

СПАЙКОВА НЕПРОХІДНІСТЬ КИШЕЧНИКУ У ДІТЕЙ ПРИ ДИСПЛАЗІЇ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ

В. Й. Кресюн, М. Г. Мельниченко, П. Б. Антоненко, К. О. Антоненко, А. А. Квашніна
Одеський національний медичний університет

ADHESION ILEUS IN CHILDREN IN THE CONNECTIVE TISSUES DYSPLASIA

V. J. Kresyun, M. G. Mehlnychenko, P. B. Antonenko, K. O. Antonenko, A. A. Kvashnina
Odessa National Medical University

Інтраабдомінальне спайкоутворення у дітей є досить поширеним захворюванням, його значну частоту спостерігають протягом багатьох років, незважаючи на сучасні досягнення медицини та рекомендовані методи профілактики. До 60% усіх операцій релaparотомії у дітей виконують з приводу гострої СНК [1 – 3]. Для розробки ефективних методів профілактики й лікування спайкових ускладнень необхідно більш повне розуміння цього процесу як на клітинному, так і молекулярно–генетичному рівні, а також виявлення медіаторів, залучених у цей процес [3 – 5]. Морфофункціональні зміни сполучної тканини визначають умови для формування імунопатологічних реакцій, що є основою патологічного спайкоутворення [1 – 3, 6, 7]. Відповідно, наявність стигм і ступінь вираженості неспецифічного ДСТ–синдрому можуть бути непрямою ознакою генетичної схильності до патологічного спайкоутворення і оцінки ризику виникнення цього ускладнення у конкретного пацієнта.

Метою дослідження була оцінка ризику формування перитонеальних спайок у дітей за фенотипових ознак ДСТ–синдрому.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежені 57 дітей віком від 3 до 16 років, яких лікували у різних відділеннях Одеської обласної дитячої клінічної лікарні. У 30 дітей (1–ша група) за середньої та значної вираженості стигм неспецифічного ДСТ–синдрому хірургічних захворювань не було. У 27 пацієнтів (2–га

Реферат

Метою дослідження була оцінка ризику формування перитонеальних спайок у дітей за фенотипових ознак дисплазії сполучної тканини (ДСТ–синдром). На першому етапі оцінювали інформативність формалізованих фенотипових клінічних ознак за критерієм χ^2 Пірсона ($p < 0,05$). На другому етапі досліджено прогностичну цінність генетичного поліморфізму гена N–арилацетилтрансферази–2 (NAT2) для визначення ризику виникнення після операції спайкового процесу у черевній порожнині за допомогою методу алель–специфічної ампліфікації NAT2 алелів з використанням ланцюгової реакції з полімеразою (ЛРП). За результатами дослідження у дітей за ДСТ–синдрому дещо частіше виявляли генетичний поліморфізм NAT2, відповідальний за "швидке ацетилювання", вони становлять групу ризику виникнення спайкової непрохідності кишечника (СНК), у них слід проводити комплексні профілактичні заходи, починаючи з інтраопераційного етапу.

Ключові слова: спайкова непрохідність кишечника; дисплазія сполучної тканини; генетичний поліморфізм NAT2; ланцюгова реакція з полімеразою; діти.

Abstract

The investigation objective was to estimate the peritoneal adhesions formation risk in children with phenotypic signs of the connective tissues dysplasia (CTD–syndrome). On the first stage the formalized phenotypic clinical signs were estimated in accordance to χ^2 Pearson criteria ($p < 0.05$). On the second stage a prognostic value of genetic polymorphism of N–arylacetyltransferase–2 (NAT2) gene for determination of risk for the occurrence of postoperative adhesive process in abdominal cavity, using the method of allele–specific amplification of NAT2 allele with the help of polymerase chain reaction (PCR), was determined. In accordance to results of investigation, obtained in children with CTD–syndrome a genetic polymorphism NAT2 was revealed rather more frequently, responsible for "rapid acetylation", they constitute the risk group for the adhesion ileus occurrence, in them complex prophylactic measure must be undertaken, beginning from intraoperative stage.

Keywords: adhesion ileus; dysplasia of connective tissue; genetic polymorphism NAT2; chain reaction with polymerase; children.

група), яких лікували у хірургічних відділеннях, виявлено СНК. Більшість – 23 (85,2%) дітей госпіталізовані з приводу пізньої СНК. Повна непрохідність кишечника виявлена у 22 (81,5%) хворих, 3 (11,1%) – госпіталізовані з приводу СНК повторно протягом періоду спостереження. Хірургічне лікування проведено 24 (88,9%) пацієнтам. Переважали діти старше 6 років (84,4%), тобто, такі, у яких найчастіше виконують хірургічні втручання.

На першому етапі, з огляду на різноманітність проявів ДСТ–синдро-

му, вважали за доцільне оцінити інформативність фенотипових клінічних ознак під час первинного огляду дітей. Для цього проведено обстеження дітей обох груп, встановлені клінічні ознаки, що можуть бути формалізовані для статистичного аналізу. За даними аналізу визначали рівень значущості у розподілі кількості дітей за наявності конкретних градацій клінічних ознак з використанням критерію χ^2 Пірсона ($p < 0,05$). Визначені 13 фенотипових ознак за 34 градаціями. Оцінювали не вірогідність, а інформативність об-

Таблиця 1. Інформативність фенотипових ознак ДСТ-синдрому у дітей

Ознака	Кількість спостережень в групах		χ^2 ($p < 0,05$)
	1-й (n=30)	2-й (n=27)	
Гіпермобільність суглобів	19	1	27,310
Астенічна будова тіла	18	10	6,563
Епікант	5	3	0,122
Гіпертелоризм	5	1	2,028
Блакитні склери	11	1	8,259
Патологія зору	8	2	2,987
Асиметрія носової перегородки	6	2	1,350
Сідлоподібний ніс	4	1	1,244
Готичне піднебіння	9	1	6,172
Аномалії зубо-щелепної системи	11	3	4,375
Прирослі мочки	4	4	0,216
Відстовбурчені вуха	6	5	0,044
Бліда шкіра	16	8	2,828
Виразений венозний рисунок	12	5	2,440
Гіпереластичність шкіри	13	2	9,343
Шкіра як замша	9	2	3,988
Зморшкуватість шкіри	5	3	0,122
Пігментні плями	7	3	0,945
Наявність «рубчиків на шкірі»	2	1	0,122
Деформація грудної клітки	8	1	4,986
Порушення постави	14	5	4,644
Арахнодактилія	7	1	3,902
Клинодактилія	10	3	3,304
Неповна шкірна синдактилія	2	1	0,122
Плоска стопа	11	2	6,374
Пола стопа	1	0	0,772
Сандалеподібна щілина «Натоптень»	3	0	2,461
Hallux valgus	5	1	2,028
Поперечна окресленість стоп	1	0	0,772
Схильність до виникнення гематом	3	1	0,588
Грижі	13	4	5,042
Діастаз прямих м'язів живота	9	2	3,988
Слабкість м'язів живота	1	0	0,772
	6	2	1,350

раних ознак, що кількісно визначає внесок кожної ознаки у патологічний стан дітей 1—ї та 2—ї груп.

На другому етапі, зважаючи на наявність даних про вплив інтенсивності процесів ацетилювання на ризик виникнення спайок після операції, досліджено прогностичну цінність генетичного поліморфізму гена NAT2 для визначення ризику виникнення спайкового процесу у черевній порожнині після операції [8]. Для цього визначали генотип ацетилювання у 36 хворих за допомогою методу алель—специфічної ампліфікації NAT2 алелів з використанням ЛРП. Для визначення поліморфізму NAT2 використаний набір специфічних праймерів для дикого

(wt) і мутантного (mut) алелів досліджуваного гена M1, M2, M3 [2]. Матеріалом для дослідження була венозна кров.

Досліджені такі варіанти поліморфізму NAT2:

— NAT2*5A (C 481 — T) — однонуклеотидна заміна цитозину на тимін у положенні 481;

— NAT2*6A (G 590 — A) — однонуклеотидна заміна гуаніну на аденін у положенні 590;

— NAT2*7A (G 857 — A) — заміна гуаніну на аденін у положенні 857.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами першого етапу досліджень, найбільшу статистичну

інформативність мали ознаки структурної чи функціональної недостатності сполучної тканини, зокрема, гіпермобільність суглобів ($\chi^2 = 27,310$, $p < 0,01$). Тобто, у більшості хворих наявність цієї ознаки може бути достатньою для визначення ДСТ—синдрому, особливо у дітей старшого віку. У дітей молодшого віку доцільно проводити комплексну оцінку, оскільки гіпермобільність суглобів може бути проявом морфофункціональної незрілості сполучної тканини.

У табл. 1 представлено співвідношення кількості дітей 1—ї та 2—ї груп за певними категоріями 13 фенотипових ознак (за 34 градаціями), а також значення інформаційної міри для цих ознак. Відповідно до критичних значень, статистично значущими ($p < 0,05$) є значення критерію χ^2 більше 3,841 при заданій кількості ступенів свободи.

Найбільш високий показник χ^2 виявлений при гіпермобільності суглобів (27,310) — це основна фенотипова ознака ДСТ—синдрому. Достатньо високою була відмінність таких ознак, як гіпереластичність шкіри (9,343), блакитні склери (8,259), астенічна статура (6,563), плоска стопа (6,374), високе "готичне" піднебіння (6,172), схильність до утворення гематом навіть за незначної травми (5,042), наявність вродженої деформації грудної клітки (4,986) та порушень постави (4,644), аномалії зубо—щелепної системи (4,375), наявність грижі (3,988). Ці фенотипові риси, відповідно, мають найбільше значення для скринінгової оцінки недостатності сполучної тканини у клінічній практиці. За представленою оцінкою інформативності фенотипових ознак вони розподілені на провідні, другорядні та помірні. Так, провідною ознакою за максимального значення χ^2 (27,310) встановлена гіпермобільність суглобів.

До другорядних ознак віднесені фенотипові прояви з χ^2 більше 5 (6 ознак); до помірних — χ^2 менше 5 (7 ознак). Належність фенотипової ознаки до рівня інформативності може свідчити про ступінь системної диспластичності.

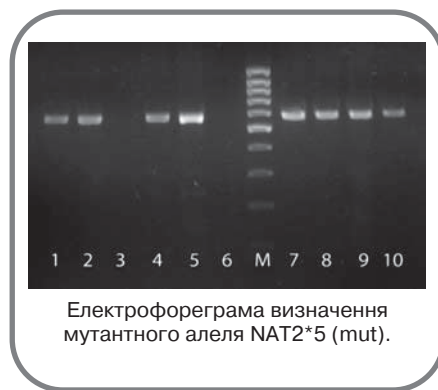
У більшості дітей відзначали поєднання провідних ознак диспластичності. Розподіл частот окремих стигм дисплазії у дітей при СНК був подібним до такого у дітей 1—ї групи. Частота стигматизації у дітей 1—ї групи значно більша за таку в популяції [4, 6]. Середня кількість стигм, визначена у дітей при СНК, становила $10,38 \pm 4,55$, що значно більше, ніж у здорових дітей (t -критерій Ст'юдента 4,40, $p < 0,05$) [4, 6].

Нами встановлено залежність між кількістю стигм ДСТ та частотою утворення перитонеальних спайок. Для визначення статистичної значущості зв'язку між вираженістю спайкового процесу та кількістю зовнішніх ознак ДСТ—синдрому обчислений коефіцієнт кореляції Пірсона між значеннями індексу інтраабдомінального спайкового процесу та кількістю визначених ознак ДСТ—синдрому для кожного пацієнта 1—ї групи.

Коефіцієнт кореляції (r) становив 0,699, що свідчило про наявність прямого зв'язку між досліджуваними ознаками. Число ступенів свободи (f) становило 30. Тіснота (сила) зв'язку за шкалою Чеддока — помітна; t -критерій Ст'юдента дорівнював 5,348. Критичне значення t -критерію Ст'юдента за такої кількості ступенів свободи становило 2,042 ($p < 0,05$), відповідно, залежність ознак статистично значуща.

Рівняння парної лінійної регресії: $y = 0,30850 + 1,34097x$. Коефіцієнт детермінації (r^2) становив 0,488, що свідчило про наявність вираженого прямого зв'язку між величинами досліджуваних ознак. Середня помилка апроксимації становила 31,7%.

Таким чином, наявність фенотипових ознак ДСТ—синдрому у більшості (93,8%) дітей при СНК слід вважати фактором схильності до утворення спайок після операції. Встановлена пряма залежність між кількістю фенотипових ознак ДСТ—синдрому та частотою утворення інтраабдомінальних спайок. На наш погляд, ДСТ може реалізуватися великою кількістю клінічних варіантів, і відповідно, надмірне спайкування після операції може бути



одним з проявів диспластично—залежних процесів. Це дозволяє виділити групу ризику дітей щодо утворення перитонеальних спайок на підставі зовнішніх ознак, які виявляють під час загального огляду та не потребують додаткового часу чи обладнання. Це має особливе значення під час надання екстреної допомоги таким хворим. Відповідно, хірургічне лікування дітей з ознаками ДСТ—синдрому потребує комплексного підходу та застосування заходів профілактики надмірного спайкоутворення, наприклад, інтраопераційного використання антиадгезивних гелів.

На другому етапі досліджено прогностичну цінність генетичного поліморфізму гена NAT2 для визначення ризику виникнення після операції спайкового процесу у черевній порожнині. На *рисунку* представлені результати електрофорезу гена NAT2 в агарозному гелі дикого алелю M1. Доріжка, позначена літерою M, відповідає маркерам молекулярної маси, що дозволяють визначити молекулярну масу ампліфікованих фрагментів. Якщо отриманий зразок містить алель досліджуваного гена, утворюються фрагменти ДНК

масою 586 п. н., що візуалізуються у відповідному місті гелю. Відсутність рестрикції свідчить про відсутність досліджуваного алеля. Наприклад, у зразках на доріжках 1, 2, 4, 5, 7 — 10 ампліфікація відбулась, відповідно, генотип пацієнта wt/wt або mut/mut. На доріжці 3 ампліфікація не відбулась, відповідно, досліджуваний алель відсутній, генотип пацієнта wt/wt. Результати визначення частоти генотипів та окремих алелів генів у пацієнтів при СНК представлені у *табл. 2*.

Мутацій у положенні 857 не було, відповідно, всі діти були гомозиготними носіями алеля дикого типу генотипу NAT2*7A (G 857 — A). При дослідженні генотипу NAT2*5A (C 481 — T) у дітей при СНК виявлені найбільш різноманітні варіанти генотипів, зокрема, 9 (33,3%) дітей були гомозиготними носіями дикого алеля, 18 (44,4%) — гетерозиготними за цим варіантом генетичного поліморфізму, у 6 (22,2%) — виявлений гомозиготний мутантний ген. Відповідно до генотипу NAT2*6A (G 590 — A), більшість — 15 (55,6%) пацієнтів були гетерозиготними, 12 (44,4%) — гомозиготними носіями дикого типу гена. Жоден пацієнт при СНК не був гомозиготним носієм мутантного алеля NAT2*6A.

Дітей, які були гомозиготними носіями будь—яких мутантних генотипів або гетерозиготними за обома поліморфними алелями, вважали носіями генотипу "повільного ацетилювання" (SA); дітей гомозиготних носіїв диких варіантів генотипів — "швидкого ацетилювання" (RA), гетерозиготних носіїв одного з мутантних алелів — "помірного ацетилювання" (IA). Оскільки, за даними літератури, за активністю про-

Таблиця 2. Генотип ацетилювання NAT2 у дітей при СНК

Варіант поліморфізму	Генотип	Кількість спостережень	
		абс.	%
NAT2*5A	wt/wt	9	33,3
	wt/mut	12	44,4
	mut/mut	6	22,2
NAT2*6A	wt/wt	15	55,6
	wt/mut	12	44,4
	mut/mut	0	0
NAT2*7A	wt/wt	27	100

Таблиця 3. Генотип ацетилювання NAT2 у дітей за наявності ДСТ-синдрому

Варіант поліморфізму	Генотип	Кількість спостережень	
		абс.	%
NAT2*5A	wt/wt	10	33,3
	wt/mut	16	53,3
	mut/mut	4	13,3
NAT2*6A	wt/wt	14	46,7
	wt/mut	15	50,0
	mut/mut	1	3,3
NAT2*7A	wt/wt	30	100

пациєнтів RA та IA істотно не різнилися [1] та беручи до уваги дуже малу кількість носіїв генотипу "швидкого ацетилювання", для подальшого аналізу вважали за доцільне об'єднати їх в одну групу (RA/IA).

За даними дослідження, у 1—й групі 18 (66,67%) пацієнтів належали до групи RA/IA, з них лише 1 був носієм генотипу "швидкого ацетилювання". Генотип "повільного ацетилювання" виявлений у 9 дітей.

Крім того, вивчено частоту виявлення генотипів ацетилювання та окремих видів генетичного поліморфізму NAT2 у дітей залежно від наявності фенотипових ознак ДСТ—синдрому. Для цього вивчений генотип ацетилювання у 30 дітей за помірної та вираженої стигматизації фенотипових ознак ДСТ—синдрому. Частота окремих варіантів генетичного поліморфізму NAT2 наведена у *табл. 3*.

Розщеплення генотипів також спостерігали лише за першими двома варіантами поліморфізму. Зокрема, гомозиготними носіями дикого типу NAT2*5A були 10 (33,3%) дітей з ознаками ДСТ—синдрому, 16 (53,3%) — гетерозиготні носії мутантного гена, 4 (13,3%) — гомозиготні за мутантним алелем. Відповідно до генотипу NAT2*6A, 1 (3,3%) дитина була гомозиготним носієм за мутантного варіанта гена, 15 — гетерозиготними, 14 — гомозиготними за диким варіантом гена NAT2.

За сумарною оцінкою генотипу NAT2 за наявності ДСТ—синдрому

до групи RA/IA належали 60% пацієнтів, у 40% — виявлений генотип "повільного ацетилювання" NAT2.

Отримані співвідношення генотипів істотно різняться від визначеного у дослідженні П. Б. Антоненко [9] поширення генотипів серед населення Одеського регіону, основанийо на вивченні генетичного поліморфізму NAT2 у 122 здорових добровольців, з них до RA віднесені 8,2%, IA — 37,7%, SA — 54,1%.

Висновок про статистичну значущість відмінностей зроблений на підставі обчислення *t*—критерію Ст'юдента для відносних показників, який становив 2,02 (за критичного значення 1,977), для різниці між частотою виявлення генотипів ацетилювання у дітей при СНК. Відповідно, генотип "швидкого ацетилювання" в 1,5 разу частіше відзначали у дітей за наявності перитонеальних спайок, ніж у контрольній групі ($p < 0,05$), що може бути фактором прогнозування спайкових ускладнень після операції.

В свою чергу, значення парного *t*—критерію у дітей при ДСТ—синдромі становило 1,41 (критичне для $p = 0,05$ значення 1,977). Тобто, підстав для відхилення нульової гіпотези недостатньо для такої кількості пацієнтів у порівнюваних групах. Незважаючи на значно більшу за популяційну кількість носіїв генотипу "швидкого" та "помірного" ацетилювання серед дітей з ДСТ—синдромом, відмінності не були статистично достовірними за такого обсягу

дослідження.

Таким чином, наявність фенотипових ознак ДСТ—синдрому у більшості (93,8%) дітей при СНК можна вважати фактором схильності до появи після операції спайкових ускладнень. Встановлена пряма залежність між кількістю фенотипових ознак ДСТ—синдрому та частотою утворення інтраабдомінальних спайок. Дослідження прогностичної цінності генетичного поліморфізму гена NAT2 дозволяє прогнозувати появу після операції спайкових ускладнень у дітей. Діти, які є носіями алелів NAT2, що відповідають за генотип "швидкого" та "помірного" ацетилювання, становлять групу ризику виникнення СНК, їм потрібне проведення комплексних профілактичних заходів, починаючи з інтраопераційного етапу.

ВИСНОВКИ

1. У 93,8% дітей СНК виникла на тлі ДСТ—синдрому, наявність зовнішніх ознак цього стану може бути предиктором виникнення після операції спайкових ускладнень у дітей. Встановлена пряма залежність між кількістю фенотипових ознак ДСТ—синдрому і частотою утворення інтраабдомінальних спайок.

2. Визначення генетичного поліморфізму гена NAT2 дозволяє прогнозувати появу після операції спайкових ускладнень у дітей.

3. Діти, які є носіями алелів NAT2, що відповідають за генотип "швидкого" та "помірного" ацетилювання, становлять групу ризику виникнення СНК, їм потрібне проведення комплексних профілактичних заходів, починаючи з інтраопераційного етапу.

4. У дітей за наявності ДСТ—синдрому децю частіше виявляли генетичний поліморфізм гена NAT2, відповідальних за "швидке ацетилювання", проте, необхідне для відхилення нульової гіпотези значення *p* рівня значущості не досягнуте за такого обсягу дослідження, отже, потрібний подальший аналіз.

ЛІТЕРАТУРА

1. Метод прогнозування спаечної хвороби брюшини у дітей / Ф. Г. Садыков, О. А. Комаров, В. В. Викторов [и др.] // Современные технологии в педиатрии и детской хирургии: материалы III Рос. конгр. — М., 2004. — С. 502 — 503.
2. Arung W. Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions / W. Arung, M. Meurisse, O. Detry // World J. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 17. — P. 4545 — 4553.
3. Cahill R. A. Cytokine orchestration in post-operative peritoneal

- adhesion formation / R. A. Cahill, H. P. Redmond // *Ibid.* — 2008. — Vol. 14. — P. 4861 — 4866.
4. Саркисова О. В. Дисплазия соединительной ткани у детей как фактор риска развития послеоперационных спаечных осложнений / О. В. Саркисова, В. И. Петлах, В. С. Сухоруков // *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии.* — 2011. — Т. 56, № 3. — С. 62 — 65.
 5. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans / M. Blum, A. Demierre, D. M. Grant [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1991. — Vol. 88. — P. 5237 — 5241.
 6. Кадурина Т. И. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей / Т. И. Кадурина, В. Н. Горбунова. — СПб.: Элби—СПб, 2009. — 704 с.
 7. Refinement of the prediction of N—acetyltransferase 2 (NAT2) phenotypes with respect to enzyme activity and urinary bladder cancer risk / S. Selinski, M. Blaszkewicz, K. Ickstadt [et al.] // *Arch.Toxicol.* — 2013. — Vol. 12. — P. 2129 — 2139.
 8. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms / W. H. David, A. D. Mark, J. F. Adrian [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention.* — 2000. — P. 29 — 42.
 9. Антоненко П. Б. Вплив поліморфізму процесів біотрансформації ліків на ефективність протитуберкульозної хіміотерапії у людини: автореф. дис. ... д—ра мед. наук : спец. 14.01.28 — клінічна фармакологія / П. Б. Антоненко. — Одеса, 2015. — 37 с.

