

Д. А. Ключко, В. Е. Корик, Т. А. Летковская

ВЛИЯНИЕ ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ НА ЭКСПРЕССИЮ HIF-1 α

В статье представлены результаты влияния гипоксии на брюшину. В выборку включены 10 пациентов, у которых методом прямой оксиметрии интраоперационно регистрировалось парциальное давление кислорода в ткани спайки с последующим иммуногистохимическим исследованием в ней экспрессии HIF-1 α . В ходе исследования было выявлено: гипоксия тканей способствует экспрессии HIF-1 α , влияет на развитие фибробластов и, как следствие, на продукцию грубой волокнистой ткани в брюшной полости. Снижение гипоксии в зоне оперативного вмешательства очевидно позволит уменьшить вероятность развития спаечного процесса в брюшной полости.

Ключевые слова: спаечная болезнь, гипоксия тканей, HIF-1 α .

D. A. Klyuko, V. E. Korik, T. A. Letkovskaya

THE INFLUENCE OF THE PARTIAL PRESSURE OF OXYGEN IN THE ABDOMINAL CAVITY ON THE EXPRESSION OF HIF-1 α

The article presents the results of the effect of hypoxia on the peritoneum. The sample included 10 patients in whom the partial oxygen pressure in the adhesion tissue was recorded intraoperatively by direct oximetry, followed by an immunohistochemical study of HIF-1 α expression in it. The study revealed: tissue hypoxia promotes the expression of HIF-1 α , affects the development of fibroblasts and, as a result, the production of coarse fibrous tissue in the abdominal cavity. A decrease in hypoxia in the area of surgical intervention will obviously reduce the likelihood of an adhesion process in the abdominal cavity.

Key words: adhesive disease, tissue hypoxia, HIF-1 α .

Проблема образования спаек после оперативных вмешательств не снижает своей актуальности несмотря на бурное развитие новых подходов к диагностике и лечению хирургических заболеваний органов брюшной полости.

При открытых оперативных вмешательствах по поводу воспалительных заболеваний органов брюшной полости спаечный процесс обязательно присутствует в той или иной степени. Безвыходность данной ситуации побуждает многих исследователей обосновывать положительное физиологическое значение спаечного процесса в отграничении острых воспалительных заболеваний брюшной полости. Известно, что, выполнив свою барьерную функцию, спайки несомненно являются патологическим субстратом для возникновения патологических состояний, в частности, нарушения пассажа вплоть до непроходимости кишечника. С другой стороны, даже полная спаечная облитерация брюшной полости не всегда приводит к проявлению заболевания [1].

Действительно спайки как процесс отграничения воспалительного очага и локализации инфекции являются защитным механизмом, с другой стороны спайки, образованные диссеминировано в брюшной полости, вызывают симптомокомплекс спаечной болезни [2].

При наличии острого инфекционного очага брюшной полости, механизм отграничения его с помощью спаек является в большинстве случаев недостаточно эффективным и, как правило, не справляется со своей биологической функцией. При этом инфекционный процесс становится диссеминированным. Вместе с тем в арсенале современного хирурга есть достаточное количество эффективных ме-

тодов купирования распространённого перитонита и полагаться на локализирующую функцию спаечного процесса нет необходимости. Отсюда следует заключить абсолютную патогенность спаечных межкишечных сращений [1].

Достоверно известно, что формирование спаек связано с повреждением мезотелия, однако однонаправленные воздействия на кишечную стенку могут вызывать как образование спаек, так и полное восстановление мезотелия до первоначального состояния. Важным условием в данной ситуации, на наш взгляд, является воздействие комплекса факторов, таких как кровоснабжение, доступ кислорода, длительность повреждения, повторные воздействия, глубина повреждения кишечной стенки, перистальтика в раннем послеоперационном периоде и другие.

По наблюдениям последних лет, слабо васкуляризированные спайки способны к самостоятельному рассасыванию, такие спайки не приводят к развитию клинической картины спаечной болезни, но при развитии фиброзного процесса, приобретают патологический характер и являются субстратом для развития осложнений. Неоангиогенез также подвержен влиянию стимуляторов роста и может быть как усилен, так и ослаблен под действием ряда факторов [4, 5].

Влияние концентрации кислорода на процессы, происходящие в тканях организма, изучено недостаточно. Множественные позитивные эффекты антигипоксантов указывают на неоспоримую значимость гипоксии, при этом понимание процессов перестало носить сугубо экспериментально-теоретический характер [2].

На современном этапе развития молекулярной биологии были уточнены фундаментальные аспекты гипоксии и связанные с нею метаболические и функциональные процессы на уровне клетки и субклеточных структур. К стимуляторам роста и дифференцировки эпителиальных (мезотелиальных) клеток и неоангиогенеза относятся: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – vascular endothelial grown factor), фактор роста фибробластов (FGF – fibroblasts grown factor), эпидермальный фактор роста (EGF – epidermal grown factor), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующие факторы роста α (TGF- α) и β (TGF- β), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), окись азота (NO), интерлейкин-8, матриксные металлопротеиназы (MMP), GLUT-1 (облегченный глюкозный транспортер 1) и KGF (фактор роста кератиноцитов) [4, 5].

Значительное место в процессах регуляции, доставки и утилизации кислорода, регенерации тканей и образования сосудов занимает фактор, индуцированный гипоксией (HIF-1 α). Исследования участия HIF-1 α в физиологических и патофизиологических процессах увеличиваются с от года к году [6].

Ранее ошибочно считалось, что единственным регулятором количества кислорода у человека являются хеморецепторные клетки каротидных глобусов и эпидермальных телец в зоне бифуркации сонной артерии. За последние 10 лет доказано, что снижении концентрации кислорода в клетке увеличивает активность фактора индуцированного гипоксией, который имеет ключевое значение в системном ответе на недостаток кислорода. Выявлено, что все клетки реаги-

руют на изменение количества кислорода экспрессией соответствующих генов-мишеней, что достигается посредством кислород-зависимой регуляции именно HIF-1 α [6].

HIF-1 α является гетеродимерным протеином состоящим из двух субъединиц HIF-1 α , регулируемая концентрацией кислорода и HIF-1 β , которая экспрессируется постоянно. HIF связывается с элементами ответа на гипоксию в промоторах и регулирует более 200 генов, включая гены белков, участвующих в процессе неоангиогенеза, осуществляющих вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз. HIF-1 α индуцирует транскрипцию более 60 генов, включая VEGF и эритропоэтин, которые участвуют в биологических процессах, таких как ангиогенез и эритропоэз, которые способствуют продвижению и увеличению доставки кислорода в гипоксические области [2, 3].

HIF-1 α постоянно присутствует в клетке при нормоксии, при этом характеризуются коротким периодом полураспада. При стабильно нормальном уровне кислорода в клетке происходит гидроксилирование аминокислотных остатков пролина молекулы HIF-1 α в результате активизации кислород-зависимого фермента – пролилгидроксилазы (PHD), выступающего в роли молекулярного сенсора кислорода [2, 5].

В условиях гипоксии HIF-1 α не подвергается гидроксилированию, остается стабильной и накапливается. В дальнейшем HIF-1 α и HIF-1 β объединяются, образуя HIF-1 в ядре клетки, активируя (через влияние на ДНК): ангиогенез, опосредовано, через фактор роста эндо-

теля сосудов (VEGF), эритропоэз и ферменты гликолиза [5].

Новейшие данные свидетельствуют о влиянии HIF-1 α на работу антимикробных систем, включая регуляцию транскрипции катионных полипептидов и индукцию NO-синтазы. Лейкоциты мигрируют к местам воспаления или инфекции и высвобождают антимикробные факторы H₂O₂ и HOC, которые образуются с помощью системы NADPH-оксидазы в процессе респираторного взрыва, вызывающего локальную гипоксию через HIF-1 α , синтез свободных радикалов лейкоцитами. Помимо контроля ключевых гликолитических ферментов, HIF-1 α также участвует в регуляции внутриклеточного pH [6].

Изучение HIF-1 α ведется в онкологии, кардиологии, и других областях медицины. Поскольку в опухолевых тканях ангиогенез протекает очень интенсивно, внутриопухолевая гипоксия, в результате снижения уровня кислорода при онкологическом процессе, существенно ухудшает прогноз заболевания, способствует метастазированию её клеток [5].

Формирование мезотелия на поверхности поврежденной кишки происходит из фибробласта, который дифференцируется под влиянием окружающих условий, важнейшим из которых, является гипоксия. Регуляция дифференцировки осуществляется через HIF-1 α . На основании данного предположения нами была сформулирована гипотеза: экспрессия HIF-1 α коррелирует с уровнем оксигенации тканей на поверхности кишечной трубки.

Таким образом, изучение влияния HIF-1 α на образование межкишечных сращений является перспективным на-

правлениям в поиске решения проблемы спаечной болезни брюшной полости у оперированных пациентов. Регуляция оксигенации тканей брюшной полости во время и после операции может явиться действенным средством в борьбе с этой тяжелой патологией.

Материал и методы

С целью подтверждения гипотезы нами было проведено пилотное клиническое исследование. В выборку включены 10 пациентов, проходивших в 2019 году лечение в отделениях экстренной, малоинвазивной хирургии и отделении колопроктологии УЗ «2-я Городская клиническая больница» г. Минска. Средний возраст исследуемых составил 52 \pm 8,4 года, доли пациентов мужского и женского пола были равны – 50%.

Для изучения влияния гипоксии на брюшину, были проведены прямая оксиметрия с последующим иммуногистохимическим исследованием данного участка спайки по стандартной методике.

Для регистрации изменений парциального давления (pO₂) в исследуемой ткани производили прямую оксиметрию с помощью оксиметра TCM 400 (Radiometr), сертифицированный Министерством здравоохранения Республики Беларусь (регистрационное удостоверение № ИМ-7.2594/1310). Измерение парциального давления кислорода производили на поверхности спайки перед не иссечением с последующим иммуногистохимическим и морфометрическим исследованием.

Материал для иммуногистохимического исследования подготавливали по

стандартной методике и окрашивали для выявления экспрессии HIF-1 α . Для визуализации использовалась ABC-система (авидин-биотиновая система) (Santa Cruz Biotechnology, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Далее с помощью программы ImageJ производили подсчет интенсивности окраски клеток. При проведении световой микроскопии регистрировали изменения от светло-коричневой до насыщенно коричневой. Исходя из этого клетки, окрашенные в светло-коричневый цвет, оценивались знаком +, часть клеток, окрашенных в коричневый цвет ++, окрашенные в темно-коричневый цвет клетки соответственно оценивались +++.

Так, как выраженность окраски клеток реактивом напрямую зависит от наличия экспрессии HIF-1 α в мембране последних, то интенсивность окраски +, ++ или +++ отображала существующие различия в количестве функционально активных клеток.

Методика проведения общей анестезии у всех исследуемых пациентов не отличалась от таковой при обычных лапароскопических вмешательствах. Прямая оксиметрия проводилась в начале лапароскопической операции, т.е. после постановки портов, инсуффляции газа и введения в брюшную полость датчика. Измерения производили контактным способом, приводя в соприкосновение O₂-проницаемую полипропиленовую мембрану сенсора с участком исследуемой ткани, тем самым добиваясь герметизации исследующего контура от проникновения окружающей газовой среды. Диаметр исследуемого участка ткани был равен диаметру платинового катода и составлял 20 мкм, что предполагало

высокую дифференциацию и высокую точность измерения на поверхности. В результате измерений были получены кинетические кривые поглощения O₂, которые позволили получить представление о стационарном уровне pO₂ в исследуемом органе.

Полученные графические данные обработаны на персональном компьютере с помощью графического редактора TableCurve 2D v5.0. Статистическая обработка цифровых данных осуществлялась с использованием прикладных программ Microsoft Excel for Windows и «STATISTICA 6.0», где были рассчитаны: медиана (Me), нижний Q₁ и верхний Q₃ квартили. Средние значения представлены как среднее арифметическое (M) \pm стандартное отклонение (s). Для проверки равенства медиан применили односторонний дисперсионный анализа Краскела-Уоллиса, достоверными считали различия при p < 0,05.

Результаты и обсуждения

В ходе проведенного исследования выявлена зависимость экспрессии HIF-1 α и парциального давления кислорода на поверхности исследуемой спайки брюшной полости. Данные получены у каждого пациента представлены в таблице 1.

Парциальное давление кислорода варьирует в пределах от 35 до 74 мм рт. ст. и зависит от выраженности кровоснабжения в месте измерения, состояния кровеносного русла и глубины повреждения спаечным процессом стенки кишки.

При иммуногистохимическом изучении препаратов оказалось, что снижение

Таблица 1. Корреляция экспрессии HIF-1α и парциального давления кислорода

№ пациента	Парциальное давление кислорода, мм рт.ст.			Экспрессии HIF-1α
	Me	25%	75%	
1	65	62	67	+
2	48	46	52	+++
3	60	55	66	++
4	59	57	63	++
5	52	49	54	++
6	70	67	74	+
7	40	37	47	+++
8	39	35	42	+++
9	55	52	57	+++
10	53	49	55	++

парциального давления кислорода на поверхности спайки усиливает экспрессию HIF-1α, тем самым, способствует низкой дифференцировке фибробластов в грубую соединительная ткань.

Так при среднем уровне парциального давления $pO_2 = 67,5$ мм рт.ст., ($Q_1 = 64,5$, $Q_u = 70,5$) выраженность экспрессии

слабая (+), то есть нормоксия не способствует активации HIF-1α.

Умеренно выраженная гипоксия, $pO_2 = 56,0$ мм рт.ст., ($Q_1 = 52,5$, $Q_u = 59,5$) также способствует экспрессии HIF-1α средней степени (++).

Существенно более выраженную экспрессию удалось зафиксировать

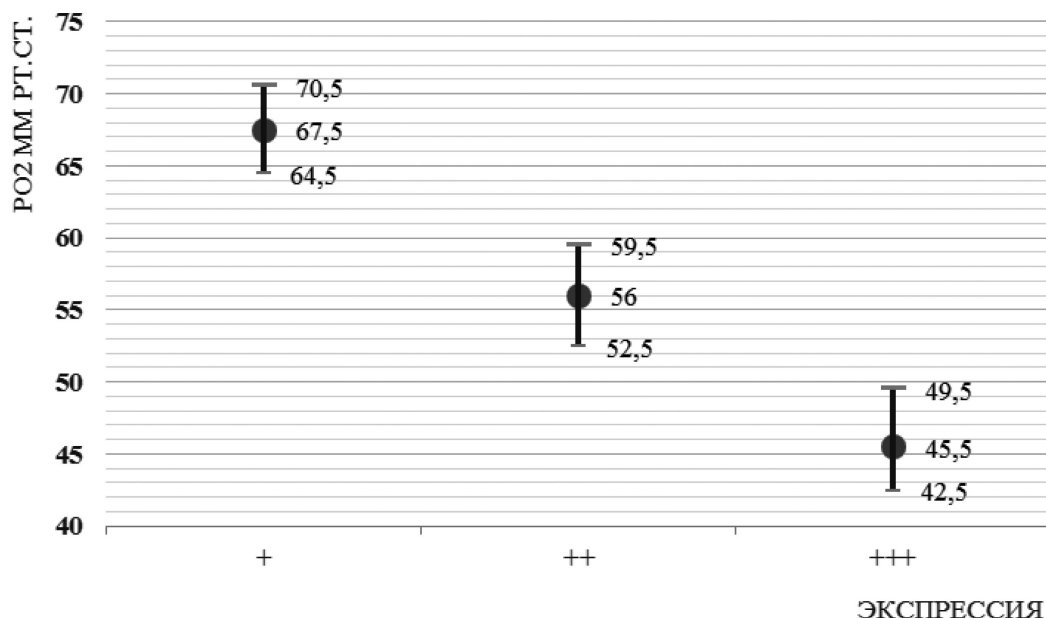


Рис. 1. Корреляция экспрессии HIF-1α и парциального давления кислорода

в ткани, находящейся в состоянии гипоксии, при парциальном давлении $pO_2 = 45,5$ мм рт.ст., ($Q_i = 42,5$, $Q_u = 49,5$) экспрессия HIF-1 α максимальная и составляет (+++).

Применение одностороннего дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса для проверки равенства медиан парциального давления кислорода у пациентов, обобщенный в группы по выраженности экспрессии HIF-1 α , показало достоверные различия – $H(2, N = 10) = 6,33$ $p = 0,042$.

Таким образом, выявлена обратная корреляционная связь между уровнем парциального давления кислорода на поверхности спайки и выраженностью экспрессии сигнального белка HIF-1 α . Сила корреляционной связи требует дальнейшего изучения.

Оказывая влияние на HIF-1 α через регуляцию уровня парциального давления кислорода в брюшной полости, возможна коррекция дифференцировки фибробластов, увеличение количества зрелых мезотелиоцитов, уменьшение выраженности спаечного процесса в брюшной полости у оперированных пациентов.

Представленные данные являются плотным исследованием с целью подтверждения гипотезы. Выявленные зависимости являются строго направленными, исследование сигнальных молекул и направление дифференцировки компетентных клеток требует дальнейшего исследования.

На развитие спаечного процесса в брюшной полости влияет не только гипоксический фактор, а комплекс предрасполагающих и производящих факторов.

Однако на современном этапе неоспоримым является утверждение о том, что именно посредством влияния на дифференцировку фибробластов и развитие неповрежденного мезотелия возможно решить проблему спаечного синдрома в абдоминальной хирургии.

Таким образом, гипоксия тканей способствует экспрессии HIF-1 α , влияет на развитие фибробластов и продукцию грубой волокнистой ткани в брюшной полости.

Снижение гипоксии в зоне оперативного вмешательства очевидно позволит уменьшить вероятность развития спаечного процесса в брюшной полости.

Литература

1. Аюшинова Н. И., Григорьев Е. Г. Госпитальная эпидемиология спаечной болезни брюшной полости / Аюшинова Н. И., Шурыгина И. А., Шурыгин М. Г., Григорьев Е. Г. / Acta Biomedica Scientifica. – 2016; – 1. – 4(110): 115–118.
2. Сахаров В. Н., Литвицкий П. Ф. Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека. Вестник РАМН. – 2015; – (1): 26–31.
3. Шурыгин М. Г., Шурыгина И. А., Дремина Н. Н. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на уровень коллагенообразования в процессе развития постинфарктного кардиосклероза. Сибирский медицинский журнал. – 2008; – 78(3): 53–55.
4. Acun G, Ozdemir H, Sunamak O, Ozdemir ZU, Baskan E, Yazı M, Savas B, Berberoglu U. The effect of single-dose intraperitoneal bevacizumab on peritoneal adhesion formation. Rev Invest Clin. 2018; 70(6): 279–284. doi: 10.24875/RIC.18002589.
5. Tomino Y. Mechanisms and interventions in peritoneal fibrosis. Clin Exp Nephrol. 2012; 16(1): 109–114. doi: 10.1007/s10157-011-0533-y.

Поступила 16.12.2019 г.