

Дмитрієв Д.В.

ГІПЕРАЛГЕЗІЯ В РАННЬОМУ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОМУ ПЕРІОДІ У ДІТЕЙ ПРООПЕРОВАНИХ З ПРИВОДУ ОНКОЛОГІЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ СУПРОВОДЖУЄТЬСЯ ПІДВИЩЕННЯМ РІВНЯ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ (TLR-4)

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова

Вступ. Метою нашого дослідження було встановити, чи впливає застосування в ранньому після операційному періоді інфузії розчину фентанілу на виникнення стану гіпералгезії у дітей з онкологічною патологією та вивчити рівень ТОЛЛ-подібних рецепторів в ранньому післяопераційному періоді.

Матеріали та методи. У 18 дітей прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини (середній вік $14,6 \pm 2,4$ років), які знаходились в ранньому післяопераційному періоді, було виконано 20 вимірювань механічного больового порогу з використанням набору з 10 монофіламентів вон Фрея (VFM) (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical Inc., CA, USA). Больовий поріг вимірювали на поверхні навколо післяопераційної рани. Вміст толл-подібних рецепторів TLR-4 в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "Human TLR4 ELISA Kit" (NeoBiolab, США).

Результати. Використання високих доз фентанілу (2800–6200 мкг/добу), для знеболення в ранньому післяопераційному періоді у дітей прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини, може призводити до гіпералгезії. Гіпералгезія в ранньому післяопераційному періоді репрезентувалася підвищенням TLR4 в крові дітей, прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини. Наприклад, на 3-й день розвитку гіпералгезії рівень TLR4 склав $14,2 \pm 2,4$ нг/мл, на 5-й день розвитку гіпералгезії – $12,1 \pm 1,6$ нг/мл, що значно вище доопераційного рівня – $5,2 \pm 1,4$, нг/мл.

Висновок. Подальші дослідження потрібні для оптимізації та вибору схем адекватного методу знеболення у дітей з використанням опіатних анальгетиків та знеболювальних препаратів інших груп.

Ключові слова: Гіпералгезія, толл-подібні рецептори, післяопераційний період, діти.

ВСТУП

Більшість клітин ЦНС, серед яких мікроглія, нейрони, астроцити, ендотеліальні клітини судин мозку, експресують толл-подібні рецептори – TLR. Клітини мікроглії – мієлоїдні клітини ЦНС, експресують всі види TLR, в астроцитах експресується їх обмежена

кількість. Є також дані щодо диференційованого впливу TLR на функції мікроглії. Під дією патогенів активована мікроглія секретує біологічно активні інтерлейкіни ІЛ-1 α та ІЛ-18, що в свою чергу, викликає синтез вторинних прозапальних цитокінів як в клітинах мікроглії, так і в астроцитах. Наприклад,

IL-1 α може викликати експресію ФНП- β і IL-6, тоді як IL-18 стимулює продукцію IL-17. Прозапальні цитокіни пригнічують функції гематоенцефалічного бар'єру, опосередковують залучення гематогенних лейкоцитів у мозок та є причиною виникнення болю запального генезу [1-4].

TLR 4, що експресується клітинами мікроглії ЦНС, відіграє важливу роль у генезі патологічного болю, особливо причиною якого є пошкодження нервів, кісток, запалення тканин. Linda Watkins та її колеги із Колорадського університету в Боулдері в досліджах на тваринах показали, що експериментальний блокатор рецепторів TLR4 гліальних клітин спинного мозку послаблює невропатичний біль, зумовлений пошкодженням сидничного нерва [18]. При активації TLR4 ЛПС пригнічується ГАМК-ергічна система, секретується у великій кількості IL-1 α , що пригнічує діяльність ГАМК-рецепторів за допомогою активації протеїнкінази C у нейронах та сприяє підтриманню больового синдрому та розвитку гіпералгезії. Активація TLR4 спричинює синаптичну пластичність, підтримує нейрозапалення, викликає аномальну нейронну діяльність [5-7].

Локально впливати на біль, зокрема запального характеру, здатні клітини моноцитарно-макрофагальної системи завдяки наявності в них опіоїдних пептидів. При активації TLR4 моноцитів/макрофагів, окрім прозапальних цитокінів, виникає вихід опіоїдних пептидів з останніх, що є одним із важливих механізмів антиноцицептивної системи [8].

Відкриття Toll- подібних рецепторів є однією із яскравих сторінок сучасної

імунології, що зумовило велику зацікавленість щодо їх вивчення як в нормі, так і при патології. TLR відіграють важливу роль у формуванні вродженого та набутого (адаптивного) імунітету, підтриманні фізіологічного гомеостазу організму. Активація TLR призводить до широкого спектру їх дії як на вроджений, так і набутий імунітет. Деякі механізми цих впливів на вказані форми імунологічної відповіді мають визначену ідентичність, що особливо проявляється по відношенню до запального процесу, ступінь вираження якого при фізіологічній відповіді і при патології суттєво відрізняється [5-7].

Безперечний факт багатоплановості впливів TLR на різні прояви вродженого і набутого імунітету виправдовує поставлене питання щодо очевидних перспектив використання впливів на TLR з терапевтичною метою. За напрямком терапевтичної дії запропоновані препарати можуть бути двох типів: агоністи TLR – імуностимулюючі препарати та антагоністи – імуносупресанти, спрямовані для корекції хронічних імунозапальних процесів. На даному етапі розробка таких препаратів ведеться за кордоном. Усі вони знаходяться лише на етапі клінічних випробувань [8].

Гіпералгезія – це стан підвищеної чутливості до болю, який виникає внаслідок інтенсивної ноцицептивної стимуляції або може бути індукований опіоїдними анальгетиками [9-12]. Гіпералгезія реалізується переважно на рівні спинного мозку та асоціюється із збільшенням інтенсивності болю, та, відповідно, розвитком стрес-відповіді на біль, підвищенням ризику хронізації болю, розвитком толерантності до

опіюїдів та потребою у підвищенні доз [12-14]. Для діагностики гіпералгезії стандартно виконують визначення больового порогу за допомогою монофіламентів вон Фрея в зоні післяопераційної рани, використовуючи монофіламенти у зростаючому порядку до найменшої сили тиску, що сприймається досліджуваним як больове відчуття [9,15-17].

В терапії раннього післяопераційного синдрому у дітей використання постійної інфузії фентанілу є необхідним для забезпечення адекватного рівня знеболення, зменшення післяопераційного стресу та адаптації до штучної вентиляції легень (ШВЛ). Переважно у всіх випадках в ранньому після операційному періоді застосовується фентаніл (або інший опіатний анальгетик) у вигляді постійної інфузії з постійною швидкістю.

Метою нашого дослідження було встановити, чи впливає застосування в ранньому після операційному періоді інфузії розчину фентанілу на виникнення стану гіпералгезії у дітей з онкологічною патологією та вивчити рівень ТОЛЛ-подібних рецепторів в ранньому післяопераційному періоді.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У 18 дітей прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини (середній вік $14,6 \pm 2,4$ років), які знаходились у ВАІТ в ранньому післяопераційному періоді було виконано 20 вимірювань механічного больового порогу. Одночасно з цим оцінювалась динаміка неврологічного статусу, показники стану гемодинаміки та дихальної системи, а також фіксувалась отримана добова доза фентанілу. Перед визначенням порогу болю інфузію

фентанілу припиняли на 60 хвилин, що цілком достатньо для закінчення дії препарату. Для визначення механічного порогу болю використовували набір з 10 монофіламентів вон Фрея (VFMs), каліброваних здійснювати тиск на шкіру зі зростаючою силою від 4 г (39.216 mN) до 300 г (2941.176 mN) (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical Inc., CA, USA). Монофіламент притискали до поверхні шкіри під кутом 90°, доки останній не зігнеться, на 1-1,5 с. Монофіламенти використовували у зростаючому порядку. Між дослідженнями витримували інтервал в 10 с. Механічний больовий поріг визначали як найменшу силу тиску, що спричинювала больову реакцію пацієнта (4 балів або більше за поведінковою шкалою оцінки болю Behavioral Pain Scale (BPS)). Больовий поріг вимірювали на поверхні навколо післяопераційної рани.

Вміст толл-подібних рецепторів TLR-4 в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "Human TLR4 ELISA Kit" (NeoBiolab, США) у відповідності до інструкції фірми-виробника. В лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до естрадіолу, додавали по 100 мкл стандартних розчинів (з концентраціями естрадіолу – 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 нг/мл), 50 мкл ензимного кон'югату (стрептавідин-пероксидази), перемішували 10 с. Інкубували 60 хв. при 37°C у вологій камері для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ-АТ-ензим. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них по 50 мкл хромогенного субстрату. Перемішували, інкубували 15 хв. при 25°C, реакцію зупиняли 50 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр

630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Проби сироватки крові, що зберігались при -20°C у мікропробірках Еппендорф. Всі проби придатні для проведення дослідження. Гемолізовані, ліпемічні зразки сироватки крові та зразки зі згортками не досліджувались. Дослідження біологічного матеріалу проводилось на кафедрі біологічної та загальної хімії НДКДЛ ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №049/15 від 02.03.2015р.). Статистичну обробку отриманих даних проводили із застосуванням методів варіаційної статистики за допомогою програми «Statistica 5.5» (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний №АХХR910А374605FA). Для оцінки наявності та сили зв'язку між ознаками застосовували рангову кореляцію Спірмена (аналог регресійного аналізу). Статистично значимою різницю між показниками вважали при ймовірності справедливості нульової гіпотези менше 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі пацієнти, включені у дослідження, були прооперовані з приводу пухлин черевної порожнини і знаходились в ранньому післяопераційному періоді. Всім хворим проводилась респіраторна підтримка апаратом "Hamillton C2" – режим ASV за параметрами (FiO_2 , 40%, PEEP 2 см вод. ст., PIP 15-20 см вод. ст.), на момент дослідження гемодинаміка була стабільною. Всім хворим в післяопераційному періоді проводили знеболення шляхом постійної інфузії фентанілу. Доза фентанілу коливалась від 3 до 10 мкг/кг/год, і в середньому за добу складала $4,1 \pm 1,2$ мкг/кг/год (відповідає

добовій дозі 600-4200 мкг/добу). Результати вимірювань механічного болювого порогу наведені в таблиці.

У 8 пацієнтів реакція на подразнення виникала лише при застосуванні сили тиску 100 та 180 г, у 6 пацієнтів була потрібна сила тиску 26 або 60 грам. Це були пацієнти, що отримували дози фентанілу в діапазоні від 600 – 2400 мкг/добу, та не перевищували із перерахунку 0,5 – 4 мкг /кг /добу. У 6 пацієнтів рухова

Таблиця. Механічний болювий поріг дітей, прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини в ранньому післяопераційному періоді

№	Добова доза фентанілу	Сила тиску, г
1	600 мкг/добу	100
2	600 мкг/добу	180
3	600 мкг/добу	180
4	900 мкг/добу	100
5	900 мкг/добу	180
6	900 мкг/добу	100
7	1200 мкг/добу	60
8	1200 мкг/добу	60
9	1200 мкг/добу	26
10	1200 мкг/добу	26
11	1800 мкг/добу	26
12	1800 мкг/добу	60
13	2400 мкг/добу	26
14	2400 мкг/добу	26
15	2800 мкг/добу	10
16	3200 мкг/добу	10
17	3200 мкг/добу	8
18	4200 мкг/добу	10
19	4200 мкг/добу	8
20	4200 мкг/добу	6

реакція була вже на подразнення з силою тиску 8 або 10 г та оцінка по шкалі Behavioral Pain Scale (BPS) склала більше 4 балів ($4,6 \pm 0,4$, балів), що свідчило про знижений больовий поріг, у хворих, що отримували дози фентанілу в діапазоні від 2400 – 4200 мкг/добу, та не перевищували із перерахунку 4-5 мкг /кг /добу.

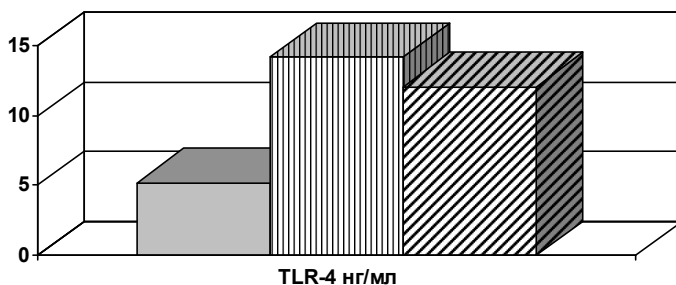
Дослідження динаміки рівня Толл – подібних рецепторів (TLR4) в крові у пацієнтів на різних етапах після-операційного знеболення груп дещо відрізнялася в залежності від терміну розвитку гіпералгезії: виявлено вірогідне підвищення середніх значень TLR-4 в крові в 2,7 рази (на 3-й день розвитку гіпералгезії – $14,2 \pm 2,4$, нг/мл), в 2,34 рази (на 5-й день розвитку гіпералгезії – $12,1 \pm 1,6$, нг/мл), в порівнянні з доопераційним рівнем ($5,2 \pm 1,4$, нг/мл) ($p < 0,05$) (див. діаграму.1).

При оцінці кореляційного зв'язку з використанням коефіцієнту Спірмена було виявлено сильний зворотній зв'язок між добовою дозою фентанілу та силою тиску, що викликала подразнення ($r = -0,74$, $p < 0,05$). Таким чином, високі дози фентанілу асоціювалися зі зниженим больовим порогом, що, ймовірно, пов'язано з розвитком центральної гіпералгезії, яка

репрезентувалася підвищенням TLR4 в крові дітей, прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини, що експресується клітинами мікроглії ЦНС, відіграє важливу роль у генезі патологічного болю та гіпкералгезії.

ВИСНОВКИ

1. Використання високих доз фентанілу (2800 – 4200 мкг/добу) для знеболення в ранньому післяопераційному періоді у дітей прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини може призводити до гіпералгезії.
2. Гіпералгезія в ранньому після-операційному періоді репрезентувалася підвищенням TLR4 в крові дітей, прооперованих з приводу пухлин черевної порожнини. Наприклад, на 3-й день розвитку гіпералгезії рівень TLR4 склав $14,2 \pm 2,4$, нг/мл, на 5-й день розвитку гіпералгезії – $12,1 \pm 1,6$, нг/мл, що значно вище доопераційного рівня – $5,2 \pm 1,4$, нг/мл.
3. Подальші дослідження потрібні для оптимізації та вибору схем адекватного методу знеболення у дітей з використанням опіатних анальгетиків та знеболюючих інших груп.



■ до операції ■ 3-й день гіпералгезії ▨ 5-й день гіпералгезії

Рис 1. Динаміка рівня TLR-4 в крові у пацієнтів в залежності від терміну розвитку гіпералгезії

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абатуров А. Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 4. Внутриклеточные сигнальные пути TLR / А. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш // *Здоровье ребёнка*. – 2012. – № 8 (43). – С. 163 – 167.
2. Абатуров А. Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 1. Семейство TLR / А. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш // *Здоровье ребёнка*. – 2012. – № 5 (40). – С. 116 – 121.

3. Абатуров А. Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 2. Лиганды TLR / А. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш // *Здоровье ребёнка*. – 2012. – № 6 (41). – С. 213 – 219.
4. Абатуров А. Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 3. Рекогниция лигандов TLR / А. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш // *Здоровье ребёнка*. – 2012. – № 7 (42). – С. 157 – 164.
5. Бережная Н. М. Toll-like рецепторы и онкогенез / Н. М. Бережная // *Онкология*. – 2013. – Т. 15 № 2. – С. 76 – 87.
6. Reine-Solange Sauer, Dagmar Hackel, Laura Morschel, Henrike Sahlbach, Ying Wang, Shaaban A Mousa, Norbert Roewer, Alexander Brack and Heike L Rittner. Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation // *Molecular Pain*. – 2014. – 10:10. – P. 1 – 15.
7. Tong Liu, Yong-Jing Gao, Ru-Rong Ji. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch // *Neurosci Bull*. – 2012. – 28 (2). – P. 131 – 144.
8. Xisheng Yan, Enshe Jiang and Han-Rong Weng. Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta // *Journal of Neuroinflammation*. – 2015. – 12:222. – P. 1 – 14.
9. Айзенберг В.Л., Ульрих Г.Э., Цыпин Л.Е., Заболотский Д.В. (2012) Региональная анестезия в педиатрии. Синтез Бук: 304с.
10. Кучин Ю.Л., Глумчер Ф.С., Белка К.Ю. Опиоїд-індукована гіпералгезія під час анальгоседації у пацієнтів з черепно-мозковою травмою/ Біль, знеболювання та інтенсивна терапія.- 2012.-№1Д.-С. 254-257.
11. Кучин Ю.Л. Стрес-індукована гіпералгезія у пацієнтів з множинною травмою/ Біль, знеболювання та інтенсивна терапія.- 2013.-№2 (Д).-С. 262-266.
12. Angst M.S., Clark J.D. Opioid-induced hyperalgesia. *Anesthesiology* 2006; 104: 570-87.
13. Celerier, E., Gonzalez, J.R., Maldonado, R., et al., Opioid-induced hyperalgesia in a murine model of postoperative pain: role of nitric oxide generated from the inducible nitric oxide synthase. *Anesthesiology*, 2006. 104(3): p. 546-55.
14. Wilder-Smith, O.H. Arendt-Nielsen, L., Postoperative hyperalgesia: its clinical importance and relevance. *Anesthesiology*, 2006. 104(3): p. 601-7.
15. Lavand'homme, P., De Kock, M. Waterloos, H., Intraoperative epidural analgesia combined with ketamine provides effective preventive analgesia in patients undergoing major digestive surgery. *Anesthesiology*, 2005. 103(4): p. 813-20.
16. Kopert, W. (2007). The impact of opioid-induced hyperalgesia for postoperative pain. *Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology*, 21(1), 65-83.
17. Lee, M., Silverman, S., Hansen, H., Patel, V., & Manchikanti, L. (2011). A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician*, 14(2), 145-161.
18. Linda R. Watkins, Mark R. Hutchinson, Kenner C. Rice, Steven F. Maier /The "Toll" of Opioid-Induced Glial Activation: Improving the Clinical Efficacy of Opioids by Targeting Glia//*Trends Pharmacol Sci*; 30(11): 581-591.

Дмитриев Д. В.

ГИПЕРАЛГЕЗИЯ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У ДЕТЕЙ ПРООПЕРИРОВАННЫХ ПО ПОВОДУ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ПОВЫШЕНИЕМ УРОВНЯ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TLR-4)

Введение. Целью нашего исследования было установить, влияет ли применение в раннем послеоперационном периоде инфузии раствора фентанила на возникновение состояния гипералгезии у детей с онкологической патологией и изучить уровень ТОЛЛ- подобных рецепторов в раннем послеоперационном периоде.

Материалы и методы. У 18 детей прооперированных по поводу опухолей брюшной полости (средний возраст $14,6 \pm 2,4$ лет), которые находили в раннем послеоперационном периоде, было произведено 20 измерений механического болевого порога с использованием набора из 10 монофиламентов вон Фрея (VFMs) (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical Inc., CA, USA). Болевой порог измеряли на поверхности вокруг послеоперационной раны. Содержание толл-подобных рецепторов TLR-4 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом за набором "Human TLR4 ELISA Kit" (NeoBiolab, США).

Результаты. Использование высоких доз фентанила (2800 – 4200 мкг/добу), для обезболивания в раннем послеоперационном периоде у детей прооперированных по поводу опухолей брюшной полости, может приводить к гипералгезии. Гипералгезия в раннем послеоперационном периоде репрезентовалась повышением TLR4 в крови детей прооперированных по поводу опухолей брюшной

полости. Например, на 3-и сутки развития гипералгезии уровень TLR4 составил – $14,2 \pm 2,4$, нг/мл, на 5-ые сутки развития гипералгезии – $12,1 \pm 1,6$, нг/мл, что значительно выше дооперационного уровня – $5,2 \pm 1,4$, нг/мл.

Выводы. Дальнейшие исследования необходимы для оптимизации и выбора схем адекватного метода обезболивания у детей с использованием опиатных анальгетиков и обезболивающих других групп.

Ключевые слова: гипералгезия, толл-подобные рецепторы, послеоперационный период, дети.

Dmytriiev D.V.

HYPERALGESIA IN EARLY POSTOPERATIVE PERIOD IN CHILDREN OPERATED ON FOR ONCOLOGICAL PATHOLOGY IS ACCOMPANIED BY AN INCREASE OF TOLL-LIKE RECEPTORS (TLP-4)

Introduction. The aim of our study was to determine whether the application early in the postoperative phase of fentanyl infusion solution to the emergence of the state of hyperalgesia in children with cancer pathology and study level TOLL- these receptors in the early postoperative period.

Material and method. In 18 children operated on for tumors of abdominal cavity (average age $14,6 \pm 2,4$ years), who were in early postoperative period, was performed 20 measurements of mechanical pain threshold using a set of 10 von Frey monofilaments (VFMs) (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical Inc., CA, USA). Pain threshold was measured on the area around the postoperative wound. Levels of toll-like receptors TLR-4 in blood serum were determined by ELISA method according to the set "Human TLR4 ELISA Kit" (NeoBiolab, США).

Results. Using o high doses of fentanyl (2800-4200 mcg/day), for anesthesia in the early postoperative period in children operated on for tumors of abdominal cavity, can lead to the hyperalgesia. The hyperalgesia in early postoperative period was represented by increased levels of TLR4 in blood of the children operated on for tumors of abdominal cavity. For example, on the 3rd day of hyperalgesia development blood level of TLR4 was $14,2 \pm 2,4$, ng/ml, on the 5th day of hyperalgesia development $12,1 \pm 1,6$, ng/ml, that was noticeably higher than the preoperation – $5,2 \pm 1,4$, ng/ml.

Further studies are required for optimization and choosing of schemes of adequate method of anesthesia in children with using of opioid analgesics and anesthetics of other groups.

Key words: Hyperalgesia, toll-like receptors, postoperative period, children.