbing V.B. Clinical evaluation of immune parameters in surgical patients with systemic inflammatory response syndrome. *Surgery*. 2007; 8: 24-8. (in Russian)
- Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Physiology and pathophysiology of endothelium. *Endothelial dysfunction. Causes, mechanisms pharmacological correction* / under. Ed. N.N. Petrishcheva. St. Petersburg. 2003; 32-7. (in Russian).
- Andreotti F., Roncaglioni C., Hackett D.R. et al. Early coronary reperfusion blunts the procoagulant response of plasminogen activator inhibitor-1 and von Willebrand factor in acute myocardial infarction. *J. Amer. Coll. Cardiology*. 1990; 16: 1553-60.
- Haines A.P., Howarth D., North W.R.S. et al. Haemostatic variables and the outcome of myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 1983; 50: 800-3.
- Nathan C, Xie Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 13725-8.