

УДК 577.175.52:616.36-008.5-089-07

ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЖЕЛЧИ БОЛЬНЫХ ЖЕЛЧНОКАМЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

М.И. Милешко, Е.М. Дорошенко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Исследованы уровни ароматических аминокислот, серотонина, метаболитов биогенных аминов в плазме крови здоровых лиц, больных с негепатобилиарной хирургической патологией и ЖКБ. Установлено, что при ЖКБ имеет место повышение уровней предшественников биогенных аминов, серотонина и метаболитов биогенных аминов по сравнению с остальными исследованными группами.

Ключевые слова: желчнокаменная болезнь, триптофан, серотонин, холецистэктомия.

Plasma levels of aromatic amino acids, serotonin and metabolites of biogenic amines of healthy subjects, patients with surgical pathology other than hepatobiliary one, and cholelithiasis, were studied. The increased levels of precursors of biogenic amines, serotonin and metabolites of biogenic amines compared to other groups examined were found in cholelithiasis.

Key words: cholelithiasis, tryptophan, serotonin, cholecystectomy.

Несмотря на успехи в совершенствовании методов и тактики лечения желчнокаменной болезни, в значительном проценте случаев это заболевание осложняется холедохолитиазом с развитием механической желтухи [1, 3, 4, 6], в первую очередь, из-за несвоевременной диагностики или невыполненной по различным причинам холецистэктомии. Послеоперационная летальность при этом осложнении остается высокой и составляет, по данным разных авторов, от 3,2% до 7,2% [7], что делает актуальным поиск новых методологических подходов к определению ведущих патофизиологических механизмов, определяющих тяжесть состояния, выбор рациональной тактики предоперационной подготовки, послеоперационного лечения, а также прогноза у данной категории больных.

В формировании расстройств печеночной гемодинамики, микроциркуляции, нарушений репарации печени у больных гепатобилиарной патологией важную роль играют аминергические процессы [5, 10]. Установлено снижение уровней серотонина и норадреналина при экспериментальном внепечёночном холестазае у собак, которые приходили к норме после устранения обтурации желчных ходов [11]. Однако комплексное клинико-биохимическое обследование пациентов с исследованием формирования фонда биогенных аминов и родственных соединений (предшественников и метаболитов) в физиологических жидкостях (кровь, желчь) у больных желчнокаменной болезнью практически не проводилось.

Очевидно, что наличие таких сведений позволило бы определить, имеются ли изменения в фонде биогенных аминов в крови или желчи больных при неосложненной желчнокаменной болезни, в том числе после ее оперативного лечения, сопровождаются ли ее осложнения (механический холестаз) иными по характеру или более выраженными сдвигами этих веществ. Это позволит правильно оценить динамику изменений этих показателей после оперативного лечения и тем самым оптимизировать существующие для желчнокаменной болезни лечебно-диагностические программы.

Так как особый интерес представляет исследование фонда биогенных аминов в динамике послеоперационного лечения, наиболее актуальным является определение показателей, характеризующих системы биогенных моноаминов у послеоперационных больных, оперированных как по поводу неосложненной желчнокаменной болезни, так и в случаях, сопровождающихся наличием острой печеночной недостаточности.

Целью настоящего исследования явилось выяснение различий в уровнях предшественников биогенных аминов, их кислых метаболитов и серотонина у больных желчнокаменной болезнью, больных с общесоматической хирургической патологией и практически здоровых лиц.

Материалы и методы

Нами обследован 21 больной, находившийся на лечении в хирургическом отделении городской

клинической больницы №4 после оперативного лечения неосложненной желчнокаменной болезни и общесоматических хирургических заболеваний. Состояние всех больных на момент исследования оценивалось как удовлетворительное. Контрольную группу составляли практически здоровые лица.

Все обследованные разделены на следующие группы:

1. 10 больных с желчнокаменной болезнью (ЖКБ) после плановой открытой холецистэктомии и дренирования общего желчного протока по Пиковскому (мужчин – 6, женщин – 4).

2. 11 больных с паховыми, пупочными грыжами, оперированных в плановом порядке (мужчин – 5, женщин – 6).

3. 10 практически здоровых лиц (мужчин – 3, женщин – 7).

Возраст больных первой группы составлял от 25 до 68 лет, второй группы – от 30 до 60 лет, третьей – от 20 до 37 лет.

У больных первой группы кровь для исследования забирали на 10-12 сутки после операции; желчь отбиралась из дренажа в день забора крови, не более чем через 1 час после него.

У больных второй группы кровь забирали также на 10-12 сутки после операции.

В день забора крови и желчи больным проводилось лабораторное обследование на основе общепринятых биохимических методов, применяемых у больных с патологией гепатобилиарной системы.

Кровь забиралась в гепаринизированные пробирки, плазму получали центрифугированием на холоду при 3000 об/мин в течение 15 мин и отбирали аспирацией, слой плазмы 5 мм над эритроцитами не использовали. Пробы желчи и плазмы крови обрабатывали равным объемом 1 М хлорной кислоты, содержащей 10 мкМ ванилиновой кислоты (внутренний стандарт), 50 мг/л метабисульфата натрия в качестве антиоксиданта и 25 мг/л ЭДТА. Пробы центрифугировали 10 мин при 10000 g, супернатанты немедленно отделяли отсасыванием и хранили при -18°C до анализа. Перед проведением анализа пробы повторно центрифугировали.

Определение уровней биогенных аминов, их предшественников и метаболитов проводили методом ВЭЖХ на хроматографической системе Agilent 1100, состоящей из градиентной системы

подачи растворителя G1311A, ручного инжектора Rheodyne 7725 с петлей 20 мкл, термостата колонок G1316A, детектора флуоресценции G1321A. Управление прибором и сбор данных осуществляли с помощью системы Agilent ChemStation 08.03.

Разделение биогенных аминов и родственных соединений проводили с помощью ион-парной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции. Колонка 3x250 мм Separon SGX C₁₈, 8 мкм (Элсико, Россия) термостатировалась при 27°C. Подвижная фаза: 0,1 М КН₂РO₄, 0,017 М СН₃СООН, рН 3,65; 180 мг/л гептилсульфоната натрия, 180 мг/л октилсульфоната натрия, 50 мг/л ЭДТА, 10% (об.) метанола. Скорость потока 0,5 мл/мин. Детектирование: длина волны возбуждения 280 нм, излучения – 320 и 340 нм.

Идентификация определяемых соединений и количественная обработка хроматограмм проводилась с использованием метода внутреннего стандарта. Для определения уровней триптофана, 5-окситриптофана, серотонина, 5-оксииндолуксусной кислоты и внутреннего стандарта использовался сигнал с длиной волны излучения 340 нм, для определения остальных веществ – 320 нм. Идентификация веществ в пробах проводилась по совпадению времени удерживания, а также спектров флуоресценции на вершине пиков при длине волны возбуждения 280 нм со спектрами соответствующих стандартов.

Статистическая обработка данных (сравнение средних значений в группах с помощью t-критерия Стьюдента) проводилась с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что группа больных ЖКБ характеризуется (табл. 1) (здесь и далее обсуждаются только статистически достоверные различия) более высокими уровнями тирозина (в 4,55 раза), 5-окситриптофана (в 4,62 раза), метаболитов адреналина и норадреналина: восстановленного – 3-метокси-4-оксифенилэтиленгликоля (в 14,9 раза) и окисленного – ванилинминдальной кислоты (в 3,06 раза), метаболита дофамина 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (в 3,43 раза), а также серотонина (в 5,7 раза) и его практически единственного метаболита 5-оксииндолуксусной кислоты (в 4,6 раза) в плазме крови. Уровни этих соединений в желчи были сходными или незначительно ниже, чем в плазме крови, за исключением триптофана и серо-

Таблица 1. Уровни биогенных аминов, их предшественников и метаболитов в плазме крови обследованных больных, ммоль/л ($M \pm m$)

Группы обследованных	Здоровые	Больные с грыжами	Больные ЖКБ после холецистэктомии
Исследуемые показатели			
Ванилилиндиальная кислота	120,47 ± 24,249	195,92 ± 41,419	369,0 ± 72,62* □ 213,0 ± 37,54
3,4-диоксифенилаланин	601,37 ± 109,188	134,90 ± 58,992*	481,6 ± 43,91 □ 386,4 ± 97,84
Тирозин	71540,9 ± 5844,9	59272,8 ± 4338,2	325381 ± 60831*# □ 68873,9 ± 27817,71
3-метокси-4-оксифенилэтиленгликоль	44,88 ± 4,811	96,47 ± 24,434	669,3 ± 127,90*# □ 297,4 ± 83,13
5-окситриптофан	2,36 ± 0,802	9,77 ± 0,623*	10,9 ± 1,91* □ 10,3 ± 1,65
3,4-диоксифенилуксусная кислота	0,67 ± 0,059	0,91 ± 0,131	2,3 ± 0,31*# □ 3,6 ± 0,50
5-оксиндиолуксусная кислота	0,65 ± 0,152	1,54 ± 0,331*	3,0 ± 1,07* □ 1,2 ± 0,35
L-триптофан	53114,1 ± 5393,1	42573,4 ± 2825,2	124884 ± 35112# □ 19128,9 ± 8414,20
3-метокси-4-оксифенилуксусная (гомованилиновая) кислота	39,12 ± 3,561	41,10 ± 3,886	77,7 ± 17,52 □ 29,6 ± 20,77
5-окситриптамин (серотонин)	32,46 ± 6,226	22,05 ± 12,246	184,5 ± 67,46*# □ 16,8 ± 4,34

* $p < 0,05$ по отношению к группе практически здоровых лиц# $p < 0,05$ по отношению к группе больных с грыжами

□ - в числителе - в плазме крови больных ЖКБ, в знаменателе - в желчи больных ЖКБ.

Таблица 2. Значения стандартных биохимических тестов в плазме крови обследованных больных ($M \pm m$)

Группы обследованных	Здоровые	больные с грыжами	Больные ЖКБ после холецистэктомии
Щелочная фосфатаза, ммоль фосфата/ч л	0,927 ± 0,133	1,334 ± 0,161	1,620 ± 0,093*
GOT, мкмоль/л ч	0,388 ± 0,0361	0,493 ± 0,0353	0,539 ± 0,0471*
GPT, мкмоль/л ч	0,596 ± 0,0377	0,9527 ± 0,0123*	0,803 ± 0,0627*
Билирубин, ммоль/л	9,70 ± 0,423	10,82 ± 0,807	12,9 ± 1,12*
Прямой билирубин, ммоль/л	2,91 ± 0,169	3,00 ± 0,178	3,0 ± 0,22*
Альфа-амилаза, г/л ч	27,80 ± 0,917	27,00 ± 0,884	31,6 ± 0,65*#

* $p < 0,05$ по отношению к группе практически здоровых лиц# $p < 0,05$ по отношению к группе больных с грыжами

тонина (их уровни в плазме и желчи различались практически на порядок (табл. 1)). Таким образом, для больных ЖКБ характерны существенно более высокие уровни как предшественников катехоламинов и серотонина, так и их метаболитов, а также серотонина. Обращает на себя внимание, что ускорение синтеза и деградации биогенных аминов у этой категории больных опосредовано доступностью предшественников, включая непосредственный предшественник серотонина 5-окситриптофан, для которого декарбоксилирование до серотонина является практически единственным метаболическим превращением, причем эта реакция не является лимитирующей скоростью синтеза серотонина. Следовательно, больные ЖКБ после оперативного лечения имеют более высокую, чем здоровые лица, активность аминергических процессов.

Эти больные также характеризуются более высокой активностью альфа-амилазы (на 14%) по

сравнению с практически здоровыми лицами (табл. 2); по отношению к ним были достоверно выше также активности щелочной фосфатазы, трансаминаз, уровни билирубина, в том числе прямого, хотя они и не превышали границ нормальных значений (за исключением активностей трансаминаз).

Группа больных с хирургической патологией негепатобилиарного происхождения (грыжи) характеризовалась менее выраженными, но односторонними с ЖКБ отличиями от группы практически здоровых лиц по уровням исследованных соединений в плазме крови. Тем не менее, между больными ЖКБ и негепатобилиарной хирургической патологией имеются статистически достоверные различия. Повышение уровней тирозина и 3-метокси-4-оксифенилэтиленгликоля, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты и серотонина у больных ЖКБ было достоверным и по отношению к больным с хирургической патологией негепатобилиарного происхождения.

Уровень триптофана у больных ЖКБ был выше в 2,93 раза (хотя его различие с группой практически здоровых лиц и не было достоверным).

Таким образом, у больных негепатобилиарной патологией имело место только некоторое ускорение деградации серотонина на фоне его неизменной концентрации. Повышение скорости синтеза биогенных аминов, опосредованное доступностью предшественников (ароматических аминокислот), имеет место только у больных ЖКБ.

Изменения в значениях стандартных биохимических тестов у больных негепатобилиарной хирургической патологией отсутствовали, кроме повышенной на 62% активности аланиновой трансаминазы.

Таким образом, в пуле аминокислот-предшественников, биогенных аминов и их метаболитов при ЖКБ имеются существенные изменения, которые проявляются повышением уровня (и соот-

ветственно, доступности) предшественника серотонина – триптофана, активацией его гидроксирования, что приводит к повышению концентрации 5-окситриптофана, а также активностей аминергических процессов, что проявляется повышением уровней всех исследованных метаболитов биогенных аминов. Все эти изменения имеют место после оперативного лечения ЖКБ, являясь достоверными на 10-12 сутки после операции.

Заключение

Между группами здоровых лиц, больных с негепатобилиарной хирургической патологией и ЖКБ имеются статистически достоверные различия по ряду показателей, характеризующих синтез и деградацию катехоламинов и серотонина, отражающие различия в функционировании APUD-системы у этих групп, так как до 95% серотонина плазмы синтезируется в ее клетках [2, 8, 9]. Неосложненная ЖКБ характеризуется повышением уровня (и, соответственно, доступности) триптофана и 5-окситриптофана, а также повышением уровней всех исследованных метаболитов биогенных аминов, причем все эти изменения отмечены на 10-12 сутки после оперативного лечения ЖКБ. Представляет интерес в дальнейших исследованиях сравнение групп больных с механической желтухой доброкачественного генеза и больных неосложненной ЖКБ для выяснения, какие из обнаруженных изменений характерны для механической желтухи, что позволит выявить характерные признаки внепеченочного холестаза. Больные с грыжами имеют измененный фонд свободных аминокислот и их производных – биогенных аминов, однако характер аминокислотного дисбаланса у них не совпадает с таковым при ЖКБ. Тем не менее, такие больные могут входить в контрольную группу при исследовании пула биогенных аминов и родственных соединений при механической желтухе онкологического генеза. С целью фундаментального исследования аминергического фона у больных внепеченочным холестазом следует, однако, ориентироваться на группу здоровых лиц в качестве контроля.

Литература

1. Волков С.В., Еремеев А.Г., Дунаевский О.А., Голубев А.А., Лебедев С.В. Хирургическое лечение холангита // Актуальные вопросы гепатологии – Гродно, 2000 – 72 с.

2. Дзюбановский И.Я. Хирургические способы предупреждения и лечения демпинг-синдрома в зависимости от состояния регионального кровотока желудка и вегетативно-гормонального гомеостеза: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.27 / Московский гос. стоматологический ин-т им. Н.А. Семашко. – М., 1992. – 35с.
3. Ившин В.Г., Лукичев О.Д. Малоинвазивные методы декомпрессии желчных путей у больных механической желтухой. – Тула: Гриф и К, 2003. – 182 с.
4. Маслакова Н.Д. Направленная коррекция аминокислотного дисбаланса на этапах хирургического лечения внепеченочного холестаза // Авт. дис. ... канд. мед. наук. – Гродно, 1994 – 99 с.
5. Козырев М.А. Заболевания печени и желчных путей. – Минск, 2002 – 247 с.
6. Мовчун Л.А., Колосс О.Е., Оппель Т.А., Абдулаева У.А. Хирургическое лечение хронического калькулезного холецистита и его осложнения. // Хирургия – 1998 - №1 – С.8-10.
7. Обтурационный холестаз: успехи и нерешенные вопросы диагностики и лечения / П.В. Гарелик, Г.Г. Мармыш, И.Т. Цилиндз, М.И. Милешко // Актуальные вопросы гепатологии / под ред. В.М. Цыркунова. – Материалы V Междунар. симпозиума гепатологов Беларуси (25-26 сентября 2002 г.). – Гродно, 2002. – С. 46.
8. Овсянников В.И., Березина Т.А. Регуляция моторики желудочно-кишечного тракта: нейромедиаторная и гормональная функция серотонина // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1994. – Т. 80, № 5. – С. 1-15.
9. Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Яковлева П.Д. АПУД-система: морфофункциональные основы участия регуляторных пептидов и биогенных аминов в физиологических и патологических процессах // Регуляторные пептиды и биогенные амины: Радиобиологические и онкорadiологические аспекты: Сб. научных трудов. Обнинск, 1992. – С. 6-28
10. Bargsten G., Grube D. Serotonin storage and chromogranins: an experimental study in rat gastric endocrine cells // J. Histochem. Cytochem. – 1992. – Vol. 40, N. 8. – P. 1147-1155.
11. Effects of experimental obstructive jaundice on contractile responses of dog isolated blood vessels: role of endothelium and duration of bile duct ligation. / Utkan Z.N., Utkan T., Sarioglu Y., Gonullu N.N. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Australia, 2000 – May-Jun. – V.27, N.5-6. – P.339-344.

Resume

CHARACTERISTICS OF THE PROFILE OF BIOGENIC AMINES AND RELATIVE COMPOUNDS IN THE BLOOD PLASMA AND BILE OF PATIENTS WITH CHOLELITHIASIS

M.I. Mileszko, Ye.M. Doroshenko
Grodno State Medical University

Aim of the study: evaluation of differences in the plasma levels of aromatic amino acids, serotonin and metabolites of biogenic amines of healthy subjects, patients with surgical pathology other than hepatobiliary one, and cholelithiasis. The increased levels of precursors of biogenic amines, serotonin and metabolites of biogenic amines compared to other groups examined were found. Bile levels of the compounds studied in patients with cholelithiasis were slightly lower than corresponding plasma levels e.g. those for tryptophan and serotonin which were about 10-fold lower.