

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ»**

ЦИМБАЛА ОКСАНА ПЕТРІВНА

УДК 616.366-002-036.11-06:616.94]-07

**ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ ТА ПОКАЗНИКІВ
ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ПРИ ГОСТРОМУ ХОЛЕЦИСТИТІ,
УСКЛАДНЕНОМУ СЕПСИСОМ**

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Тернопіль – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Лаповець Любов Євгенівна, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Іскра Руслана Ярославівна**, Інститут біології тварин НААН, заступник директора інституту з наукової роботи;

кандидат біологічних наук, доцент **Яремчук Ольга Зеновійвна**, Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», доцент кафедри медичної біохімії.

Захист відбудеться «22» березня 2017 р. о 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 Державного вищого навчального закладу «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» за адресою: 46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Державного вищого навчального закладу «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» за адресою: 46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розісланий «21» лютого 2017 р.

**Учений секретар
спеціалізованої вченої ради**

Т.Я. Ярошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Запальні процеси у жовчному міхурі та жовчовивідних шляхах залишаються однією з важливих медико-біологічних проблем. За даними ВООЗ, кількість хворих із різною патологією гепатобіліарної системи перевищує 2 млрд осіб (Щербинина М. Б., 2008; Філіпов Ю. О., 2010). Про зростання цієї патології у світі свідчать статистичні дані останніх 10–20 років (Ковальчук Л. Я., 2014; Скирда І. Ю. та співавт., 2015; Семенюк Ю. С. та співавт., 2016). Незважаючи на вагомі досягнення у вивченні факторів патогенезу запальних процесів у жовчовивідній системі печінки, захворюваність на гострий калькульозний холецистит в Україні, як і в цілому світі, за останні роки збільшилась і становить у середньому 6,27 на 10 тис. населення (Бикова-Труедсон Н. І. 2010; Степанов Ю. М. та співавт., 2015; Young Choi et al., 2014) та має тенденцію до зростання (Павловський М. П. та співавт., 2011; Скирда І. Ю. та співавт., 2015).

Враховуючи значну поширеність гострого холециститу та його гнійно-септичних ускладнень, недостатньою є ефективність існуючих методів запобігання поширенню ендогенної інтоксикації при даній патології. Актуальним залишається пошук ефективних та безпечних засобів нормалізації детоксикаційної функції печінки (Велиев Н. А., 2011; Терещенко О. А., Боташев А. А., 2013; Муминов С. С., 2015; Karez M. et al., 2012). Аналіз гнійно-септичних ускладнень патології жовчовивідних шляхів залишається відкритим питанням та остаточно не вирішеною науковою проблемою (Білокий В. В. та співавт., 2011; Петросян Є. А. та співавт., 2015; Сергиенко В. И. и соавт., 2016; Hitoshi M., Osamu Y., 2012; Dellinge R. P. et al., 2013).

Проблема гнійно-септичних ускладнень гострого калькульозного холециститу зумовлює необхідність пошуку нових та вдосконалення існуючих схем лікування, цілеспрямованої корекції при метаболічних зрушеннях і критичних процесах, які спричиняють розвиток ендогенної інтоксикації, а також пошуку принципово нових методів обстеження та прогнозування наслідків патологічного процесу (Костес А. А., 2010; Марущак М. І., 2011; Петросян Є. А. і співавт., 2016; Fira L. S. et al., 2012). Хоча сучасні біохімічні дослідження дозволяють ефективно охарактеризувати функціональний стан організму при гнійно-септичних ускладненнях гострого калькульозного холециститу, ціла низка публікацій свідчить про те, що оксид азоту є одним із найважливіших медіаторів та регуляторів, які беруть участь у розвитку як фізіологічних, так і патологічних процесів, виконують прозапальну та протизапальну функції (Бабак О. Я., 2008; Сибірна Н. О. та співавт., 2010; Коцюрuba А. В. та співавт., 2011; Rizvi M. R. et al., 2012).

Незважаючи на численні наукові дослідження, залишається багато невирішених питань, виникає необхідність глибше вивчити біохімічні механізми між станом ендогенної інтоксикації та з'ясувати роль оксиду азоту як важливого регулятора метаболічних процесів (Бондзик О. В., 2010; Яремчук О. З., Куліцька М. І., 2012; Олешук О. М., 2014; Bui-Nguyen T. M. et al., 2010; Nathan I. Sharico et al., 2010; Mathes A. M., 2010; Spratt D. E. et al., 2011). Згідно із сучасними дослідженнями, оксид азоту з участю синтазної системи здатен впливати на активність ендогенних систем організму (Ярошенко Т. Я., 2007; Іскра Р.Я., 2012; Hirst D. G., 2011; Rafikov R. et al., 2011; Feng C. et al., 2012; Forstermann U., 2012; Petryl J., 2013).

Питання щодо ролі системи оксиду азоту в патогенезі ендогенної інтоксикації, зокрема при гнійно-септичних ускладненнях гострого калькульозного холециститу, залишається маловивченим. Оскільки синтазна система оксиду азоту представлена трьома ізоформами: індукцибельною та конститутивними (нейрональною, ендотеліальною), важливо з'ясувати NO-залежні механізми синтезу оксиду азоту. Дія оксиду азоту на біологічні процеси залежить від його кількості (Посохова К. А. та співавт., 2010; Олещук О. М., 2012; Яремчук О. З., 2013; Sิริussawakul A. et al., 2010; Suzuki T. et al., 2011; Chakrabarti S. et al., 2012), тому актуальним є вивчення регуляторної ролі синтазної системи оксиду азоту, яка здебільшого залежить від активності її індукцибельної ізоформи. Таким чином, особливий інтерес викликають з'ясування участі системи оксиду азоту в патогенезі ендогенної інтоксикації при гнійно-септичних ускладненнях гострого калькульозного холециститу та встановлення біохімічних змін, які при цьому виникають.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної теми кафедри клінічної лабораторної діагностики і кафедри хірургії та ендоскопії факультету післядипломної освіти Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України «Розробка диференційної тактики діагностики, лікування і профілактики моно- і поліорганної недостатності при гострих абдомінальних захворюваннях і травмах» (№ держреєстрації 11U002149). Дисертантка є співвиконавцем даної теми. Тема дисертації затверджена вченою радою факультету післядипломної освіти Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України (протокол від 19 квітня 2011 р. № 49-11).

Мета дослідження: з'ясувати зміни активності синтазної системи оксиду азоту та показників ендогенної інтоксикації при гнійно-септичних ускладненнях (холедохолітіазі, холангіті, жовчному перитоніті (сепсисі)) гострого калькульозного холециститу.

Завдання дослідження:

1. Встановити характерні зміни активності синтазної системи оксиду азоту у хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітіазом, холангітом, жовчним перитонітом (сепсисом), у динаміці захворювання.

2. Дослідити рівень стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит-аніон, нітрат-аніон) та вміст сечовини на тлі розвитку ендогенної інтоксикації у хворих на гострий калькульозний холецистит із гнійно-септичними ускладненнями у динаміці захворювання.

3. Визначити гематологічні показники (загальну кількість лейкоцитів, лейкоформулу, лейкоцитарні індекси) у периферійній крові хворих на гострий калькульозний холецистит із гнійно-септичними ускладненнями у динаміці захворювання.

4. Визначити біохімічні показники (рівень загального білірубіну та його фракцій, загального білка, альбуміну, активність аспартат- і аланінамінотрансферази, молекул середньої маси, прокальцитоніну, циркулюючих імунних комплексів та імуноглобулінів А, G, M) у сироватці крові хворих на гострий калькульозний холецистит із гнійно-септичними ускладненнями у динаміці захворювання.

5. Визначити кореляційні взаємозв'язки між показниками ендogenous інтоксикації, активністю ферментів синтазної системи оксиду азоту, та їх ізоформ і метаболітів оксиду азоту у хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітіазом, холангітом, жовчним перитонітом (сепсисом).

Об'єкт дослідження: біохімічні процеси за гнійно-септичних ускладнень гострого калькульозного холециститу.

Предмет дослідження: активність синтазної системи оксиду азоту, гематологічні та біохімічні маркери ендogenous інтоксикації при гнійно-септичних ускладненнях гострого калькульозного холециститу.

Методи дослідження: біохімічні (визначення активності ферментів та вмісту метаболітів), імунологічні (визначення показників гуморального імунітету), мікроскопічні (дослідження морфологічних показників крові), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті комплексного дослідження ролі синтазної системи оксиду азоту в патогенезі гнійно-септичних ускладнень (холедохолітіазу, холангіту, жовчного перитоніту (сепсису)) гострого калькульозного холециститу вперше встановлено, що наростання ендogenous інтоксикації супроводжується активацією сумарної синтази оксиду азоту завдяки її індукційній ізоформі, зростанням стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит-аніон, нітрат-аніон) та пригніченням конститутивного синтезу синтази оксиду азоту. Показано, що динаміка змін активності синтазної системи оксиду азоту та його сполук (нітрит-аніон, нітрат-аніон) залежить від тяжкості ускладнення гострого калькульозного холециститу. Проаналізовано та поглиблено вивчено дані, що вказують на участь оксиду азоту як патогенетичного фактора в розвитку гнійно-септичних ускладнень. Встановлено, що на тлі ендogenous інтоксикації у хворих на гострий калькульозний холецистит гіперпродукування оксиду азоту переважно відбувається в результаті стимулювання ендотоксинами ферменту індукційної синтази оксиду азоту. Вперше виявлено, що у хворих на гострий калькульозний холецистит активність синтазної системи оксиду азоту змінюється у відповідь на генералізацію патологічного процесу, що підтверджує можливість прогнозування ускладнень при даній патології. Доведено клініко-діагностичне значення визначення активності синтазної системи та рівня стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит-аніон, нітрат-аніон) в динаміці перебігу гострого калькульозного холециститу і використання як додаткового показника для оцінки розвитку гнійно-септичних ускладнень.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень розкривають біохімічні механізми розвитку ендogenous інтоксикації при гнійно-септичних ускладненнях гострого калькульозного холециститу з участю синтазної системи оксиду азоту та доповнюють відомості про зміну її активності в патогенезі ендотоксикозу, що обґрунтовує доцільність виконання таких досліджень.

Визначення показників зміни активності синтазної системи оксиду азоту, її ізоформ та рівня продукції оксиду азоту за концентрацією стабільних метаболітів (нітрит-аніон, нітрат-аніон) можна застосовувати як додатковий діагностичний критерій при оцінці перебігу гострого калькульозного холециститу та прогнозуванні розвитку гнійно-септичних ускладнень. Отримані дані проведених досліджень дозволяють полегшити диференційну діагностику, оцінити тяжкість ендogenous інтоксикації в динаміці гострого калькульозного холециститу.

Результати досліджень впроваджено у навчальний процес (курс лекцій і практичних занять) на кафедрах біологічної та медичної хімії імені акад. Г. О. Бабенка ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, медичної біохімії та клініко-лабораторної діагностики ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», про що свідчать відповідні акти впровадження.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно провела патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури відповідно до теми дослідження. Особисто, в повному обсязі, опанувала лабораторні методи діагностики, провела дослідження клініко-біохімічних показників крові у практично здорових осіб та хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітазом, холангітом, жовчним перитонітом (сепсисом). Здійснила статистичний аналіз отриманих цифрових результатів, написала всі розділи дисертації. Спільно з керівником сформулювала мету і завдання дослідження, основні положення та висновки. У наукових працях, у тому числі й тих, що опубліковані в співавторстві, а також актах впровадження, використано фактичний матеріал, отриманий дисертанткою особисто у процесі виконання роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, оприлюднено на науково-практичних конференціях «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2012); «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» (Львів, 2014); VIII науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI столітті» (Львів, 2016), результати дослідження та основні положення дисертації доповідалися на засіданнях Львівського відділення товариства лікарів-лаборантів (2011–2013 рр.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 6 – у фахових виданнях України, 1 – в іноземному періодичному виданні, 4 – у матеріалах і тезах конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Робота викладена українською мовою на 161 сторінці тексту, включає вступ, огляд літератури, 4 розділи власних досліджень, аналіз та обговорення отриманих результатів, висновки і проілюстрована 29 таблицями та 23 рисунками. Список літератури містить 241 джерело, з них 134 – кирилицею та 107 – латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі детально описано систему оксиду азоту (NO) та її роль у метаболічних процесах при гнійно-септичних ускладненнях захворювань жовчовивідної системи печінки. Висвітлено питання про захворювання на гострий калькульозний холецистит (ГКХ) та його ускладнення, зокрема холедохолітаз, холангіт, жовчний перитоніт (сепсис). Значну увагу приділено змінам активності NO-синтазної системи у відповідь на ендогенну інтоксикацію.

Матеріали та методи дослідження. Результати даної роботи базуються на клінічному обстеженні 97 хворих на гострий калькульозний холецистит без тяжкої супутньої соматичної патології віком від 38 до 64 років (середній вік пацієнтів – $(48 \pm 2,4)$ року), з них 32 чоловіки та 65 жінок, які перебували на стаціонарному лікуванні в хірургічному відділенні Комунальної міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги м. Львова. Контрольну групу склали 35 практично здорових осіб (середній вік – $(38,2 \pm 1,5)$ року), з них 11 чоловіків та 19 жінок. Роботу виконано на базі клініко-діагностичної лабораторії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України (свідоцтво про атестацію від 04.02.2014 р. № РЛ 011-14). Відповідно до нозології, пацієнтів поділили на 3 групи. До I групи входили хворі на ГКХ, ускладнений холедохолітазом, – 37 осіб, з них 15 чоловіків та 22 жінки (середній вік – $(47 \pm 2,5)$ року); до II – хворі на ГКХ, ускладнений холангітом, – 41 особа, з них 19 чоловіків та 22 жінки (середній вік – $(46 \pm 1,3)$ року); до III – хворі на ГКХ, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), – 19 осіб, з них 7 чоловіків та 12 жінок (середній вік – $(53 \pm 1,5)$ року).

Забір крові для дослідження проводили з вени натще при прийнятті у відділення, на 1–3 дні до оперативного втручання та після операції в період реконвалесценції на 4–7 дні. При генералізації патологічного процесу забір крові здійснювали на 10–14 дні перебування в клініці.

Підбирали хворих, враховуючи заходи безпеки для здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України. Комісія з питань етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України порушень морально-етичних норм при проведенні дослідження не виявила (протокол від 19.03.2012 р. № 3).

Показники активності NO-синтази (Nitric Oxide Synthase – NOS; КФ 1.14.13.39) визначали в гемолізаті еритроцитів за методом Сумбаєва В. В. та Ясинської І. М. (2000) з урахуванням активності її індукцйбельної ізоформи (iNOS), стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрату (NO_3^-) і нітриту (NO_2^-) – за стандартною методикою за допомогою реактиву Гріса (Green L. C., 1982). Рівень сечовини встановлювали діетилмонооксидним методом (Камишніков В. С., 2009), використовуючи набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна). Кількість лейкоцитів, показники лейкоцитарної формули визначали за допомогою мікроскопа ЛЮМАМ «МИКМЕД-5». Інтенсивність ендогенної інтоксикації оцінювали за показниками лейкоцитарних індексів (Сперанский И. И., 2009). Вміст молекул середньої маси (МСМ) у сироватці крові визначали за методом Габріеляна М. І. (1981). Для дослідження циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) використовували метод преципітації в розчині поліетиленгліколю-6000 (Гриневиц Ю. А., 1981). Вміст загального білірубину та його фракцій у сироватці крові визначали за методом Єндрашика–Грофа (1972), застосовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-діагностика». Диференційну діагностику жовтяниць проводили за співвідношенням моно- та диглюкуронідів з діазореактивом за методом Єндрашика в модифікації Романишина Я. М., Ястремської О. О. (1994). Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) (КФ 2.6.1.2) та аспартатамінотрансферази (АСТ) (КФ 2.6.1.1) досліджували за методом Райтмана–

Френкеля (1972), використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика». Функціональний стан печінки оцінювали за вмістом загального білка в сироватці крові біуретовим методом із застосуванням стандартного набору реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика». Вміст альбуміну визначали фотометрично на автоматичному аналізаторі COBAS INTEGRA. Концентрацію імуноглобулінів (Ig) А, G, М та прокальцитоніну (ПКТ) у сироватці крові встановлювали імуноферментним методом з використанням реактивів фірми «Вектор-Бест» (Росія).

Результати дослідження аналізували методом варіаційної статистики за допомогою програми STATISTICA 6 (Statsoft, США). Значення наведено у вигляді середньоарифметичних чисел (M), стандартних похибок середнього (m), n – об'єм вибірки. Кожен показник тестували на нормальний розподіл за критеріями Шапіро–Вілсона. Залежність від умов дослідження та розподілу даних відмінностей між групами оцінювали за допомогою парного або непарного t-критерію чи непараметричних критеріїв Манна–Уїтні, силу взаємозв'язку між досліджуваними показниками крові обстежених хворих – за критеріями визначення лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона (r). У тому випадку, коли модуль коефіцієнта Пірсона дорівнював або був меншим ніж 0,25, кореляцію вважали слабкою. Якщо величина $|r|$ була більшою ніж 0,25, але меншою ніж 0,75, такий кореляційний зв'язок розглядали як помірний. При значенні $|r|$, більшому або рівному 0,75, кореляційний зв'язок вважали сильним. Додатне значення коефіцієнта свідчить про пряму залежність між величинами, від'ємне – про обернену (Боровиков В., 2001).

Результати дослідження та їх обговорення. *Функціональний стан NO-синтазної системи в динаміці перебігу гострого калькульозного холециститу з гнійно-септичними ускладненнями.* У результаті проведених дослідження в усіх групах хворих на ГКХ виявлено зростання активності сумарної NO-синтази та її індуцибельної ізоформи, причому ступінь збільшення активності прямо пропорційно залежав від тяжкості ускладнення та генералізації процесу (рис. 1). На першому етапі обстеження, порівняно з показником активності сумарної NOS та iNOS у контрольній групі, у хворих на ГКХ, ускладнений холедохолітіазом, при прийнятті в стаціонар активність цих ферментів була вищою від контролю (сумарної NOS – на 15 %, $p < 0,05$, iNOS – на 37 %, $p < 0,05$).

Очевидно, зростання відбувалося за рахунок iNOS, це також підтвердилося співвідношенням сумарної NOS/iNOS у цій групі обстежених, величина якого була меншою на 17 % порівняно з контрольним значенням. Перед виписуванням зі стаціонару в обстежених I групи активність сумарної NOS зменшилася і становила $(7,20 \pm 0,19)$ нмоль NADPH/хв·мг білка, активність iNOS знизилася на 20,8 % порівняно з активністю при прийнятті в клініку і складала $(2,40 \pm 0,10)$ нмоль NADPH/хв·мг білка.

У результаті обстеження хворих на ГКХ, ускладнений холангітом, встановлено, що при прийнятті в стаціонар активність сумарної NOS на 20 %, iNOS – на 52 % перевищувала контроль ($p < 0,05$). Співвідношення активності NOS/iNOS у цій групі обстежених було на 25 % меншим від контролю. Перед виписуванням зі стаціонару в пацієнтів II групи активність NO-синтази знизилася порівняно з показником при прийнятті в стаціонар, однак перевищувала контроль (сумарна

NOS – на 17 %, iNOS – на 34 % ($p < 0,05$). Співвідношення NOS/iNOS нормалізувалося за рахунок зменшення активності iNOS і становило $2,75 \pm 0,10$.

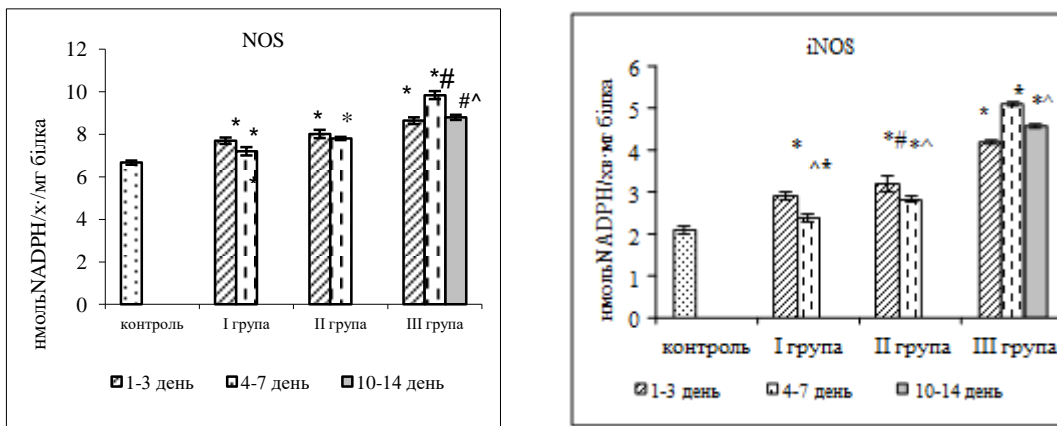


Рис. 1 Активність сумарної NO-синтази та індукбельної ізоформи при ГКХ із гнійно-септичними ускладненнями в динаміці обстеження.

Примітки: * – вірогідність відмінності показника порівняно з показником контрольної групи ($p < 0,05$); # – вірогідність відмінності порівняно з показником I групи ($p < 0,05$); ^ – вірогідність відмінності порівняно з показником на 1–3 дні ($p < 0,05$).

У III групі хворих на ГКХ, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), при прийнятті в стаціонар активність сумарної NOS на 29 %, iNOS – у 2 рази була більшою від контрольних значень ($p < 0,05$). Співвідношення NOS/iNOS було меншим від контролю на 35 % ($p < 0,05$). У період перебування в стаціонарі хворих III групи активність сумарної NOS зросла на 47 %, а активність iNOS у 2,4 рази перевищувала показник контрольної групи і на 79 % – показник при прийнятті в стаціонар ($p < 0,05$). Водночас активність конститутивної NO-синтази (cNOS) знизилася на 18 % менше ($p < 0,05$) від контрольного значення. Перебування хворих III групи в стаціонарі на 10–14 дні засвідчило зниження активності сумарної NOS до $(8,8 \pm 0,12)$ нмоль NADPH/хв·мг білка, що на 32 % перевищувало контроль, та iNOS – $(4,6 \pm 0,05)$ нмоль NADPH/хв·мг білка, що у 2 рази було більшим від контролю. Співвідношення NOS/iNOS було в 1,6 рази меншим ($p < 0,05$) порівняно з контролем $(3,1 \pm 0,26)$.

У I групі обстежених не встановлено вірогідної різниці експресії кальцієзалежної cNOS та кальцієнезалежної iNOS від активності сумарної NOS порівняно з контрольною групою.

У II групі хворих показник активності iNOS на 26,9 % ($p < 0,05$) перевищував контроль від активності сумарної NOS. Активність cNOS була на 12,20 % меншою порівняно з контролем ($p < 0,05$). Перед виписуванням зі стаціонару встановлено вірогідне зниження показника активності iNOS, який склав $(36,40 \pm 1,80)$ % від активності сумарної NOS, однак перевищував контроль на 15,5 % ($p < 0,05$). Відповідно, спостерігали зростання активності cNOS ($(63,50 \pm 3,00)$ %) від сумарної NOS. Переважання кальцієзалежної cNOS проявлялося пригніченням процесів інтоксикації, покращенням детоксикаційної функції печінки на тлі зниження активності iNOS.

У III групі обстежених при прийнятті в стаціонар експресія iNOS від сумарної активності NOS була на 54 % більшою, ніж у контрольній групі ($p < 0,05$).

У період перебування в стаціонарі показник активності iNOS зростав і був на 64 % вищим від контролю. Відповідно, знижувалася активність cNOS – на 44,5 % від сумарної активності NOS. На 10–14 дні перебування в стаціонарі експресія iNOS від сумарної активності NOS на 65 % перевищувала контрольний показник. Експресія cNOS була вірогідно меншою на 27,8 % порівняно з контролем, але на 14 % перевищувала попередній показник, що вказувало на деяку стимуляцію кальцієзалежної cNOS.

Отримані результати узгоджуються з існуючими відомостями про те, що при гнійно-септичних ускладненнях підвищується активність моноцитарно-макрофагальної системи, зростає продукція прозапальних цитокінів, які є індукторами активності iNOS (Зуєва Е. Б., 2008; Коцюруба А. В. та співавт., 2011).

Визначення пулів сумарних метаболітів оксиду азоту – NO_2^- і NO_3^- засвідчило зміни вмісту цих аніонів у різних групах хворих на ГКХ (табл. 1). Так, у I групі обстежених при прийнятті в стаціонар встановлено збільшення концентрації сумарних метаболітів оксиду азоту на 47 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Зростання відбувалося завдяки NO_2^- , який перевищував вміст у здорових осіб в 1,57 раза ($p < 0,05$). За даними літератури (Реутов В. П. та співавт., 2007; Швець М. І. та співавт., 2010), вміст NO_2^- відповідає рівню синтезу NO та впливає на активність iNOS, що підтверджується результатами наших досліджень. Вміст NO_3^- на 17 % ($p < 0,05$) перевищував контроль. У динаміці обстеження в осіб I групи концентрація сумарних метаболітів оксиду азоту знижувалася, але залишалася вірогідно вищою від контрольного значення на 26 %. Спостерігали зменшення NO_2^- на 8,5 % та NO_3^- лише на 1,4 %, концентрація сечовини залишалася в межах фізіологічних значень, що вказувало на компенсовані зміни білкового обміну та балансування між аргіназним і синтазним шляхами синтезу оксиду азоту.

При прийнятті в стаціонар у обстежених II групи концентрація сумарних метаболітів оксиду азоту перевищувала контроль на 84 % ($p < 0,05$). Рівень NO_2^- був більшим в 1,7 раза, а NO_3^- – на 22 % від контрольного значення ($p < 0,05$).

У динаміці спостереження концентрація сумарних метаболітів оксиду азоту зменшувалася, однак перевищувала контроль на 36 % ($p < 0,05$), концентрація нітрит-аніона знижувалася, хоча на 37 % була більшою від контролю, концентрація нітрат-аніона зменшувалася на 4,2 %. Знижувалася концентрація сечовини, рівень якої при прийнятті в стаціонар склав $(8,67 \pm 0,260)$ ммоль/л, а при виписуванні – $(7,65 \pm 0,21)$ ммоль/л, що вказувало на активацію окисного метаболізму NO, який конкурує з неокисним аргіназним (Сагач В. Ф. та співавт., 2008). Таким чином, зменшення проявів ендотоксикозу можна пояснити пригніченням катаболічних процесів та домінуванням NO-синтазного синтезу оксиду азоту.

У III групі обстежених внаслідок зростання активності NOS збільшувалася концентрація сумарних метаболітів оксиду азоту, яка у 2 рази перевищувала контроль ($p < 0,05$). Зростання відбувалося завдяки NO_2^- , який у 2 рази перевищував контроль, рівень NO_3^- був на 44 % більшим від контролю. Концентрація сечовини на 49,3 % перевищувала контрольне значення. У динаміці обстеження хворих III групи вміст сумарних метаболітів оксиду азоту, як і вміст NO_2^- , був у 2 рази більшим від контролю. Вміст нітрат-аніона знизився, однак на 29 % ($p < 0,05$) перевищував контроль. Концентрація сечовини була на 77 % ($p < 0,05$) більшою від контролю, що можна розглядати як процес активації аргіназного шляху

метаболізму оксиду азоту та показник порушення білкового обміну на тлі наростання ендотоксикозу (Скрипник І. М. та співавт., 2012).

Таблиця 1

Концентрація метаболітів NO та сечовини в сироватці крові хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітіазом, холангітом, жовчним перитонітом (сепсисом), при прийнятті в стаціонар (M±m)

Показник	Контрольна група (n=35)	Група обстежених		
		I група (n=37)	II група (n=41)	III група (n=19)
Сумарні метаболіти NO, ммоль/л	3,81±0,15	5,62±0,19*	7,02±0,11*#	7,65±0,47*#
NO ₂ ⁻ , ммоль/л	1,28±0,10	2,02±0,20*	2,22±0,15*	2,68±0,20*#
NO ₃ ⁻ , ммоль/л	2,84±0,20	3,34±0,31*	3,48±0,24*	4,09±0,28*#^
Сечовина, ммоль/л	5,84±0,25	6,65±0,40*	8,67±0,26*#	8,72±0,42*#

Примітки: * – вірогідність відмінності показника порівняно з показником контрольної групи (p<0,05); # – вірогідність відмінності порівняно з показником I групи (p<0,05); ^ – вірогідність відмінності порівняно з показником II групи (p<0,05).

На 10–14 дні перебування в стаціонарі вміст сумарних метаболітів оксиду азоту зменшувався, однак перевищував контроль у 2 рази (p<0,05). Спостерігали подальше збільшення концентрації NO₂⁻, порівняно з контролем, у 2,5 рази. Концентрація NO₃⁻ знижувалася, але перевищувала показник контролю на 20 % (p<0,05). Рівень сечовини був більшим від контролю у 2 рази (p<0,05), що вказувало на порушення білкового обміну або активацію аргіназного шляху метаболізму NO і зменшення його окисного перетворення.

Таким чином, оксид азоту вивільняється з депо при генералізації гнійно-запального процесу, що супроводжується ендogenous інтоксикацією, наростання якої генерує утворення NO₂⁻ для нітрит-редуктазного синтезу оксиду азоту. Отримані результати вказують на залежність активності NO-синтазної системи та її індукцйбельної ізоформи, продукування стабільних метаболітів оксиду азоту від тяжкості ускладнень, які виникають у жовчовивідній системі при захворюванні на гострий калькульозний холецистит.

Лейкоцитарні маркери ендogenous інтоксикації в динаміці перебігу гострого калькульозного холециститу з гнійно-септичними ускладненнями. Для діагностики тяжкості ендogenous інтоксикації важливо визначити загальну кількість лейкоцитів периферійної крові, показники лейкограми та інтегральні гематологічні індекси. При обстеженні хворих I групи загальна кількість лейкоцитів крові на 35 % перевищувала контроль із незначним зсувом до паличкоядерних нейтрофілів. На розвиток ендотоксикозу вказували показники інтегральних гематологічних індексів: лейкоцитарний індекс інтоксикації (ЛІІ) перевищував показник контролю на 53 % (p<0,05); ядерний індекс (ЯІ) – у 2,5 рази, індекс співвідношення лейкоцитів до концентрації IgG (ЛІІgG) – у 2 рази (p<0,05), індекс лімфоцитарно-гранулоцитарний (ЛІГ) зменшувався на 24,3 % від показника контрольної групи. У період реконвалесценції нормалізувалися показники гемограми. Інтегральні гематологічні індекси вказували на залишки інтоксикації.

В обстежених хворих на ГКХ, ускладнений холангітом, загальна кількість лейкоцитів перевищувала контроль на 45 % із зсувом до паличкоядерних гранулоцитів, відносна кількість яких у 3 рази була більшою від контролю, а абсолютна – в 6 разів. Значення ЛП зросло на 81 %, ЯІ – у 3,5 раза, індексу співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНЛ) – на 45,6 %, індексу зсуву лейкоцитів (ІЗЛ) – на 34 % порівняно з контролем, ІЛГ зменшився на 34,5 % порівняно з контролем ($p < 0,05$). У динаміці обстеження знижувалася кількість лейкоцитів до $(8,4 \pm 0,7)$ Г/л, збільшувалися відносні та абсолютні показники кількості паличко- і сегментоядерних гранулоцитів. Значення ЛП на 74,6 %, ЯІ – у 4,5 раза, ІЛІgG – у 3,2 раза перевищувало контроль ($p < 0,05$).

Виражені прояви ендогенної інтоксикації встановлено у III групі хворих. При прийнятті в стаціонар загальна кількість лейкоцитів у периферійній крові становила $(11,00 \pm 0,91)$ Г/л та продовжувала зростати впродовж стаціонарного періоду. На 10–14 дні обстеження вона була вищою від показника здорових осіб на 89 % ($p < 0,05$). Абсолютна кількість сегментоядерних гранулоцитів збільшилася у 2,2 раза, а паличкоядерних – у 14 разів порівняно з контролем ($p < 0,05$). Водночас спостерігали розвиток відносної та абсолютної лімфопенії в динаміці обстеження. Лейкоцитарні індекси інтоксикації змінювалися відповідно до показників лейкограми. Так, на 10–14 дні обстеження значення ЛП у 9,5 раза, ЯІ – у 10 разів, ІЛІgG – у 4,6 раза перевищувало показник контролю ($p < 0,05$), ІЛГ у 14,38 раза був нижчим від контролю.

Таким чином, гнійно-септичні процеси характеризуються лейкоцитозом та нейтрофіліозом, зміною інтегральних гематологічних індексів, що ґрунтуються на показниках білої крові, які більш чітко визначають тяжкість інтоксикації при гнійно-септичному процесі (Акімова В. М. та співавт., 2015).

Біохімічні маркери ендогенної інтоксикації в динаміці перебігу гострого калькульозного холециститу з гнійно-септичними ускладненнями. Біохімічними маркерами ендогенної інтоксикації є молекули середньої маси, рівень яких підвищується при патологічних станах різної тяжкості та етіології (Нікольська В. О. та співавт., 2013). Зростання рівня МСМ відзначали при прийнятті в стаціонар у всіх групах хворих на ГКХ (рис. 2).

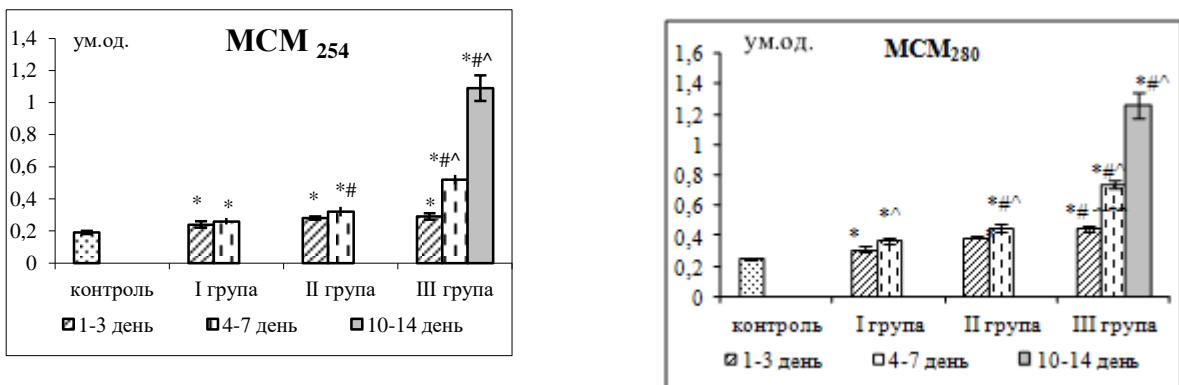


Рис. 2 Вміст молекул середньої маси в сироватці крові при ГКХ із гнійно-септичними ускладненнями в динаміці обстеження.

Примітки: * – вірогідність відмінності показника порівняно з показником контрольної групи ($p < 0,05$); # – вірогідність відмінності порівняно з показником I

групи ($p < 0,05$); \wedge – вірогідність відмінності порівняно з показником на момент прийняття в стаціонар ($p < 0,05$).

У хворих на ГКХ, ускладнений холедохолітіазом, при прийнятті в стаціонар вміст MCM_{254} вірогідно на 26 %, а MCM_{280} – на 24 % перевищував показник контрольної групи ($p < 0,05$). На 4–7 дні обстеження рівень MCM_{254} був на 36 %, а MCM_{280} – на 48 % більшим від контрольного значення ($p < 0,05$).

На першому етапі обстеження хворих на ГКХ, ускладнений холангітом, рівень MCM_{254} вірогідно на 47 %, MCM_{280} – на 56 % перевищував контроль. У період реконвалесценції встановлено подальше зростання вмісту MCM_{254} на 68 % порівняно з контролем, він був на 14 % більшим порівняно з показником при прийнятті в стаціонар ($p < 0,05$). Вміст MCM_{280} вірогідно перевищував контроль на 80 %, а показник при прийнятті в стаціонар – на 15 %. Зростання вмісту MCM у цих групах вказувало на пролонгований катаболічний процес, спричинений нагромадженням проміжних і кінцевих продуктів (Нікольська В. О. та співавт., 2013).

Вміст MCM_{254} у хворих на ГКХ, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), при прийнятті в стаціонар підвищився на 52 %, а вміст MCM_{280} був на 68 % більшим за показник контролю ($p < 0,05$). У динаміці обстеження спостерігали генералізацію процесу, яка супроводжувалася прогресуванням ендотоксикозу, що підтверджувалося зростанням вмісту MCM_{254} у 2,7 раза вище від контролю та на 79 % вище за показник при госпіталізації ($p < 0,05$). Вміст MCM_{280} вірогідно збільшувався у 2,9 раза порівняно з контрольним значенням і на 76 % порівняно з показником при прийнятті в стаціонар. На 10–14 дні обстеження рівень MCM_{254} перевищував контроль у 5,7 раза, а MCM_{280} – у 5 разів ($p < 0,05$). Зміни вмісту MCM вказували на виражені метаболічні зрушення, що відбувалися в організмі.

У хворих на ГКХ, ускладнений холедохолітіазом та холангітом, рівень циркулюючих імунних комплексів на момент прийняття в стаціонар не перевищував фізіологічної норми. Збільшення даного показника на 86 % порівняно з контролем спостерігали у II групі хворих перед виписуванням із клініки, що вказувало на високий потенціал гуморальної відповіді в цих пацієнтів. Зростання рівня ЦІК у хворих на ГКХ із жовчним перитонітом (сепсисом) відзначали протягом усього стаціонарного періоду. При прийнятті в стаціонар показник ЦІК в 1,9 раза перевищував контроль, у динаміці обстеження концентрація ЦІК була більшою ніж у 2 рази від контрольного значення та на 37 % вищою за фізіологічну норму.

Показники білкового обміну та рівень прокальцитоніну в динаміці перебігу гострого калькульозного холециститу з гнійно-септичними ускладненнями. Про детоксикаційну функцію печінки свідчив вміст загального білка та альбуміну в сироватці крові (табл. 2). У I та II групах хворих протягом перебування в стаціонарі вірогідної різниці вмісту загального білка та альбуміну, порівняно з контролем, не виявлено. У пацієнтів III групи при прийнятті в стаціонар встановлено зменшення вмісту загального білка на 23 % та альбуміну на 19 % порівняно з контрольною групою. Ці показники знижувалися впродовж усього стаціонарного періоду, рівень загального білка зменшився на 34 %, альбуміну – на 38 % нижче контролю ($p < 0,05$).

Про активацію гуморальної ланки імунітету у хворих на ГКХ із гнійно-септичними ускладненнями свідчило зростання концентрації сироваткових

імуноглобулінів. У I групі хворих виявлено підвищення IgA на 20 % ($p<0,05$), IgG – в 1,5 раза, IgM – на 39 % порівняно з контролем.

Таблиця 2

Показники білкового обміну в сироватці крові хворих на гострий калькульозний холецистит із гнійно-септичними ускладненнями при прийнятті в стаціонар (M±m)

Показник	Контрольна група (n=35)	I група (n=37)	II група (n=41)	III група (n=19)
Загальний білок, г/л	78,52±0,95	78,61±1,21	70,36±1,05*	60,41±1,01**
Альбумін, г/л	42,51±2,21	40,62±2,01	38,43±1,23	34,52±1,04**
IgA, г/л	1,96±0,14	2,36±0,18*	2,54±0,18*	2,74±0,14#^
IgG, г/л	8,53±0,52	12,81±0,95*	18,02±1,02*	20,25±1,03**^
IgM, г/л	1,15±0,09	1,63±0,12*	1,31±0,11	1,33±0,05

Примітки: * – вірогідність відмінності показника порівняно з показником контрольної групи ($p<0,05$); # – вірогідність відмінності порівняно з показником I групи ($p<0,05$); ^ – вірогідність відмінності порівняно з показником II групи ($p<0,05$).

У II групі хворих рівень IgA на 29 %, IgG – на 111 %, IgM – на 13 % перевищував контроль ($p<0,05$). У динаміці обстеження відзначено подальше вірогідне зростання концентрації IgA та IgG. У хворих III групи при прийнятті в клініку встановлено найвищі значення вмісту імуноглобулінів. Так, концентрація IgG була у 2,4 раза більшою від контролю, IgA – на 39 % ($p<0,05$). У динаміці обстеження спостерігали подальше зростання рівня імуноглобулінів, і на 10–14 дні концентрація IgA на 53 %, IgG – у 2,8 раза перевищувала контроль ($p<0,05$).

Сироватковий рівень загального білірубину у хворих на ГКХ, ускладнений холедохолітазом, при прийнятті в стаціонар перевищував у 3,0 рази показник контрольної групи з переважанням прямої фракції, концентрація якої у 8,7 раза була більшою від контролю ($p<0,05$).

Встановлено зростання фракції непрямого білірубину в 1,4 раза ($p<0,05$) порівняно з контролем. У період реконвалесценції відзначено зменшення рівня загального білірубину, що був на 48 % нижчим від показника при прийнятті в стаціонар, однак на 18 % вищим за контроль. У цей період знижувалася пряма фракція білірубину, хоча перевищувала контроль у 4,8 раза.

У хворих на ГКХ, ускладнений холангітом, при прийнятті в стаціонар рівень загального білірубину вірогідно був більшим від показника здорових осіб у 4,6 раза, причому пряма фракція в 14,9 раза, а непрямий білірубін – у 1,8 раза перевищували контроль ($p<0,05$). У період одужання рівень загального білірубину перевищував контроль у 2,2 раза ($p<0,05$), знижувалася пряма фракція білірубину, однак вона в 6,3 раза була більшою від контролю ($p<0,05$). Також зменшувалася на 60 % концентрація непрямого білірубину порівняно з показником при прийнятті в стаціонар, хоча вона перевищувала контрольний на 15 % ($p<0,05$).

Враховуючи те, що у I та II групах хворих концентрація загального білка й альбуміну перебувала в межах фізіологічних значень, зберігалася альбумінозв'язувальна здатність, яка, у свою чергу, запобігала прояву токсичного впливу білірубину (Никифорова О. Е. и соавт., 2010).

У хворих на ГКХ, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), рівень загального білірубину в 15 разів, фракція прямого білірубину – в 56 разів, а концентрація непрямого білірубину – в 4,2 раза перевищували контрольні показники ($p < 0,05$). Протягом перебування в стаціонарі встановлено подальше зростання концентрації загального білірубину – в 16 разів порівняно з контролем, однак пряма фракція білірубину знижувалася, хоча перевищувала контроль у 52 рази. Фракція непрямого білірубину збільшилася на 53 % порівняно з показником при прийнятті в стаціонар перевищувала контроль у 6,5 раза ($p < 0,05$). На 10–14 дні загальний білірубін був більшим за контрольний показник у 17 разів, концентрація прямого білірубину мала тенденцію до зниження, однак перевищувала контроль у 48 разів. Непрямий білірубін зростав і перевищував контроль у 8,3 раза ($p < 0,05$).

Глюкуронізація білірубину є важливим фізіологічним процесом детоксикації організму (Камышников В. С., 2009). Коефіцієнт співвідношення моно- та диглюкуроніду білірубину при прийнятті в стаціонар у 1/3 частини хворих ускладнений холедохолітіазом, та в 1/2 частини хворих ускладнений холангітом, перевищував одиницю, що свідчило про збільшення фракції моноглюкуроніду. В період реконвалесценції переважав диглюкуронід білірубину, що вказувало на гепатопротекторний процес. Коефіцієнт диференціації жовтяниць у хворих на ГКХ, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), перевищував одиницю протягом усього періоду обстеження, що свідчило про ураження гладкого ендоплазматичного ретикулума гепатоцитів та наростання ендогенної інтоксикації.

На ушкодження гепатоцитів вказувала підвищена активність ферментів цитолізу – амінотрансфераз у сироватці крові. Активність АСТ і АЛТ у хворих I групи не перевищувала межі контрольних значень протягом усього стаціонарного періоду. В обстежених II групи при прийнятті в стаціонар встановлено зростання активності АСТ в 1,7 раза, АЛТ – в 2,67 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольними показниками. Під час перебування хворих у стаціонарі відзначали подальше збільшення активності АСТ у 2 і АЛТ – у 3 рази порівняно з контрольними значеннями ($p < 0,05$). У хворих III групи активність АСТ у 3,5 раза, АЛТ – у 10 разів перевищувала контрольні показники. У динаміці обстеження активність АСТ зростала у 3,7 раза, а АЛТ – у 10,7 раза вище від контролю. На 10–14 дні обстеження активність АСТ зростала в 4 рази, АЛТ – у 11,5 раза більше від контролю ($p < 0,05$). Відношення АСТ/АЛТ, або коефіцієнт де Рітиса, вірогідно знижувалося з переважанням активності АЛТ. Ця закономірність супроводжувала хворих III групи протягом усього стаціонарного періоду, що свідчило про виражений цитолітичний синдром – ушкодження гепатоцитів та вихід ферментів із клітинних компартментів.

Важливим маркером сепсису є прокальцитонін, концентрація якого у хворих на ГКХ, ускладнений холедохолітіазом, зростала в 506 разів більше, ніж у здорових людей ($p < 0,05$), це вказувало на можливість виникнення сепсису з малим ризиком прогресування в тяжкий септичний стан. При наступному обстеженні концентрація ПКТ була у 20 разів вищою від контрольного значення ($p < 0,05$). На можливість розвитку септичного процесу у хворих II групи вказував вміст ПКТ ($8,08 \pm 0,44$) нг/мл, який у 1616 разів перевищував контроль ($p < 0,05$). Надалі рівень ПКТ у пацієнтів цієї групи знижувався і становив ($0,3 \pm 0,01$) нг/мл. У хворих III групи рівень ПКТ при прийнятті в стаціонар складав ($20,73 \pm 0,62$) нг/мл, що у 4146 разів більше, ніж у здорових осіб ($p < 0,05$), це свідчило про генералізацію

бактерійної інфекції та ймовірність розвитку синдрому системної запальної реакції. У період перебування хворих у стаціонарі рівень ПКТ знижувався до $(10,46 \pm 0,6)$ нг/мл, а на 10–14 дні обстеження перевищував контроль у 152 рази ($p < 0,05$) і вказував на те, що загроза розвитку септичного процесу зберігалася.

Кореляційні зв'язки між показниками активності NOS-системи та ендогенної інтоксикації в динаміці перебігу гострого калькульозного холецистити з гнійно-септичними ускладненнями. Для виявлення зв'язку між досліджуваними показниками було проведено кореляційний аналіз. Аналізували лише вірогідні кореляційні зв'язки ($p < 0,05$). У результаті аналізу даних було виявлено, що ядром кореляційних зв'язків є сумарна NO-синтаза (рис. 3). Так, у I групі обстежених було виявлено сильний прямий кореляційний зв'язок NOS із NO_2^- ($r=0,80$) та iNOS ($r=0,9$). Встановлено два прямих кореляційних зв'язки середньої сили між NOS та MCM ($r=0,41$) і ПКТ ($r=0,34$); два обернених кореляційних зв'язки середньої сили між NOS та показниками лейкограми: паличкоядерними гранулоцитами ($r=-0,56$) і лейкоцитами ($r=-0,59$). При виписуванні у хворих I групи кількість кореляційних зв'язків збільшилася. Незмінним залишився зв'язок активності NOS із активністю iNOS ($r=0,98$), вмістом NO_2^- ($r=0,87$) та кількістю лейкоцитів ($r=0,64$). Було встановлено вірогідний сильний кореляційний зв'язок активності NOS із активністю АСТ ($r=0,87$) і активністю АЛТ ($r=0,59$), слабкий зв'язок із відносною кількістю моноцитів ($r=0,37$), кореляційний зв'язок середньої сили із вмістом ЦІК ($r=0,53$) та кількістю еозинофілів ($r=0,72$). Сильнішим став кореляційний зв'язок активності NOS із концентрацією ПКТ ($r=0,58$).

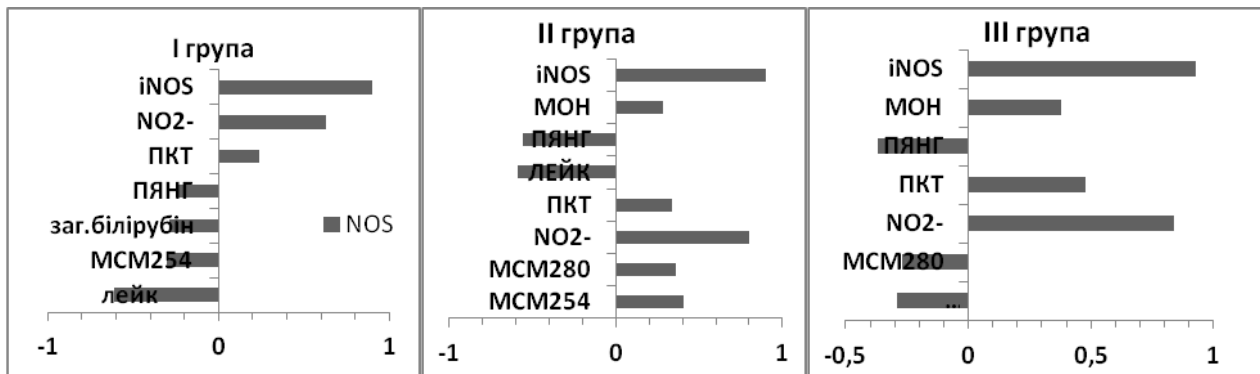


Рис. 3 Кореляційні зв'язки NOS із показниками гемограми та ендогенної інтоксикації у хворих на ГКХ, ускладнений холедохолітазом (I група), холангітом (II група) та місцевим перитонітом (сепсисом) (III група), при прийнятті в стаціонар.

У II групі обстежених також виявлено сильний прямий кореляційний зв'язок NOS із NO_2^- ($r=0,84$) та iNOS ($r=0,92$). Прямі кореляційні зв'язки середньої сили встановлено для NOS із MCM ($r=0,29$), ПКТ ($r=0,48$), моноцитами ($r=0,38$), обернені кореляційні зв'язки середньої сили – для NOS із MCM ($r=-0,29$) та паличкоядерними гранулоцитами ($r=-0,37$). У динаміці обстеження виявлено новий кореляційний зв'язок із концентрацією загального білірубину ($r=0,55$), активністю АСТ ($r=0,70$), активністю АЛТ ($r=0,89$).

У III групі обстежених структура зв'язків була дещо іншою. Сильний прямий кореляційний зв'язок виявлено для NOS та iNOS ($r=0,93$). Прямий кореляційний зв'язок середньої сили встановлено для активності NOS із концентрацією NO_2^- ($r=0,63$). У цій групі обстежених в основному проявлялися

обернені зв'язки середньої сили для NOS із МСМ ($r=-0,3$), лейкоцитами ($r=-0,61$), абсолютною кількістю паличкоядерних гранулоцитів ($r=-0,25$). Із вмістом ПКТ зв'язок був слабким ($r=0,24$). У динаміці обстеження встановлено зв'язки з активністю АЛТ ($r=0,89$), концентрацією загального білірубину ($r=0,55$), кількістю моноцитів ($r=-0,37$), вмістом ЦК ($r=0,33$). Подібні зв'язки були і на 10–14 дні перебування в стаціонарі.

ВИСНОВКИ

У дисертації на підставі комплексних клініко-біохімічних досліджень представлено новий підхід щодо вирішення актуального наукового завдання з поліпшення прогнозування розвитку гнійно-септичних ускладнень при гострому калькульозному холециститі за змінами NO-синтазної системи залежно від показників ендогенної інтоксикації.

У результаті вирішення наукової проблеми зроблено такі висновки:

1. У всіх групах хворих на гострий калькульозний холецистит встановлено підвищення активності сумарної синтази оксиду азоту завдяки її індукцйбельній ізоформі, яка прямо пропорційно залежить від тяжкості ускладнення та генералізації процесу. У хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), при прийнятті в стаціонар сумарна синтаза оксиду азоту на 29 %, а індукцйбельна – у 2 рази перевищували показники контрольної групи ($p<0,05$), в динаміці обстеження активність синтази оксиду азоту продовжувала зростати завдяки ідуцибельній ізоформі. У хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітіазом та холангітом, активність синтази оксиду азоту вірогідно перевищувала контроль, однак знижувалася в динаміці обстеження. У відповідь на пригнічення процесів інтоксикації відбувалася активація конститутивної синтази оксиду азоту.

2. У результаті зростання активності синтази оксиду азоту збільшувався вміст метаболітів оксиду азоту. Рівень нітриту у хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом) підвищувався у 2 рази. Наростання ендогенної інтоксикації генерувало утворення нітриту, який у динаміці обстеження у 2,5 рази перевищував показник здорових осіб ($p<0,05$). У хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітіазом, концентрація цього аніона була в 1,5 рази більшою, при ускладненні холангітом – у 1,7 рази. У динаміці обстеження даний показник вірогідно знижувався, однак перевищував контроль ($p<0,05$). Гострий калькульозний холецистит, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом), супроводжувався зростанням рівня сечовини на 77 %. У динаміці обстеження він збільшився у 2 рази порівняно з контролем ($p<0,05$).

3. При гострому калькульозному холециститі встановлено характерний нейтрофільний тип лейкоцитарної формули із зсувом ядерної формули нейтрофілів вліво до паличкоядерних гранулоцитів у всіх групах хворих. Найбільш вираженим був прояв ендотоксикозу в пацієнтів із жовчним перитонітом (сепсисом), що підтверджували лейкоцитоз більше 12 Г/л та зростання показників лейкоцитарних індексів: лейкоцитарний індекс інтоксикації – у 2 рази, ядерний індекс – у 7,5 рази, індекс співвідношення лейкоцитів і IgG – у 3,9 рази ($p<0,05$).

4. Наростання ендогенної інтоксикації характеризував високий вміст молекул середньої маси у всіх групах хворих на гострий калькульозний холецистит. При ускладненні жовчним перитонітом (сепсисом) встановлено збільшення концентрації МСМ₂₅₄ на 52 %, МСМ₂₈₀ – на 68 % при прийнятті в стаціонар та

впродовж усього періоду обстеження, на 14 день обстеження концентрація МСМ₂₅₄ у 5,7 раза, МСМ₂₈₀ – у 5 разів перевищувала показник контрольної групи ($p < 0,05$). У ІІІ групі хворих підвищувався рівень циркулюючих імунних комплексів. Встановлено зростання концентрації імуноглобуліну А та G у всіх хворих на гострий калькульозний холецистит.

5. Генералізація патологічного процесу супроводжувалася зниженням рівня загального білка на 34 % та альбуміну на 38 % у хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом). У І групі хворих вміст білірубіну підвищився в 3 рази, у ІІ групі – в 4,6 раза, у ІІІ групі – в 17 разів. У ІІІ групі найбільше проявлявся його токсичний вплив, що підтверджувалося зростанням активності ферментів цитолізу: аспартатамінотрансферази – у 4 рази, аланінамінотрансферази – у 11,5 раза вище від показника здорових осіб ($p < 0,05$).

6. Підвищення рівня прокальцитоніну відображало тяжкість інтоксикації: у хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений холедохолітіазом, – $(2,53 \pm 0,07)$ нг/мл, ускладнений холангітом – $(8,08 \pm 0,44)$ нг/мл ($p < 0,05$), що вказувало на можливість розвитку сепсису з малим ризиком прогресування в тяжкий септичний стан. У хворих на гострий калькульозний холецистит, ускладнений жовчним перитонітом (сепсисом) рівень прокальцитоніну становив $(20,73 \pm 0,6)$ нг/мл, що свідчило про можливість розвитку септичного процесу.

7. За допомогою кореляційного аналізу виявлено функціональні взаємозв'язки системи оксиду азоту та показників ендогенної інтоксикації. Ядром кореляційних зв'язків була синтаза оксиду азоту, для якої встановлено вірогідні сильні кореляційні зв'язки з індукцибельною синтазою оксиду азоту ($r = 0,89$) та кореляційні зв'язки середньої сили з рівнем молекул середньої маси ($r = 0,41$), прокальцитоніну ($r = 0,35$) та показниками лейкограми у хворих на гострий калькульозний холецистит різного ступеня тяжкості. У динаміці спостереження незмінним залишався зв'язок з індукцибельною синтазою оксиду азоту, з іншими показниками зв'язки слабшали, з'являлися нові кореляційні зв'язки: з активністю аспартатамінотрансферази ($r = 0,7$), активністю аланінамінотрансферази ($r = 0,89$), рівнем загального білірубіну ($r = 0,55$).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив гнійно-запальних ускладнень у хворих з гострим калькульозним холециститом на функціональний стан печінки / О. П. Цимбала, Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. І. Март'янова // Мед. та клініч. хімія. – 2015. – Т. 17, № 3 (64). – С. 42–46. (Здобувач провела клініко-лабораторне обстеження хворих, статистичну обробку отриманих даних, підготувала статтю до друку.)

2. Лаповець Л. Є. Активність NO-синтазної системи та показники ендогенної інтоксикації при ускладненому гострому калькульозному холециститі / Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. П. Цимбала // Заг. патологія та пат. фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 179–184. (Здобувач проаналізувала літературні джерела, провела статистичну обробку отриманих даних, підготувала статтю до друку.)

3. Лаповець Л. Є. Роль метаболітів оксиду азоту у патогенезі гострого холециститу / Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. П. Цимбала // Заг. патологія та пат. фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 51–53. (Здобувач провела клініко-лабораторне обстеження хворих, проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки.)

4. Зміни деяких біохімічних показників сироватки крові хворих на гострий калькульозний холецистит / Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. П. Цимбала,

О. М. Кадикало // Клініч. та експерим. патологія. – 2013. – Т. XII, № 4 (46). – С. 130–132. *(Здобувач провела клініко-лабораторне обстеження хворих, обробку та аналіз результатів, підготувала статтю до друку.)*

5. Акімова В. М. Маркеры системного воспалительного ответа при острых абдоминальных заболеваниях [Электронный ресурс] / В. М. Акімова, Н. З. Луців, О. П. Цимбала // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – Режим доступа к журн. : <http://www.science-education.ru/113-1322>. *(Здобувач провела забір крові для дослідження, аналіз та узагальнення результатів, оформила статтю.)*

6. Лаповець Л. Є. Рівень прокальцитоніну у хворих на гострий калькульозний холецистит з септичними ускладненнями / Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. П. Цимбала // Вісн. проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 3, Т. 2 (103). – С. 181–184. *(Здобувач проаналізувала літературні джерела, провела клініко-лабораторне обстеження хворих, сформувала висновки.)*

7. Лаповець Л. Є. Стан ендогенної інтоксикації у хворих на гострий холецистит / Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. П. Цимбала // Вісн. проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 1, Т. 1 (91). – С. 149–151. *(Здобувач провела обстеження хворих, статистично опрацювала, проаналізувала отримані дані, підготувала статтю до друку.)*

8. Акімова В. М. Маркери ендогенної інтоксикації в динаміці перебігу гострого калькульозного холециститу з гнійно-запальними та гнійно-септичними ускладненнями / В. М. Акімова, О. П. Цимбала, Л. Є. Лаповець // Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст. : Міжнар. наук-практ. конф. (Львів, 27–28 трав. 2016 р.) : матеріали конф. – Львів, 2016. – С. 86–90. *(Здобувач проаналізувала літературні джерела, провела клініко-лабораторне обстеження хворих, підготувала тези до друку.)*

9. Діагностика ушкоджень паренхіми печінки при гнійно-запальних ускладненнях гострого калькульозного холециститу / О. П. Цимбала, В. М. Акімова, О. О. Ястремська, Л. Є. Лаповець // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : VIII наук.-практ. конф. (Тернопіль, 01–02 жовт. 2015 р.) : матеріали конф. – Тернопіль, 2015. – С. 100–101. *(Здобувач провела клініко-лабораторне обстеження хворих, проаналізувала отримані дані, сформувала висновки.)*

10. Акімова В. М. Цитокіни та прокальцитонін в оцінці розвитку системного запалення при гострих абдомінальних захворюваннях / В. М. Акімова, Н. З. Луців, О. П. Цимбала // Медична наука та практика: виклики і сьогодення : Міжнар. наук.-практ. конф. (Львів, 25–26 лип. 2014 р.) : зб. тез наук. робіт учасників Міжнар. наук-практ. конф. – Львів, 2016. – С. 97–100. *(Здобувач провела клініко-лабораторне обстеження хворих, проаналізувала отримані дані, підготувала тези до друку.)*

11. Лаповець Л. Є. Ендогенний токсикоз, як фактор ускладнень у хворих на гострий калькульозний холецистит / Л. Є. Лаповець, В. М. Акімова, О. П. Цимбала // Здобутки клінічної та експериментальної медицини : підсумкова наук.-практ. конф. (Тернопіль, 17 квіт. 2012 р.) : матеріали конф. – Тернопіль, 2012. – С. 47. *(Здобувач проаналізувала літературні джерела, провела клініко-лабораторне обстеження хворих, сформувала висновки.)*

АНОТАЦІЯ

Цимбала О. П. Взаємозв'язок NO-синтазної системи та показників ендогенної інтоксикації при гострому холециститі, ускладненому сепсисом. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», Тернопіль, 2017.

Дисертація присвячена вивченню змін NO-синтазної активності в патогенезі ендогенної інтоксикації при гнійно-септичних ускладненнях гострого холециститу. У всіх групах хворих на ГКХ виявлено зростання NO-синтазної активності та вмісту метаболітів оксиду азоту (NO_2^- і NO_3^-). Високі показники активності NOS-системи встановлено у пацієнтів із жовчним перитонітом (сепсисом). Наростання ендогенної інтоксикації підтверджують лейкоцитоз із нейтрофіліозом, лейкоцитарними індексами інтоксикації. На ендотоксикоз вказуює вміст МСМ, ЦИК, збільшення рівня сечовини, білірубину, активності АСТ та АЛТ, зниження вмісту загального білка й альбуміну. Високу імунореактивність характеризує концентрація IgA й IgG. Рівень ПКТ свідчить про можливість розвитку септичного процесу. Отримані результати дозволяють стверджувати, що зміни активності NOS-системи прямо пропорційно залежать від тяжкості ускладнень та генералізації процесу.

Ключові слова: NO/NOS-система, гострий калькульозний холецистит, гнійно-септичні ускладнення, прокальцитонін.

АННОТАЦИЯ

Цимбала О. П. Взаимосвязь NO-синтазной системы и показателей эндогенной интоксикации при остром холецистите, осложненном сепсисом. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. Государственное высшее учебное заведение «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины», Тернополь, 2017.

Диссертация посвящена изучению изменений NO-синтазной активности в патогенезе эндогенной интоксикации при гнойно-септических осложнениях острого холецистита. У всех группах больных ОКХ обнаружено возрастание NO-синтазной активности и содержания метаболитов оксида азота (NO_2^- и NO_3^-). Повышение эндогенной интоксикации подтверждается лейкоцитозом с нейтрофилиозом, лейкоцитарными индексами интоксикации. На эндотоксикоз указывают содержание МСМ, ЦИК, увеличение уровня мочевины, билирубина, активности АСТ и АЛТ, снижение содержания общего белка и альбумина. Нарушение гуморального иммунитета подтверждается содержанием иммуноглобулинов IgA и IgG. Уровень ПКТ свидетельствует о возможности развития септического процесса. Полученные результаты указывают на то, что изменения активности NOS-системы прямо пропорционально зависят от тяжести осложнений и генерализации процесса.

Ключевые слова: NO/NOS-система, острый калькулезный холецистит, гнойно-септические осложнения, прокальцитонин.

SUMMARY

Tsymbala O. P. The relationship of NO-synthase system and parameters of endogenous intoxication in case of sepsis complicated acute cholecystitis. – Manuscript copyright.

Dissertation for the PhD degree in specialty 03.00.04 – biochemistry. The State Higher Educational Institution «I. Horbachevsky Ternopil State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine», Ternopil, 2017.

The thesis deals with the investigation of NO-synthase activity changes in the pathogenesis of endogenous intoxication in septic complications of acute calculous cholecystitis (ACH). It was established that in all groups of ACH patients the total activity of NO-synthase increased because of its inducible form (iNOS). The results suggested that in patients with choledocholithiasis complicated ACH there were minor changes in NO-synthase activity. In patients with cholangitis complicated ACH the iNOS activity was by 52 % higher than the control. In these groups the NOS activity significantly decreased during treatment but remained above control values. In response to the depression of intoxication process the cNOS was activated. As a result of increased activity of NOS the content of NO metabolites nitrite anion NO_2^- increased. The content of total nitrogen oxide metabolites was by 84 % higher than the control ($p < 0.05$) in the patients with ACH complicated with cholangitis at admission to the hospital. NO_2^- level was higher in 1.7 times, and NO_3^- by 22 % compared to the control values ($p < 0.05$). The dynamic observation showed the decrease of total nitrogen oxide metabolites.

The increase in NO-synthase activity and content of stable nitric oxide metabolites of (NO_2^- , NO_3^-) in the patients with ACH complicated with bile peritonitis (sepsis) were observed throughout the hospital stay with a slight decrease when discharged from the clinic. The activation of NOS in the patients with ACH complicated with bile peritonitis was evidenced: total NOS by 29 %, and iNOS was in 2 times higher than the control ($p < 0.05$). The dynamic examination of NOS activity showed the iNOS activity was higher in 2.5 times than the control. The NO_2^- level in the patients with ACH complicated with bile peritonitis increased in 2 times and during formation of endogenous intoxication increased in 2.5 times. ACH complicated with sepsis was followed by increased levels of urea by 77 %, which increased in 2 times in dynamic compared to the control.

The definition of NO-synthase activity indicators (iNOS, sNOS) and the production of NO by the content of stable metabolites of nitric oxide (NO_2^- , NO_3^-) can be useful as an additional diagnostic criterion in considering the course of acute calculous cholecystitis and prediction of septic complications.

The markers of endogenous intoxication are: haematological indices, levels of bilirubin and its direct fraction were increased in all groups of patients. A slight increase in activity of AST, ALT was established in the patients with ACH complicated with cholangitis before release from the clinic. Immune-level changes characterize IgA; IgG. Procalcitonin level (sepsis marker) shows the possibility of septic process in the acute period and with low risk of progression to septic condition at the time of release from the

clinic in patients with ACH complicated with choledocholithiasis and indicates the risk of septic process in sepsis complicated ACH. The severity of endogenous intoxication was characterized by a high content of average mass molecules (AMM) in all groups of ACH patients. In complicated bile peritonitis (sepsis) the increase in the concentration of AMM₂₅₄ by 52 %, AMM₂₈₀ 68 % at admission and during the whole period of the survey was evidenced and on the 14th day the AMM₂₅₄ concentration was in 5.7 times, and AMM₂₈₀ in 5 times higher than the control group ($p < 0.05$). The increase in concentration of IgA and I G and circulation immune complexes in all groups of patients was observed.

The high rates of NOS-system activity were followed by the endogenous intoxication increase, which was evidenced by the rise in the indexes of urea, leukocytosis with neutrocytosis, integrated leukocytes. The severity of endotoxemia was proved by the increased levels of AST and ALT with probable decrease in deRitis' coefficient. The decrease in total protein level and albumin fraction was observed.

Using correlation analysis it was established the functional relationship of nitric oxide system and parameters of endogenous intoxication. NO-synthase activity was set for probable strong correlation with iNOS ($r=0.89$) and medium strength correlation with the level of AMM ($r=0.41$), procalcitonin level ($r=0.35$) and hematological indicators in the ACH patients with varying degrees of severity. The dynamic observation proved constant relationship of NOS with the iNOS, the relations with other indicators decreased and new correlations with AST activity ($r=0.7$), ALT ($r=0.89$), bilirubin level ($r=0.55$) occurred.

Key words: NO/NOS-system acute calculous cholecystitis, purulent septic processes procalcitonin.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АЛТ – аланінамінотрансфераза
- АСТ – аспартатамінотрансфераза
- ГКХ – гострий калькульозний холецистит
- ІЗЛ – індекс зсуву лейкоцитів
- ІЛГ – індекс лімфоцитарно-гранулоцитарний
- ІЛІgG – індекс співвідношення лейкоцитів та ІgG
- ІСНЛ – індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів
- ІЛІ – лейкоцитарний індекс інтоксикації
- МСМ – молекули середньої маси
- ПКТ – прокальцитонін
- ЦК – циркулюючі імунні комплекси
- ЯІ – ядерний індекс
- cNOS – конститутивна NO-синтаза
- Ig – імуноглобуліни
- iNOS – індукбельна, або макрофагальна, NO-синтаза
- NO – оксид азоту (нітрогену монооксид)
- NO₂⁻ – нітрит-аніон
- NO₃⁻ – нітрат-аніон
- NOS – NO-синтаза