

На правах рукописи

ШАБАНОВ Владимир Васильевич

**ОСТРЫЙ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЙ ПАНКРЕАТИТ:
АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА РАННЕЙ ФАЗЫ
И ПРОФИЛАКТИКА
(клинико-экспериментальное исследование)**

14 00 27 – Хирургия

03 00 04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Шаб -



Самара 2007

Работа выполнена в Самарском Военно-медицинском институте
Министерства обороны РФ

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор **Чернышев Владимир Николаевич**

доктор медицинских наук, профессор **Гильмиярова Фрида Насыровна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Жуков Борис Николаевич**

доктор медицинских наук, профессор **Александров Денис Анатольевич**

член-корреспондент РАМН,

доктор медицинских наук, профессор **Терентьев Александр Александрович**

Ведущая организация –

ГУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи
имени И И Джанелидзе Росздрава»

Защита состоится «12» СЕНТЯБРЯ 2007 года в 11 часов на заседании дис-
сертационного совета Д 208 085 01 при ГОУ ВПО «Самарский государственный
медицинский университет Росздрава» (443079, г Самара, пр К Маркса, 165 Б)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Самарский госу-
дарственный медицинский университет Росздрава» (443001, г Самара,
ул Арцыбушевская, 171)

Автореферат разослан «9» ИЮНЯ 2007 года

Учёный секретарь диссертационного совета –
доктор медицинских наук, профессор Корымасов Е А



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На большом клиническом материале показано, что за период с 1963 по 1995 гг число больных острым панкреатитом в России увеличилось почти в 2 раза (Толстой А Д , 1997) и не имеет тенденции к снижению. Сохранение высокой летальности – 22-50% (Аминев А М , 1973, Белоконов В И , 1997, Ефименко Н А , 2000, Замятин В В , 2000, Варшавский И М , Столяров Е А , 2001, Корымасов Е А , 2005) среди больных тяжелым панкреатитом остается поводом для научных исследований по этой проблеме как в России, так и за рубежом.

Ведущим механизмом развития острого панкреатита считается ферментативный аутолиз (Филин В И , 1982, Нестеренко Ю А , 1994, Филимонов М И , 2000) паренхимы поджелудочной железы ее собственными ферментами с последующим выходом их в кровоток и поражением других органов. Данная точка зрения служит основанием для назначения ингибиторов протеолитических ферментов как для лечения, так и для профилактики острого панкреатита. Вместе с тем все большее число авторов (Курыгин А А , 1973, Ивашкевич Г А , 1978, Русаков В И , 1993, Багненко С Ф , 1997, Кубышкин В А , 1998, Вашетко Р В , 2000, Ермолов А С , 2007) признают неэффективность такой терапии.

Несовершенство знаний механизмов ранней фазы острого панкреатита особенно заметно в части касающейся профилактики острого послеоперационного панкреатита. Подтверждением является стандарт медицинской помощи больным со злокачественными новообразованиями желудка (Приказ МЗ РФ от 20 ноября 2006 г № 771), в котором для этих целей предусмотрены апротинин (контрикал, гордокс и др) и синтетический аналог соматостатина – октреотид (сандостатин). В то же время, эффективность октреотида для профилактики острого послеоперационного панкреатита показана не во всех исследованиях, выполненных по правилам доказательной медицины (Andruilli A , 2002, Testoni P A , 2003). Возможно, это связано с тем, что октреотид, в отличие от соматостатина, повышает тонус сфинктера Одди (Roop R T , 2003).

Число регистрируемых случаев острого послеоперационного панкреатита – 0,8-9% (Ратнер Г Л , 1978, Бэнкс П А , 1982, Иванова В Д , 1988, Кузьмин Ю С , 1989, Тоскин К Д , 1995, Старостина М А , 2000) не всегда объективно отражает истинное положение дел, достигая 35% при комбинированных операциях на же-

лудке (Катанов Е С , 2000) Легкие формы этого осложнения не диагностируются вовсе, протекая под маской пареза желудочно-кишечного тракта или анастомозита, более тяжелые формы часто распознаются несвоевременно, обуславливая задержку и неадекватность проводимой интенсивной терапии (Савельев В С , 1984, Костюченко А Л , 2000, Полушин Ю С , 2003)

Углубленное изучение патогенеза острого панкреатита по правилам доказательной медицины имеет не только теоретическое, но и практическое значение (Савельев В С , 1973, 1999, Котельников Г П , Шпигель А С , 2000) Актуальным является разработка новых, патогенетически обоснованных, эффективных и более экономичных способов медикаментозной профилактики и диагностики острого послеоперационного панкреатита. Особенно это важно в онкологии, где объемы оперативных вмешательств в последние годы значительно расширились, обусловив рост числа случаев послеоперационного панкреатита

Цель исследования

Разработка нового метода профилактики острого послеоперационного панкреатита на основе клинико-экспериментального изучения патогенеза его ранней фазы

Задачи исследования:

- 1 Определить роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в патогенезе ранней фазы острого экспериментального панкреатита
- 2 Установить механизм и факторы гибели панкреоцитов при остром экспериментальном панкреатите
- 3 Изучить механизмы свободнорадикального окисления в ранней фазе острого экспериментального панкреатита
- 4 Провести анализ частоты развития и факторов риска острого панкреатита у больных после различных операций на органах верхнего этажа брюшной полости
- 5 Разработать и внедрить в клиническую практику новый метод профилактики острого послеоперационного панкреатита
- 6 Изучить эффективность нового метода профилактики острого послеоперационного панкреатита в сравнительном аспекте с позицией доказательной медицины

Научная новизна

Впервые разработана экспериментальная модель острого панкреатита у собак, заключающаяся в селективном введении раствора желчи в проток левой доли поджелудочной железы, что позволяет воспроизвести острый панкреатит только в части органа, используя непораженную правую долю в качестве контроля (удостоверение на рационализаторское предложение №850 от 28 05 2007 г)

Впервые в эксперименте разработана модель острого панкреатита у крыс (Патент РФ на изобретение №2224298 от 29 07 1999 г), в процессе воспроизведения которой выявлена протексолитическая инертность трипсина и эластазы на начальных стадиях заболевания (удостоверение на рационализаторское предложение №849 от 28 05 2007 г)

Впервые экспериментально установлено, что на начальных стадиях острого экспериментального панкреатита гибель панкреоцитов происходит в виде апоптоза, а не некроза под действием протексолитических ферментов

Доказана стартовая роль в развитии панкреатита усиленной генерации свободных радикалов кислорода. Выявлены источники супероксида как вне панкреоцита (ксантиноксидазная система), так и внутри него (митохондриальная электронтранспортная цепь), активация которых обуславливает усиление функции фермента антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы

Получены новые данные о протеазоподобном действии активных форм кислорода, результатом которых является неспецифическая фрагментация белков различного функционального назначения, реализующаяся на органном уровне признаками воспаления

В клинической практике определены факторы риска развития острого послеоперационного панкреатита, к которым относится небольшой размер конкрементов у больных калькулезным холециститом

Уточнена частота острого панкреатита у больных после операций на органах верхнего этажа брюшной полости

Впервые разработан метод профилактики острого послеоперационного панкреатита с использованием аллопуринола и комплекса водорастворимых антиоксидантов (удостоверение на рационализаторское предложение №851 от 28 05 2007 г)

Доказана высокая клиническая эффективность профилактического комплекса по сравнению с общепринятой схемой профилактики острого панкреатита сан-достатином и контрикалом

Практическая значимость исследования

Разработанная модель острого панкреатита у собаки облегчает проведение экспериментальных исследований, повышает их чистоту и позволяет сократить число экспериментов в 2 раза

Выбранные диагностические алгоритмы позволяют своевременно распознать развитие острого послеоперационного панкреатита и начать его лечение

Примененные способы медикаментозного предупреждения острого послеоперационного панкреатита у больных злокачественными новообразованиями желудка и пищевода, калькулезным холециститом снижают риск оперативных вмешательств, уменьшают частоту послеоперационных осложнений, сокращают длительность послеоперационного периода и уменьшают затраты на лечение

Внедрение результатов исследования

Материалы диссертации были внедрены в работу ГУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», клиник Самарского Военно-медицинского института и подтверждены актами внедрения. Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедрах хирургии и военной хирургии Самарского Военно-медицинского института, кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой Самарского государственного медицинского университета

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на X Научных чтениях памяти академика Н Н Бурденко (Пенза, 1996), 2-й научно-практической конференции 574-го Военного клинического госпиталя (Москва, 1999), Всероссийской конференции хирургов-гепатологов (Кемерово, 1999), научно-практической конференции «Вопросы экстренной хирургии и организации хирургической помощи» (Самара, 1999), Всероссийской научно-практической конференции «Органосохраняющие принципы в хирургии неотложных состояний» (Ейск, 2001), Первом Международном хирургическом конгрессе (Петрозаводск, 2002), научно-практической конференции «Медицина будущего» (Красно-

дар-Сочи, 2002), 67-й научной сессии Курского государственного медицинского университета и отделения медико-биологических наук Центрального черноземного научного центра РАМН (Курск, 2002), 18 Всероссийской конференции «Физиология и патология пищеварения» (Геленджик, 2002), научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Самарского военно-медицинского института (1997–2006), 834-м заседании Самарского областного научно-практического общества хирургов имени В И Разумовского (2007)

Публикации

Основные положения диссертации изложены в 27 печатных работах, из них 16 – в центральной печати Получен 1 Патент РФ на изобретение

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 220 страницах, из которых 187 – основной текст, 33 – указатель литературы Работа состоит из введения, 5 глав собственных наблюдений, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций Список литературы содержит 348 наименований, из которых 121 – отечественных и 227 – иностранных авторов Работа иллюстрирована 32 таблицами и 33 рисунками

Положения, выносимые на защиту:

1 В ранней фазе острого экспериментального панкреатита отсутствие активных протеолитических ферментов (трипсина и эластазы) в ткани поджелудочной железы и сохранение достаточного количества тканевых и плазменных ингибиторов протеаз как в ткани поджелудочной железы, так и в циркулирующей крови свидетельствует о невозможности ферментативного аутолиза паренхимы железы пищеварительными ферментами и “уклонения” активных протеолитических ферментов в кровь

2 Пусковая роль в развитии деструктивно-воспалительных нарушений в поджелудочной железе на молекулярном и структурном уровнях при остром экспериментальном панкреатите принадлежит процессам свободнорадикального окисления и механизму апоптоза Свободные радикалы кислорода обуславливают дезинтеграцию тканей за счет фрагментации белков без участия панкреатических ферментов

3 При лапароскопической холецистэктомии у больных калькулезным холециститом риск развития острого послеоперационного панкреатита связан с нали-

нием мелких конкрементов в жёлчном пузыре. Использование в профилактических целях ингибитора фермента ксантинооксидазы – аллопуринола достоверно уменьшает число случаев послеоперационного панкреатита.

4. Предложенный лечебно-профилактический комплекс, состоящий из тиктоцида 600Т, флуимуцила, убихинона-композиума, обладает высокой клинической эффективностью перед традиционной схемой профилактики сандостатином и контрикалом.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы экспериментальных исследований

Острый панкреатит смоделирован у 76 собак и у 394 белых крыс обоих полов. Все процедуры на животных проводились под наркозом.

На первом этапе работы нами разработаны методы воспроизведения острого панкреатита у собак и крыс. Для моделирования острого панкреатита у собак выполнялись лапаротомия, дуоденотомия и через Фатерова сосок и Вирсунгов проток глубоко в левую долю железы проводили катетер (рис. 1), в который вливали раствор консервированной медицинской жёлчи, из расчёта 0,25 мл/кг (для заполнения только левой и средней долей) (рис. 2).

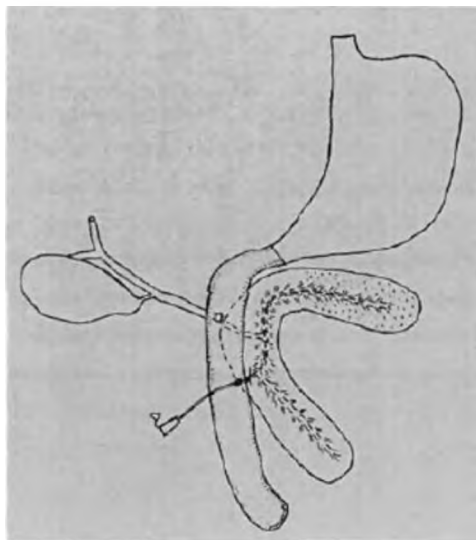


Рисунок 1. Схема катетеризации левой доли поджелудочной железы собаки



Рисунок 2 Панкреатограмма левой и средней долей собаки

Моделирование острого панкреатита у крыс осуществляли по разработанному нами методу, заключающемуся в создании гипертензии в протоках поджелудочной железы через разрез стенки в общий желчный проток и двенадцатиперстную кишку для обеспечения пассажа желчи проводили катетер, накладывали лигатуры с обеих сторон поджелудочной железы и разреза протока (рис 3) Стимулировали панкреатическую секрецию прозергином и внутрижелудочным введением смеси жирного мясного бульона со спиртом

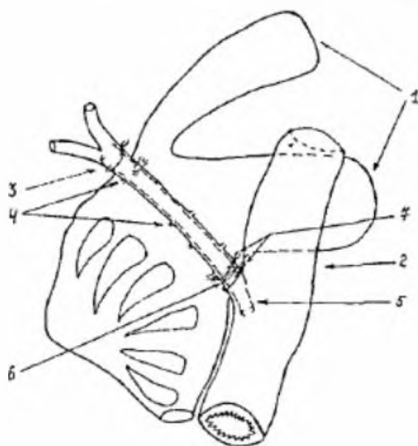


Рисунок 3 Схема операции 1 – левая доля, 2 – двенадцатиперстная кишка, 3 – лигатура в воротах печени, 4 – протоки, 5 – дренаж, 6 – разрез, 7 – лигатуры с обеих сторон от разреза

Развитие панкреатита подтверждено морфологическими исследованиями. Для гистологического исследования ткани поджелудочной железы у собак использовали препараты, окрашенные гематоксилином-эозином, метиленовым синим и кислым фуксином (Уикли Б., 1972). Для выявления клеток, гибнущих путем апоптоза, срезы обрабатывали по методу TUNEL (тест на межнуклеосомные разрывы ДНК выполнен в лаборатории клинической иммунологии Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, А.В. Ждановым, г. Москва). Гистохимически выявляли активность ксантиноксидазы по методу W. M. Fredenks (1995) на криостатных срезах.

Биохимические исследования на моделях острого панкреатита у экспериментальных животных проведены в 5 средах: в гомогенате, в венозной крови и внесклеточной жидкости поджелудочной железы, в периферической крови, в перитонеальном экссудате. Исследования ферментов проводили в динамике эксперимента до исследования, через 15 минут и повторно в течение 1–4,5 часов, а также через 1 сутки. В качестве контроля использовали показатели активности ферментов у интактных и ложноперированных животных.

Эстеразную активность трипсина определяли с помощью собственного метода, представляющего собой модификацию методов В. Ф. Erlanger (1961) и В. А. Шатерникова (1969), общую ингибиторную активность по методу В. Ф. Нартиковой и соавт. (1979), эстеразную активность эластазы по методу К. Н. Веремеенко и соавт. (1988), препаративное выделение супероксиддисмутазы (СОД) осуществляли по методу Тушикаши (McCord J. M. et al., 1969). Для установления источников генерации свободных радикалов кислорода (СРК) проводили идентификацию экстраклеточной и цитозольной изоформ СОД с помощью разделения на сефадексе-32 (Marclund S. L., 1982). Для определения активности СОД применяли методику Misra H. P. et al. (1972). Концентрацию белка определяли биуретовым методом. Электрофорез очищенной СОД проводили по L. Ornstein et V. J. Davis (1969).

В эксперименте по активации СОД свободными радикалами *in vitro* использовали образцы очищенной СОД из ткани поджелудочной железы интактных собак, а также фермент ксантиноксидазу (КСО) и ксантин фирмы ICN. Олигопептиды определяли по методу Лоури (Покровский А. А., 1969).

Для оценки уровня генерации свободных радикалов кислорода митохондриальной фракцией гомогената поджелудочной железы до и через 15 минут после инициации острого панкреатита, препараты СОД, предварительно полученные из

интактной поджелудочной железы собаки, инкубировали с суспензией митохондриальной фракции. Митохондриальную фракцию выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования (Покровский А А , Арчаков А И , 1968)

Протеазоподобную активность СРК определяли в среде, содержащей ксантиноксидазу и ксантин, либо только раствор СОД после облучения ультрафиолетовой лампой. Ультрафиолетовое излучение вызывает образование синглетного кислорода из молекул растворенного O_2 , синглетный кислород окисляет молекулы воды до перекиси – H_2O (Кнупянц И Л , 1988)

Материал и методы клинических исследований

Клинические исследования проведены у 483 человек у 283 больных (174 – калькулезным холециститом и 109 – злокачественными новообразованиями желудка и пищевода) и у 200 клинически здоровых лиц. Всем больным в комплексном обследовании выполнялись исследования

- до операции ультразвуковое исследование поджелудочной железы, желчного пузыря и фиброгастродуоденоскопия,
- в сыворотке крови здоровых лиц и больных до операции, у больных после лапароскопической холецистэктомии однократно на следующий день, у больных после операций на желудке и пищеводе – сразу после ее окончания и в последующие 5 суток ежедневно – определяли активность общей (по Каравею набором фирмы Лахема) и панкреатической амилазы (набором фирмы DyaSis) и панкреатической липазы (Карпищенко А И , 1999)

Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета компьютерных программ SPSS 11.5 и в режиме электронных таблиц Excel, используя непараметрические критерии (парный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, критерий знаков и U-критерий) и критерий t Стьюдента (Боровиков В П , 2001). Различия между показателями считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза $p=95\%$ и более.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

У собак моделировали острый панкреатит, как описано выше, подтверждали его гистологически и биохимически (табл. 1)

Активность липазы крови до операции была равна $4,12 \pm 4,6$ мкмоль/мин*л, через 3 часа после инициации панкреатита составила 396 ± 152 мкмоль/мин*л. У интактных животных активность липазы в крови колебалась от 0 до 20 мкмоль/мин*л. Эстеразная активность трипсина до операции во всех исследуемых тканях была равна 0, эластазы в периферической венозной крови – $3,51 \pm 1,22$ (мкмоль/мин*л).

Таблица 1

Активность ферментов в тканях собак до операции (1) и в начальной фазе острого панкреатита (2)

Объект исследования	Активность ферментов								
	амилаза, μ катал /ммоль*л		липаза, мкмоль /мин*л		трипсин, ммоль/мин*л			эластаза, мкмоль /мин*л	
	1	2	1	2	без соевого ингибитора трипсина		с соевым ингибитором трипсина	1	2
					1	2			
Периферическая венозная кровь	$8,80 \pm 3,1$	$46,6 \pm 11,2$	$4,12 \pm 4,6$	396 ± 152	0	$0,44 \pm 0,41$	$0,41 \pm 0,39$	$3,51 \pm 1,22$	$2,56 \pm 0,58$
Кровь из вены поджелудочной железы	$7,73 \pm 2,7$	$43,6 \pm 10,6$	$9,47 \pm 4,2$	594 ± 163	0	$0,51 \pm 0,55$	$0,53 \pm 0,51$	$2,89 \pm 1,31$	$2,58 \pm 0,61$
Интерстициальная жидкость	-	$98,3 \pm 21,5$	-	1813 ± 162	0	$5,7 \pm 2,32$	$5,6 \pm 2,1$	-	$1,75 \pm 0,61$
Гомогенат поджелудочной железы	-	-	-	-	0	0	-	-	-
Перитонеальный экссудат	-	$88,3 \pm 23,4$	-	1513 ± 178	0	$61,99 \pm 33,84$	$63,49 \pm 34,63$	-	$1,77 \pm 1,22$

Эстеразная активность трипсина в плазме крови, взятой из периферической вены до моделирования острого панкреатита, отсутствовала, после инициации панкреатита она обнаружена только в двух из 26 проб ($2,57$ и $8,78$ мкмоль/мин*л), в остальных была равна 0, несмотря на наличие очагов некроза в поджелудочной железе у всех животных. Среднее значение – $0,44 \pm 0,41$ мкмоль/мин*л.

В плазме крови, взятой из вены поджелудочной железы, эстеразная активность трипсина обнаружена только в одной из 15 проб (7,70 мкмоль/мин*л) Среднее значение – 0,51±0,55 мкмоль/мин*л

В интерстициальной жидкости поджелудочной железы, полученной в те же сроки, эстеразная активность трипсина присутствовала в 9 из 20 проб Среднее значение – 5,70±2,32 мкмоль/мин*л

Самые высокие средние показатели эстеразной активности трипсина получены в перитонеальном экссудате – 61,99±33,84 мкмоль/мин*л, положительные значения показателя определялись в 10 из 11 проб Параллельное определение активности трипсина с добавлением в пробы сосвого ингибитора трипсина (63,49±34,63 мкмоль/мин*л) и без него (61,99±33,84) не выявило различий между пробами Это означает, что трипсин, определяемый по его эстеразной активности, находится в связанном с α -2-макроглобулином состоянии и не способен к гидролизу пептидной связи белков

Определение активности трипсина непосредственно в ткани (гомогенате) поджелудочной железы дало нулевой результат у собак с экспериментальным панкреатитом во всех 14 выполненных пробах

Эстеразная активность эластазы у собак с экспериментальным острым панкреатитом определялась в интерстициальной жидкости в 7 из 12 проб и была равна – 1,75±0,61 мкмоль/мин*л, в перитонеальном выпоте – 1,77±1,20 мкмоль/мин*л, в то время как в плазме крови контрольных животных – 3,51±1,22 мкмоль/мин*л

Общая ингибиторная активность гомогената железы через 4 часа после моделирования панкреатита снизилась только на 14% (с 4,57±0,28 до 3,93±0,17 ИЕ/мг белка) от исходного показателя Это свидетельствует о сохранении достаточного количества тканевых ингибиторов для инактивации внутриклеточно активированного трипсина

Для подтверждения данных, полученных при исследовании ферментов у собак, выполнены эксперименты на другом виде животных – крысах Острый панкреатит у 32-х крыс моделировали с помощью собственного метода Развитие панкреатита подтверждали гистологически и определением панкреатических ферментов (рис 4)

Определяли активность трипсина в сыворотке крови у ложнооперированных крыс и у крыс с острым панкреатитом через 1 сутки Повышения активности трипсина в сыворотке крови больных животных (0,38±0,16 мкмоль/мин*л), в

сравнении с контрольными животными ($1,05 \pm 0,35$ мкмоль/мин*л), не обнаружено, хотя активность амилазы ($12,9 \pm 0,7$ катал. у ложнооперированных крыс и $84,4 \pm 14,2$ у крыс с панкреатитом) ($p < 0,001$) и липазы ($7,3$ мкмоль/мин*л у ложнооперированных крыс и $52,2 \pm 23,9$ у крыс с панкреатитом) ($p < 0,01$) были максимально увеличены именно в эти сроки.



Рисунок 4. Активность гидролитических ферментов в сыворотке крови крыс с острым панкреатитом через 1 сутки после операции

При определении активности трипсина в сыворотке крови крыс с острым панкреатитом с добавлением соевого ингибитора трипсина активность трипсина осталась на прежнем уровне – $0,39 \pm 0,15$ мкмоль/мин*л, что свидетельствует о протеолитической инертности комплекса трипсин- α -2-макроглобулин.

Определение ингибиторной активности α -1-антитрипсина сыворотки крови крыс с острым панкреатитом показало, что ингибиторная активность сохраняется на достаточном уровне: антитрипсин у ложнооперированных крыс был – 1678 ± 146 ИЕ/мг белка, у крыс с острым панкреатитом 1300 ± 117 ИЕ/мг белка ($p < 0,05$), т.е. 77,5% от исходного. Сохранение высокой активности α -1-антитрипсина предотвращает активацию протеолитических ферментов в ткани поджелудочной железы.

Таким образом, отсутствие активного трипсина и эластазы и сохранение достаточного количества тканевых и плазматических ингибиторов протеаз как в ткани поджелудочной железы, так и в циркулирующей крови, опровергает мнение о патогенетическом значении аутолиза поджелудочной железы в начальную фазу острого панкреатита.

Для выяснения механизма гибели панкреоцитов при остром экспериментальном панкреатите нами использовано сочетание морфологических исследований с анализом хроматина, что позволяет дифференцировать характер деструктивных процессов в клетке на ранних этапах патологического процесса.

В срок 2-2,5 часа от начала индукции острого панкреатита у всех подопытных животных был выражен межклеточный отек поджелудочной железы, межацинарное пространство расширено (рис. 5). Среди ацинусов с нормальным стромисом обнаружены группы клеток с деструктивными изменениями различного типа. Наиболее характерна потеря эозинофилии и базальной базофилии цитоплазмы, уплотнение ядра, расширение перинуклеарного пространства, полярность клетки нарушена, ядро занимает центральное положение, границы клетки нечёткие.

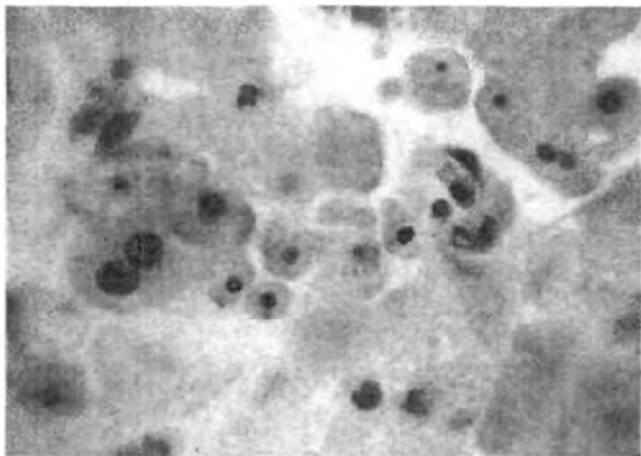


Рисунок 5. Микрофотография. Апоптотические тельца в поджелудочной железе собаки через 2 часа после индукции острого панкреатита. Окраска гематоксилином – эозином. Ув. $\times 900$

Количество гранул как в отечных, так и в пикнотических панкреоцитах, резко уменьшено. Хроматин сконденсирован в виде крупных глыбок около ядерной оболочки или смещен к полюсам ядра в виде полулуний. Обнаруживаются картины распада ядра на фрагменты – типичные апоптотические тельца. Признаки некроза обнаружены в 8% случаев экспериментального панкреатита: резкое набухание ядра, хлопьевидный хроматин, отскок и вакуолизация цитоплазмы, разрывы ядерной и плазматической мембран.

При окраске по методу TUNEL (рис. 6) на срезах ткани выявляется множество ядер, дающих положительную реакцию на фрагменты ДНК, причем наиболее интенсивная реакция характерна для зоны плотных ядер.

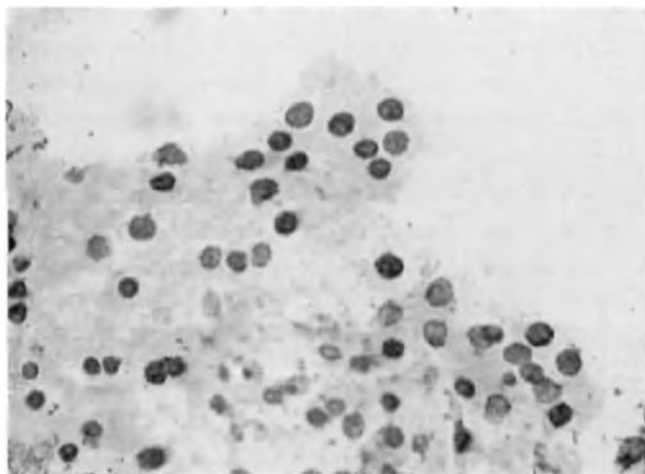


Рисунок 6. Микрофотография Поджелудочная железа собаки через 2 часа после индукции острого панкреатита. Специфическое окрашивание ядер по методу TUNEL. Ув. × 400

В сроки 4-4,5 часа от начала острого панкреатита у большинства животных обнаруживаются группы слабоокрашенных безъядерных клеток и их фрагменты, между которыми разбросаны отдельные шарообразные скопления конденсированного хроматина. У 2-х животных обнаружены кровоизлияния и небольшие фокусы некроза ацинарных клеток. У всех подопытных животных, независимо от степени тяжести повреждения, отмечается наличие нейтрофильных лейкоцитов в зонах деструкции ацинусов, множество ядер, дающих положительную реакцию на фрагменты ДНК.

Структурные изменения в ткани поджелудочной железы в первые часы развития острого панкреатита – потеря полярности, пикноз ядра, просветление цитоплазмы, исчезновение зимогенных гранул – весьма характерны для некротизирующихся клеток поджелудочной железы (Rau B. et al., 2001). Однако обнаруженные нами изменения ядер: конденсация хроматина около нуклеолеммы и перемещение его к полюсам ядер с образованием полулуний, деформация и распад ядра на шаровидные фрагменты, являются признаками апоптоза. Прямым под-

тверждением гибели панкреоцитов путем апоптоза в данном эксперименте стал положительный тест на межнуклеосомные разрывы ДНК, выявленные при окраске по методу TUNNEL

Известно (Лушников Е Ф и соавт , 2001), что образующиеся в ткани железы апоптозные тельца быстро подвергаются спонтанной дегенерации (так называемому вторичному некрозу) Поэтому в участках деструкции уже через 4-4,5 часа происходило полное разрушение ткани и образование обширных полей из фрагментов цитоплазмы и ядер панкреоцитов, между которыми находились мигрировавшие сюда нейтрофильные лейкоциты Обнаруженные фокусы некроза ацинарных клеток были незначительными по размерам и встречались не у всех животных Очевидно, что этот тип гибели клеток в ранней фазе острого панкреатита данной модели не является ведущим

Проведенное нами исследование показало, что на начальных этапах развития острого панкреатита в данной экспериментальной модели гибель клеток поджелудочной железы происходит преимущественно путем апоптоза Этот тип клеточной гибели характерен и для острого панкреатита человека (He Z-J et al , 2000) Его триггерами считаются различные факторы, в первую очередь фактор некроза опухоли (ФНО- α) и свободные радикалы кислорода (СРК) Оба эти медиатора синтезируются и выбрасываются как собственно панкреоцитами, так и нейтрофильными лейкоцитами (Gukovskaya A S et al , 1997, Rau B et al , 2001, Telek G et al , 1999)

Поскольку в течение первых двух часов проведенного эксперимента лейкоциты в зонах деструкции ацинусов отсутствовали, можно предполагать, что гибель клеток ацинусов запускается автономно, агентами, образующимися в самих панкреоцитах, в первую очередь – СРК Физиологический эффект СРК проявляется уже в первые минуты после индукции экспериментального острого панкреатита (Kusterer K et al , 1993), в то время как для синтеза ФНО- α (медиатора белковой природы), требуется значительно больший временной интервал

Таким образом, в очагах повреждения при экспериментальном панкреатите, наряду с некротизирующимися клетками, обнаружены признаки гибели панкреоцитов по механизму апоптоза, что не является следствием «переваривания» поджелудочной железы активированными протеолитическими ферментами Возможно, что принципиальное различие между отечной и некротизирующей формами острого панкреатита заключается в преобладании в каждом конкретном

случае определенных механизмов гибели клеток путем апоптоза или ишемического некроза

Для выяснения патогенетической роли усиления свободнорадикальных процессов в деструкции ткани поджелудочной железы нами проведены эксперименты *in vitro*. Всего выполнено 620 исследований

Оценена генерация СРК на ранних этапах патогенеза острого панкреатита по активации СОД – фермента, «гасящего» супероксидионы O_2^- . Электрофореграмма СОД представлена нами на рисунке 7. Определено, что препараты одной из двух существующих форм СОД – Cu, Zn-СОД, очищенной по методу Тушикаши, из поджелудочной железы собаки содержат максимально 8 фракций. Верхние 4 фракции являются экстраклеточной СОД, нижние фракции представляют собой цитозольную СОД.

При анализе удельной активности СОД из образцов интактной поджелудочной железы и железы тех же животных через 15 минут после инициации острого панкреатита обнаружено, что удельная активность СОД из интактной железы достоверно ниже ($386,0 \pm 67,5$ о е /мг белка), чем из ткани железы после инициации панкреатита ($961,8 \pm 243,0$ о е /мг белка, $p < 0,05$) (рис. 8)

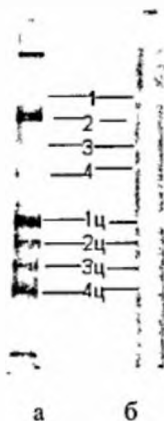


Рисунок 7 Электрофореграммы супероксиддисмутазы поджелудочной железы собаки

а – окрашивание белковых фракций Кумасси бриллиантовым голубым,
б – выявление специфической активности методом негативного
окрашивания с НСТ,

1, 2, 3, 4 – фракции экстраклеточной СОД,
1ц, 2ц, 3ц, 4ц – фракции цитозольной СОД

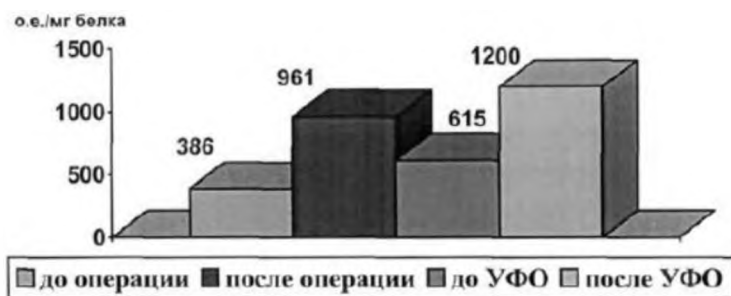


Рисунок 8. Удельная активность СОД в ткани железы до и через 15 минут от инициации острого панкреатита, до и после воздействия ультрафиолетового облучения *in vitro*

Нами высказано предположение, что величина удельной активности СОД регулируется уровнем генерации супероксидного радикала в ткани. Для выяснения зависимости уровня активности СОД от СРК были проведены следующие серии экспериментов.

Двадцати минутная экспозиция СОД в H_2O , подвергнувшейся воздействию ультрафиолетового облучения, привела к увеличению его удельной активности с 615 ОЕ/мг белка до 1200 ОЕ/мг белка. Следовательно, резкая активация СОД в течение первых 15-ти минут после моделирования острого панкреатита объясняется генерацией СРК в поврежденной ткани поджелудочной железы и может служить своеобразным маркером этого процесса.

При электрофорезе препаратов СОД до и после экспозиции с СРК в пробах с СРК выявлено снижение процентного содержания высокомолекулярных (первой и второй) фракций обеих изоформ СОД (экстраклеточной и цитозольной) и повышение содержания диссоциированных (распавшихся) – третьей и четвертой изоформ СОД. Аналогичные результаты получены при электрофорезе препаратов СОД из интактной ткани поджелудочной железы и образцов, взятых через 15 минут после инициации острого панкреатита (табл. 2).

Изучен процесс активации СОД в условиях генерации супероксидного радикала ксантиноксидазой. Проведен эксперимент *in vitro*, в котором образцы СОД из интактной поджелудочной железы собак инкубировались в течение 30 минут в супероксид – генерирующей системе, состоящей из ксантиноксидазы и ксантина,

что привело к статистически достоверному увеличению удельной активности фермента (табл 3)

Таблица 2

Фракционный состав внеклеточной и цитозольной изоформ СОД поджелудочной железы собак в ранней фазе острого панкреатита (%)

Формы СОД	Активность фракций			
	1 фракция	2 фракция	3 фракция	4 фракция
Внеклеточная СОД				
Контроль	18,0±2,0	48,0±5,6	19,0±1,8	15,0±2,1
Опыт	8,4±1,8 *	37,2±3,3	30,0±3,4*	24,0±1,3*
Цитозольная СОД				
Контроль	21,7±1,7	24,8±3,6	22,6±1,6	30,9±2,7
Опыт	6,4±0,7 *	14,0±0,8*	22,5±2,6	57,1±3,3*

Примечание * $p < 0,01$

Добавление в инкубационную среду цианида – ингибитора как ксантиноксидазы, так и Си, Zn -СОД – полностью предотвращало активацию фермента

Таким образом, проведенное исследование позволило с высокой долей вероятности связать активацию и диссоциацию СОД, наблюдающиеся после инициации острого панкреатита, со вспышкой генерации свободных радикалов в ткани поджелудочной железы

Таблица 3

Влияние активных форм кислорода на активность СОД в условиях *in vitro* в супероксид – генерирующей системе (ксантин+КСО)

Показатели	Контроль (инкубация без КСО)	Опыт (инкубация с КСО)
Изменение активности СОД, $\mu\text{e} / \text{мг}$ белка	-33±14	212±62 **
Изменение активности СОД, в %	-8,5±3,6	92,8±26,5 **

Примечание ** $p < 0,01$, $n=7$ Содержание белка СОД в пробе – 1,3 мкг

В связи с тем, что основным источником супероксидного радикала в ткани поджелудочной железы при инициации экспериментального острого панкреатита считается ксантиноксидаза, изучено влияние превентивного введения аллопуринола – ингибитора ксантиноксидазы – на генерацию супероксидного радикала этим ферментом, а, следовательно, и активацию СОД. Определена удельная активность СОД в макроскопически неизменном и измененном (отечном) участ-

ках железа через 15 минут инициации панкреатита, на фоне внутривенного введения аллопуринола. Выявлены статистически достоверные различия данного показателя в контрольном образце (398 ± 62 о е/мг белка), в макроскопически неизменном ($307 \pm 66^*$ о е/мг белка) и в макроскопически измененном (460 ± 38 о е/мг белка) участках ($p < 0,01$)

Профилактическое введение аллопуринола предотвращало диссоциацию высокомолекулярных форм экстраклеточной СОД, однако имело недостаточный эффект в отношении цитозольной изоформы, особенно в макроскопически измененном участке железы (табл. 4)

Таблица 4

Изменение фракционного состава внеклеточной и цитозольной изоформ СОД поджелудочной железы собак после моделирования острого панкреатита при профилактическом введении аллопуринола (%)

Внеклеточная СОД				
Экспериментальная группа	1 фракция	2 фракция	3 фракция	4 фракция
Ложнооперированные животные	$12,6 \pm 1,5$	$49,1 \pm 4,8$	$23,8 \pm 2,0$	$14,5 \pm 1,9$
Макроскопически неизменный участок железы у животных с панкреатитом	$13,4 \pm 1,3$	$49,4 \pm 3,3$	$22,6 \pm 1,9$	$14,6 \pm 1,3$
Макроскопически измененный участок у животных с панкреатитом	$11,3 \pm 1,7$	$44,9 \pm 3,4$	$28,1 \pm 2,5$	$15,7 \pm 2,0$
Цитозольная СОД				
Экспериментальная группа	1 фракция	2 фракция	3 фракция	4 фракция
Ложнооперированные животные	$28,2 \pm 0,7$	$24,9 \pm 2,2$	$21,8 \pm 1,6$	$25,1 \pm 2,6$
Макроскопически неизменный участок железы у животных с панкреатитом	$25,7 \pm 0,6^*$	$25,2 \pm 1,5$	$20,6 \pm 0,8$	$28,5 \pm 1,7$
Макроскопически измененный участок у животных с панкреатитом	$18,9 \pm 0,9^{**}$	$19,6 \pm 1,3^*$	$16,5 \pm 1,4^*$	$45,0 \pm 2,3^{**}$

Примечание * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем, $n=20$

В связи с этим нами изучены альтернативные источники генерации свободных радикалов кислорода – митохондрии. При инкубации СОД с митохондриями, выделенными из ткани поджелудочной железы до моделирования острого пан-

кратита, активации СОД не наблюдается ($283,4 \pm 17,2$ о.е./мг белка до инкубации и $296,7 \pm 25,2$ о.е./мг белка после 30 минут инкубации, $p > 0,05$).

Для того чтобы устранить возможное влияние ксантиноксидазы, экспериментальным животным вводился аллопуринол, как описано выше. При инкубации СОД с митохондриями, выделенными из ткани железы через 15 минут после инициации острого панкреатита, на фоне внутривенного введения аллопуринола, происходит достоверная активация фермента (с $296,3 \pm 13,5$ до $386,9 \pm 7,7$ о.е./мг белка, $p < 0,01$). Уровень генерации СРК митохондриальной фракцией гомогената поджелудочной железы после инициации острого панкреатита возрастает настолько, что мощности собственной митохондриальной марганцевой СОД оказывается недостаточно для нейтрализации генерируемых супероксидных радикалов и происходит "утечка" СРК через митохондриальную мембрану.

Таким образом, в ранней фазе острого экспериментального панкреатита выявляется, как минимум, два источника свободных радикалов кислорода в ткани поджелудочной железы: ксантиноксидаза и электронтранспортные цепи митохондрий.

Изучен процесс протеолиза под действием свободных радикалов кислорода. При инкубации цельного гомогената интактной поджелудочной железы с ксантином происходила активация СОД за счет супероксидного радикала, генерируемого ксантиноксидазой, содержащейся в ткани поджелудочной железы. Эта активация сопровождалась накоплением олигопептидов в среде инкубации в среднем на $102,8 \pm 11,5\%$ от исходного уровня (с $0,174 \pm 0,015$ мг/мл до $0,369 \pm 0,042$ мг/мл, $p < 0,001$, $n = 12$) (рис. 9).

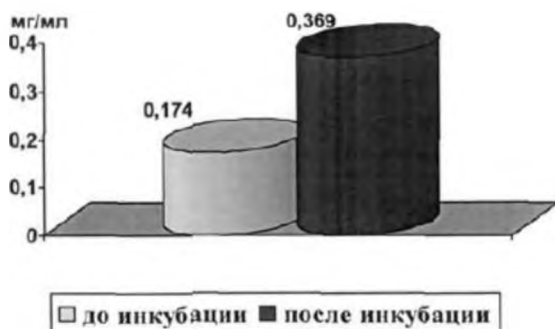


Рисунок 9. Уровень олигопептидов при инкубации ткани поджелудочной железы в радикал-генерирующей системе

Инкубация СОД, выделенной из поджелудочной железы интактных собак, в супероксид-генерирующей системе, содержащей ксантиноксидазу и ксантин, в течение 30 минут, также приводила к увеличению содержания олигопептидов в среде инкубации, а также к снижению содержания белка супероксиддисмутазы (табл. 5), что свидетельствует о ее деструкции под действием свободных радикалов кислорода

При инкубации цитозольной СОД как с перекисью водорода, так и в супероксид-генерирующей системе, состоящей из ксантиноксидазы и гипоксантина, в ходе пероксидазной реакции генерируется высокореакционный гидроксильный радикал, приводящий к фрагментации фермента СОД (Kang J H, Kim S M, 1997)

Таблица 5

Неферментативное расщепление белка активными формами кислорода (трипсиноподобная активность) в супероксид – генерирующей системе (ксантин+КСО)

Объект	Контроль (инкубация без КСО)	Опыт (инкубация с КСО)
Содержание белка (СОД, мг/мл)	0,290±0,089	0,807±0,159
Продукты гидролиза белка (олигопептиды, мг/мл)	0,016±0,004	0,136±0,030 *

Примечание * $p < 0,05$, $n=7$

Супероксидный радикал, генерируемый ксантиноксидазой, хотя и считается менее агрессивным, также может вносить вклад во фрагментацию белков. 30-минутная инкубация в супероксид – генерирующей системе, состоящей из ксантиноксидазы и ксантина, таких белков, как соевый ингибитор трипсина и гексокиназа, также приводила к увеличению количества олигопептидов в среде инкубации (с 0,165±0,007 до 0,254±0,010 мг/мл при инкубации в системе КСО + ксантин + соевый ингибитор трипсина, $p < 0,05$, и с 0,188±0,010 до 0,261±0,003 в системе КСО + ксантин + гексокиназа, $p < 0,05$)

В наших экспериментах на 5-е сутки острого панкреатита у крыс происходило снижение содержания общего белка плазмы относительного фоновому уровню в среднем на 20,7% с 70,89±4,88 до 58,24±2,82 мг/л ($n=10$, $p < 0,05$), что необходимо учитывать при определении активности плазменных ингибиторов протеаз. Поэтому указываемые в отечественной литературе данные о дефиците плазменных ингибиторов протеаз, приводимые как доказательство наличия трипсинемии,

не могут приниматься в расчет, поскольку они не соотносятся с изменениями содержания общего белка

Таким образом, исходя из результатов проведенных экспериментальных исследований, нами сделано предположение, что именно СРК являются наиболее ранними и общими триггерами каскадных патофизиологических механизмов развития острого панкреатита. Следовательно, в качестве средств его профилактики следует использовать антиоксиданты, обладающие «скевенджерным» (способность перехвата) действием по отношению к СРК

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

У 174 больных с калькулезным холециститом (15 – острым холециститом, 159 – хроническим) выполнена лапароскопическая холецистэктомия. Соотношение женщин и мужчин – 2,6. Больных в возрасте до 30 лет было 11 (5%), 31–40 лет – 23 (13%), 41–50 лет – 51 (30%), 51–60 лет – 35 (20%), 61–70 лет – 41 (24%), старше 70 лет – 13 (8%)

У 60% больных выявлены сопутствующие заболевания – гипертоническая болезнь II стадии, ишемическая болезнь сердца II функционального класса, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки

В зависимости от размера конкрементов в желчном пузыре и метода профилактики острого послеоперационного панкреатита все больные распределены на 4 группы, сопоставимые по основным параметрам исходного состояния (полу, возрасту и массе тела, форме заболевания, продолжительности операций, данным ультразвукового исследования поджелудочной железы, фоновым показателям панкреатических ферментов крови)

а) больные с сочетанием мелких и крупных конкрементов

1-я группа (n=42) – лица, получавшие для профилактики острого послеоперационного панкреатита ингибитор ксантиноксидазы (КСО) – аллопуринол

2-я группа (контрольная) (n=46) – профилактика острого послеоперационного панкреатита не проводилась

б) больные с крупными конкрементами

3-я группа (n=28) – получавшие аллопуринол

4-я группа (контрольная) (n=58) – профилактика острого послеоперационного панкреатита не проводилась

Схема профилактики острого послеоперационного панкреатита аллопуринолом была следующей: препарат назначали внутрь в два приема – половину дозы

перед сном накануне дня операции, другую половину дозы утром – за 3 часа до операции, из расчета курсовой дозы – 50 мг/10 кг массы тела больного

Техника лапароскопической холецистэктомии была стандартной. Операционная холангиография выполнялась в 4% случаев. С целью антимикробной профилактики больным за 30–40 минут до операции внутримышечно вводился антибиотик – цефазолин 1 грамм. В послеоперационном периоде антибиотики не назначали, за исключением 8(4,6%) больных, у которых продолжительность операции была более 2 часов.

Диагноз острого послеоперационного панкреатита ставили на основании наличия одного или нескольких клинических признаков некупированного стандартным обезболиванием болевого синдрома, рвоты, вздутия живота, выраженной общей слабости и тахикардии, не обусловленных гиповолемией и анемией, наблюдающихся на фоне повышенной активности амилазы и/или липазы крови. Диагноз подтверждали ультразвуковым исследованием поджелудочной железы и/или компьютерной томографией.

Проведенные исследования выявили существенные различия в течении послеоперационного периода у больных с мелкими конкрементами в желчном пузыре получавшими и не получавшими аллопуринол.

Среди больных 1-й группы, получавших аллопуринол, случаев острого послеоперационного панкреатита не отмечено. Во время операции холедохолитиаз выявлен у 2-х больных этой группы, конкременты удалены в ходе оперативного вмешательства с помощью корзинки Dormia, послеоперационный период в обоих случаях протекал без осложнений.

У больных 2-й группы острый послеоперационный панкреатит с отчетливой симптоматикой на фоне 1,5–2-кратного повышения уровня панкреатических ферментов в крови развился в 8,7% случаев. При этом у одного больного панкреатит возник на фоне билиарной гипертензии, возможно, вследствие миграции микролита из желчного пузыря в общий желчный проток. Это подчеркивает, что наличие мелких камней является фактором риска развития послеоперационного панкреатита.

Больным с крупными конкрементами в желчном пузыре 3-й группы проводилась профилактика послеоперационного панкреатита аллопуринолом, в 4-й группе аллопуринол превентивно не назначали. Из 86 операций, выполненных у больных с крупными конкрементами в желчном пузыре, случаев острого после-

операционного панкреатита не было, независимо от того, проводилась профилактика или нет.

Нами анализировались также случаи повышения активности панкреатических ферментов при отсутствии клинических признаков послеоперационного панкреатита. При этом оценивали как случаи изолированного повышения одного из панкреатических ферментов — амилазы или липазы, так и их обоих.

1. *Группы пациентов с крупными камнями в жёлчном пузыре.* Уровень панкреатических ферментов до операции был выше верхней границы нормы у 12 (22,4%) больных 4-й группы (не получавших профилактическое лечение) и у 8 (28,6%) больных 3-й группы (получавших аллопуринол). После операции количество больных с повышенным уровнем панкреатических ферментов в крови составило в 4 группе — 9 (15,5%) больных, в 3 группе — 5 (17,9%, $p > 0,05$) пациентов (рис. 10).

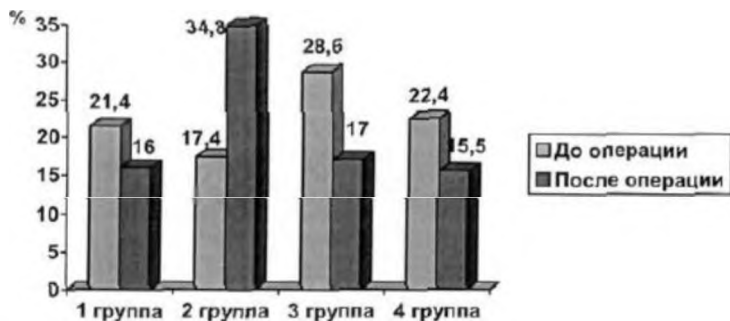


Рисунок 10. Доля больных с повышенной активностью амилазы и/или липазы в крови больных с калькулёзным холециститом до и после лапароскопической холецистэктомии

2. *Группы пациентов с сочетанием мелких и крупных камней.* По числу пациентов с повышенным уровнем хотя бы одного из ферментов поджелудочной железы до операции достоверных различий между группами не было (рис. 10). Так, во 2-й группе, где аллопуринол не применяли, количество таких больных составило 8 (17,4%), а в 1-й группе — 9 (21,4%) ($p > 0,05$). После операции количество пациентов, у которых был зарегистрирован подъем уровня амилазы или липазы сыворотки крови выше физиологической нормы, в контрольной группе увеличилось до 16 (34,8%) ($p < 0,05$), в то время как в группе больных, получавших аллопуринол, оно достоверно не изменилось.

Проведение профилактического лечения острого послеоперационного панкреатита аллопуринолом сокращало продолжительность лечения. Количество пациентов, находившихся на стационарном лечении две и более недель, во 2 (контрольной) группе составило 15,2%, а в 1-й группе (получавшей аллопуринол) – 2,3% ($p < 0,05$)

Таким образом, у больных калькулезным холециститом, имевших мелкие конкременты в желчном пузыре, сравнительно высок риск развития острого послеоперационного панкреатита. Применение профилактики аллопуринолом позволяет снизить абсолютный риск на 8,7%, относительный – на 100%, для получения положительного эффекта метода требуется пролечить 12 больных.

В исследование включены 109 больных со злокачественными опухолями желудка и пищевода, соотношение мужчин и женщин – 2 : 1. Больных в возрасте 41–50 лет было 28 (26%), 51–60 лет – 29 (27%), 61–70 лет – 40 (36%), старше 70 лет – 12 (11%). Выполнены следующие оперативные вмешательства: экстирпация и проксимальная резекция желудка – у 57 человек (52,3%), дистальная резекция желудка – у 35 человек (32,1%), субтотальная резекция пищевода – у 17 больных (15,6%).

Все больные получали по одинаковой схеме базисную послеоперационную терапию – анальгетики, фраксипарин, пентоксифиллин, антибиотики, инфузионные средства, препараты для парентерального питания.

Больные были разделены на 3 группы.

1-я группа ($n=30$) – профилактика послеоперационного панкреатита не проводилась,

2-я группа ($n=44$) – для профилактики послеоперационного панкреатита использовали сандостатин с контрикалом по схеме: сандостатин 200 мг подкожно в начале основного этапа операции, затем по 100 мг 2 раза в сутки в течение 5 дней, а также контрикал – 100 тыс. АтрЕ в ходе операции, в последующие 4 дня по 50 тыс. АтрЕ внутривенно 2 раза в сутки,

3-я группа ($n=35$) – применяли водорастворимые антиоксидантные препараты, способные к захвату свободных радикалов кислорода, по схеме: тиоктацид 600Т – 24,0 в 400 мл 0,9% раствора NaCl внутривенно капельно, убихинон-композитум – 2,2 внутримышечно в начале основного этапа операции и через 6-8 часов после первого введения, в последующие трое суток – один раз в сутки утром, флуимуцил-3,0 внутривенно 1 раз в сутки вечером, на 4 сутки – 2 раза

При формировании групп учитывали продолжительность, тип и травматичность операций, что может оказывать влияние на частоту развития острого послеоперационного панкреатита

При оценке травматичности операции исходили из ее объема, который оценивали в баллах 1 балл – дистальная резекция желудка, 2 балла – субтотальная резекция пищевода (операция типа Льюиса), 3 балла – проксимальная резекция желудка, 4 балла – экстирпация желудка. К этому числу прибавляли баллы вмешательств, расширяющих объем операции: резекция поджелудочной железы – 4 балла, лимфодиссекция в объеме Д2 или Д3 – 3 балла, спленэктомия – 2 балла, резекция левой доли печени, нижней трети пищевода, кардии и дна желудка, ободочной кишки – каждый этап по 1 баллу. В тех случаях, когда пластика пищевода выполнялась стеблем из большой кривизны желудка, с удалением селезенки (+2 балла), операцию по травматичности относили к проксимальной резекции (+3 балла).

До операции ультразвуковые признаки хронического панкреатита без клинических проявлений (нечеткость контуров и повышенная эхогенность поджелудочной железы, неровность контуров) обнаружены у 60% больных.

Профилактика острого послеоперационного панкреатита проводилась во 2 и в 3 группах методом случайного выбора.

Состояние больных в послеоперационном периоде оценивали по сумме баллов, которые были присвоены каждому клиническому признаку (табл. 6).

Таблица 6

Оценка в баллах клинических признаков в послеоперационном периоде у больных раком желудка и пищевода

Признаки	Баллы
Боль	0 – нет, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – сильная
ЧСС, уд/мин	до 90 уд/мин – 0 баллов, 91-100 уд/мин – 1 балл, более 100 уд/мин – 2 балла
Температура тела (вечерняя и утренняя), °С	повышение на 0,1 выше 36,9 – один балл, на 0,2 – два балла и т.д.
Язык	0 – влажный, 1 – умеренно сухой, 2 – сухой
Жажда	0 – нет, 1 – есть
Живот	0 – не вздут, 1 – подвздут, 2 – вздут до реберных дуг, 3 – вздут выше реберных дуг
Отхождение газов	0 – отходят, 1 – не отходят
Тошнота	0 – нет, 1 – есть

Признаки	Баллы
Рвота	0 – нет, 1 – один раз, 2 – два раза, 3 – многократная
Перистальтика	0 – активная, 1 – ослаблена, 2 – не слышна
Выраженная общая слабость	0 – нет, 1 – есть

Как интегральный клинический показатель острого послеоперационного панкреатита принимали сумму более десяти баллов за 5 суток, что подтверждалось 5-кратным увеличением активности амилазы и липазы или, по меньшей мере, одного из ферментов в крови у этих больных

В процессе наблюдения за больными в течение 5 суток послеоперационного периода острый послеоперационный панкреатит диагностирован

- 1) в группе больных, не получавших профилактики – у 20%,
- 2) у больных, получавших сандостатин с контрикалом – у 11,4% ($p > 0,05$ по сравнению с контрольной группой)

В группе больных, получавших комплекс антиоксидантных препаратов, случаев послеоперационного панкреатита не было ($p < 0,01$ с обеими группами)

Наиболее благоприятно, по большинству признаков, послеоперационный период протекал у больных, получавших с профилактической целью антиоксидантные препараты (табл. 7)

Температурная реакция во 2 и 3 группах была выражена слабее, чем в контрольной. Тахикардия встречалась чаще в контрольной группе (1,67 баллов), чем в двух основных (1,4 балла во 2 группе и 1,03 балла в 3 группе, $p < 0,01$)

Интенсивность болевого синдрома в первые трое суток после операции была меньшей у больных, получавших антиоксидантную терапию ($3,9 \pm 0,2$ балла, $p < 0,05$). В то же время различий по этому признаку между контрольной группой и больными, получавшими контрикал и сандостатин, не получено, несмотря на широко распространенное мнение об аналгезирующем действии контрикала. На 3–4-е сутки болевой синдром ослабевал, и различия между группами нивелировались.

Перистальтика кишечника во 2 и 3 группах была более активной – $6,74 \pm 0,29$ баллов в 3 группе и $6,43 \pm 0,32$ баллов во 2 группе, чем в контроле – $5,43 \pm 0,31$ баллов ($p < 0,05$). К нежелательным эффектам терапии сандостатином в сочетании с

контрикалом можно отнести вздутие живота на 4-5-е сутки послеоперационного периода (1,89 баллов, $p < 0,01$ в сравнении с другими группами) Ни в контрольной группе (0,87 балла), ни в группе больных, получавших антиоксиданты (1,0 балл), этот симптом не был столь резко выражен

Таблица 7

Клинические признаки в послеоперационном периоде у больных, не получавших профилактическое лечение (1 группа), получавших сандостатин и контрикал (2 группа), антиоксиданты (3 группа)

Клинические признаки, баллы		Группы больных		
		1	2	3
Рвота или тошнота		16,7	6,8	2,9*
Выраженная общая слабость		1,37	1,32	0,8***#
Сухость языка		1,20	1,91***#	1,57**
Болевой синдром в течение 3-х суток		4,8±0,2	4,8±0,2	3,9±0,2*#
Активность перистальтики		5,43±0,31	6,43±0,32*	6,74±0,29*
Частота сердечных сокращений		1,67	1,40**	1,03***#
Вздутие живота		0,97	1,89***#	1,00
Повышение температуры тела, балл ¹	вечером	12,7	6,9***#	10,4
	утром	4,1	2,8**	2,4**

Примечания

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ сравнение групп 2 и 3

1 Ошибка средних указана только для показателей, сравниваемых по критерию t Стьюдента. В остальных случаях подсчет проводился по непараметрическим критериям

2 Нормальная температура тела – 0 баллов, повышение на 0,1 °C выше 36,9 – 1 балл, 0,2 °C – 2 балла и т.д.

3 Баллы клинических признаков отражают степень нарушения функций, за исключением перистальтики (активность перистальтики, а не ее угнетение), при подсчете суммы баллов это учтено

Не вызывая чувства жажды, оба способа профилактики послеоперационного панкреатита усиливали ощущение сухости языка, однако у больных, получавших сандостатин и контрикал это явление было выражено в большей степени (1,91 балл) по сравнению с пациентами, получавшими терапию антиоксидантными препаратами (1,57 балла, $p < 0,01$)

Назначение комплекса антиоксидантных препаратов благоприятно сказывалось на общем самочувствии больных – выраженная общая слабость наблюдалась реже – 0,8 балла, чего нельзя сказать о сандостатине и контрикале (1,32 балла) ($p < 0,01$)

Послеоперационный период протекал тяжелее (по суммарному за 5 суток клиническому баллу) у больных контрольной группы – $5,04 \pm 0,34$ ($p < 0,01$) и у больных, получавших сандостатин и контрикал – $4,96 \pm 0,23$ ($p < 0,05$), по сравнению с группой больных, получавших антиоксиданты – $4,14 \pm 0,22$ (табл 7)

Наиболее объективным показателем, отражающим состояние поджелудочной железы в послеоперационном периоде, является активность панкреатических ферментов. Повышение активности ферментов, 5-кратно превышающее норму, одинаково часто наблюдалось и в контрольной группе – у 26,7% больных, и в группе, получавшей сандостатин с контрикалом – у 22,7% пациентов (табл 8)

Бессимптомное повышение активности ферментов амилазы и/или липазы – более чем 5-кратное суммарное превышение нормы за первые трое суток, при отсутствии клинических признаков панкреатита (без учета больных, которым выставлен диагноз острого послеоперационного панкреатита) зарегистрировано в контрольной группе у 3 человек (10%), в группе больных, получавших сандостатин и контрикал – у 5 (11,7%), в группе больных, получавших антиоксиданты – у 2 пациентов (5,7%) ($p < 0,01$)

Таблица 8

Показатели клинической тяжести (в баллах) оперированных больных и доли пациентов с повышенной активностью панкреатических ферментов

Группы	Средний балл клинической тяжести за 5 суток	Пятикратное и более повышение активности ферментов, частота в %
Первая (контрольная)	$5,04 \pm 0,34$	26,7
Вторая (сандостатин + контрикал)	$4,96 \pm 0,23$	22,7
Третья (антиоксиданты)	$4,14 \pm 0,22^{** \#}$	5,7 ^{** \#}

Примечание ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем, # # $p < 0,01$ сравнение групп 2 и 3

Сопоставление клинической картины с показателями активности панкреатических ферментов позволило поставить диагноз острого послеоперационного панкреатита у 6 (20%) больных контрольной группы и у 5 (11,4%) получавших сандостатин и контрикал. В группе больных, получавших антиоксиданты, это осложнение не развилось ни в одном случае.

Достигнуто снижение абсолютного риска развития острого послеоперационного панкреатита на 11,4%, относительного – на 100%, для получения положительного эффекта метода требуется пролечить 9 больных.

Анализ полученных результатов, проведенный по принципам доказательной медицины, показал обоснованность вывода о целесообразности применения антиоксидантов для профилактики острого послеоперационного панкреатита.

Кроме острого панкреатита, у 3 больных контрольной группы диагностированы поддиафрагмальные абсцессы, по поводу чего они оперированы повторно. У больных, получавших сандостатин с контрикалом, поддиафрагмальный абсцесс образовался у 2 больных. У больных, получавших антиоксидантные препараты, осложнения развились в 2 случаях – несостоятельность пищеводно-желудочного анастомоза после операции Гэрлока и гематома в левом поддиафрагмальном пространстве. Общая летальность составила 1,8% и не была обусловлена острым послеоперационным панкреатитом. Осложнений, связанных с применением антиоксидантных препаратов, не зарегистрировано.

Нами были проанализированы случаи, когда продолжительность лечения в послеоперационном периоде превышала две недели. В 1-й группе таких больных было 11 человек (36,7%), во 2-й группе – 19 человек (43,2%), а в 3-й – 6 человек (16,7%) ($p < 0,01$ в сравнении с группой, получавшей сандостатин с контрикалом и $p < 0,05$ – с контрольной группой).

Таким образом, клинически доказанная эффективность нового метода профилактики подтверждает правильность выводов о новом звене патогенеза острого панкреатита, а именно инициации воспалительно-деструктивного процесса в поджелудочной железе активными формами кислорода (рис. 11).

СХЕМА ПАТОГЕНЕЗА ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА



Рисунок 11. Схема патогенеза острого панкреатита

Патогенетически обоснованное профилактическое применение антиоксидантных препаратов при операциях на органах верхнего этажа брюшной полости объективно снижает клиническую тяжесть течения послеоперационного периода, частоту развития послеоперационного панкреатита и сокращает продолжительность лечения

ВЫВОДЫ

1 Внутриклеточная активация протеолитических ферментов и некоторое снижение их плазменных ингибиторов в ранней фазе острого панкреатита не приводят к аутолизу поджелудочной железы и развитию феномена «уклонения» ферментов с повреждением других органов

2 В раннюю фазу острого панкреатита гибель клеток поджелудочной железы происходит преимущественно путем апоптоза. Об этом свидетельствуют деформация и распад ядер панкреоцитов, положительный тест на межнуклеосомные разрывы ДНК. Ишемический искроз ацинарных клеток не является ведущим механизмом в раннюю фазу экспериментального панкреатита

3 Пусковым механизмом гибели ацинарных клеток является генерация свободных радикалов кислорода, основными источниками являются ксантиноксидазная система и митохондриальные электронтранспортные цепи панкреоцитов

4 Частота развития острого панкреатита после различных операций на органах верхнего этажа брюшной полости составляет от 8,7% (после лапароскопической холецистэктомии) до 20% (после операций при раке желудка и пищевода). Фактором риска у больных с калькулезным холециститом является наличие мелких конкрементов в желчном пузыре

5 Новый метод профилактики острого послеоперационного панкреатита основан на применении антиоксидантных препаратов – ингибиторов ксантиноксидазы и супероксидного радикала. При лапароскопической холецистэктомии показано назначение аллопуринола, а после операций на желудке и пищеводе – комплекса средств, состоящих из тиоктацида 600Т, флуимуцила и убихинона-композитума

6 Изучение непосредственных результатов различных операций на органах верхнего этажа брюшной полости показало высокую эффективность применения антиоксидантных препаратов для профилактики острого послеоперационного панкреатита. После лапароскопической холецистэктомии отмечено уменьшение частоты повышения активности панкреатических ферментов в крови и отсутствие развития острого панкреатита (снижение абсолютного риска 8,7%, относительного риска 100%). У больных раком желудка и пищевода удалось снизить тяжесть течения послеоперационного периода и полностью избежать развития данного осложнения (снижение абсолютного риска 11,4%, снижение относительного риска 100%)

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1 При выполнении расширенных и комбинированных операций на желудке и пищеводе по онкологическому принципу профилактику острого послеоперационного панкреатита антиоксидантными препаратами необходимо начинать за 15-20 минут или непосредственно перед выполнением основного этапа операции

2 Схема профилактики заключается во внутривенном введении тиоктацида 600Т-24,0 мл на 400,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида (капельно в течение 30 минут – 1 часа), убихинона-комполитума 2,2 мл внутримышечно. Назначение тиоктацида и убихинона повторяется в той же дозе через 6-8 часов. Со следующего дня тиоктацид и убихинон применяются 1 раз в сутки утром в течение 3 дней, в вечернее время дополнительно вводится – флуимуцил 3,0 мл внутривенно. На 4-е сутки флуимуцил назначается 2 раза в сутки.

3 При лапароскопической холецистэктомии по поводу калькулезного холецистита у больных с мелкими конкрементами в желчном пузыре в профилактических целях целесообразно применять аллопуринол, из расчета курсовой дозы 50 мг / кг веса больного, в два приема – утром и вечером.

4 Для диагностики острого послеоперационного панкреатита необходимо проводить определение активности нескольких панкреатических ферментов, в частности – альфа-амилазы, при ее повышении выше нормы – панкреатической липазы. Исследование хотя бы одного из ферментов желательно выполнять в течение 3 часов после окончания операции. Более чем двукратное повышение активности панкреатических ферментов сразу после операции позволяет заподозрить острый панкреатит и начать его лечение.

5 При наблюдении за больными в послеоперационном периоде целесообразно принимать во внимание не только величины активности панкреатических ферментов, особенно при их небольшом повышении, но и учитывать несоответствие клинической картины тяжести перенесенной операции.

6 Разработанную экспериментальную модель острого панкреатита можно рекомендовать для дальнейшего изучения патогенеза этого заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

- 1 Экспериментальный панкреонекроз у собак // X Научные чтения памяти академика Н Н Бурденко Статьи, тезисы научных докладов – Пенза, 1996 – С 58-60
- 2 К вопросу о моделировании острого панкреатита // Самарский медицинский архив - 1997 – №5 – С 19-20
- 3 Изменения ферментных систем организма при остром панкреатите в эксперименте // Самарский медицинский архив – 1998 – №6 – С 14-15 (Соавт Майоров О Н , Подковкин В Г , Савин А М)
- 4 Экспериментальная модель острого панкреатита у крыс // Вопросы экстренной хирургии и организации хирургической помощи Сборник научных трудов конференции, посвященной 10-летию стационара КМСЧ №3 – Самара, 1999 – С 124-127
- 5 Метод определения активности коллагеназы в биологических жидкостях с использованием трипсиноустойчивого коллагена // Материалы 32-й итоговой научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Самарского Военно-медицинского института Сборник научных работ – 1999 – С 43-44 (Соавт Милякова М Н)
- 6 Лечение ранений и закрытых травм поджелудочной железы // Современные технологии диагностики и лечения раненых и больных в поликлинике и стационаре Тезисы докладов 2-й научно-практической конференции 574-го Военного клинического госпиталя – М , 1999 – С 52 (Соавт Пырлык А В)
- 7 Хирургическое лечение повреждений поджелудочной железы // Анналы хирургической гепатологии Материалы Всероссийской конференции хирургов-гепатологов – Кемерово, 1999 – С 47 (Соавт Пырлык А В)
- 8 Анатомия панкреатобилиарной зоны белой крысы // Материалы 32-й итоговой научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Самарского военно-медицинского института Сборник научных работ – 1999 – С 109-111 (Соавт Сарбаева Н Н , Милякова М Н , Детюченко В П)
- 9 Механизмы развития острой печеночной недостаточности при остром панкреатите // Вопросы экстренной хирургии и организации хирургической помощи Сборник научных трудов конференции, посвященной 10-летию стационара КМСЧ №3 – Самара, 1999 – С 127-131 (Соавт Сарбаева Н Н , Милякова М Н)
- 10 Свободнорадикальное окисление и активность ферментов биотрансформации ксенобiotиков в печени крыс с экспериментальным острым панкреатитом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2001 – Т 132, №8 – С 167-169 (Соавт Сарбасва Н Н , Милякова М Н , Детюченко В П)
- 11 К вопросу о роли свободнорадикального окисления в патогенезе острого панкреатита и нарушений детоксицирующей функции печени // Органосохраняющие принципы в хирургии неотложных состояний Материалы Всерос-

- сийской научно-практической конференции – Краснодар-Ейск, 2001 – С 126-127 (Соавт Сарбаева Н Н , Милякова М Н)
- 12 Панкреонекроз диагностика и лечение пареза кишечника // Панкреатит острый и хронический Материалы международного конгресса хирургов – Петрозаводск, 2002 – С 170-171 (Соавт Петров В А)
- 13 К вопросу о роли свободнорадикального окисления в патогенезе острого экспериментального панкреатита // Панкреатит острый и хронический Материалы международного конгресса хирургов – Петрозаводск, 2002 – С 238-239 (Соавт Сарбаева Н Н , Милякова М Н)
- 14 Генерация свободных радикалов кислорода в патогенезе острого экспериментального рефлюкс-панкреатита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2002 – Т 134, №7 – С 33-35 (Соавт Сарбаева Н Н , Милякова М Н)
- 15 К вопросу о гибели панкреоцитов при остром экспериментальном панкреатите // Медицина будущего Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции – Краснодар-Сочи, 2002 – С 67-68 (Соавт Сарбаева Н Н , Детюченко В П)
- 16 О механизме гибели панкреоцитов при остром билиарном панкреатите // Физиология и патология пищеварения Материалы 18 Всероссийской конференции – Геленджик, 2002 – С 71-72 (Соавт Сарбаева Н Н)
- 17 Роль пищеварительных ферментов в патогенезе панкреатита // Труды 67-й научной сессии КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрального черноземного центра РАМН – Курск, 2002 – Ч 1 – С 117-118 (Соавт Сарбаева Н Н , Милякова М Н)
- 18 Пусковые механизмы активации трипсиногена при остром панкреатите // Биомедицинская химия – 2003 – Т 49, №5 – С 491-501
- 19 Роль цитокинов и других сигнальных молекул в патогенезе острого панкреатита // Вестник Российской академии медицинских наук – 2003 – №9 – С 44-48
- 20 Модификация метода определения эстеразной активности трипсина // Биомедицинская химия – 2003 – Т 1 (49), №1 – С 63-69 (Соавт Милякова М Н , Сарбаева Н Н)
- 21 Апоптоз ацинарных клеток на ранней стадии экспериментального билиарного панкреатита // Новости клинической цитологии России – 2003 – Т 7, №3-4 – С 56-58 (Соавт Сарбаева Н Н , Детюченко В П)
- 22 Острый панкреатит после лапароскопической холецистэктомии // Материалы 37-й итоговой научно-практической конференции научно-педагогического состава Самарского Военно-медицинского института – 2004 – С 160-161 (Соавт Мишайлов Н А , Тюмин И А)
- 23 Возможный механизм и патофизиологическая значимость регуляции активности супероксиддисмутазы свободными радикалами кислорода // Биомедицинская химия – 2005 – Т 52, №2 – С 130-137 (Соавт Милякова М Н)

- 24 Гепатопривный синдром при остром панкреатите // Вестник Российской военно-медицинской академии – 2005 – Приложение 1(13) – С 143-144 (Соавт Срыбная А В , Милякова М Н)
- 25 Антирадикальное действие аллопуринола на ранних этапах острого экспериментального панкреатита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2006 – Т 142, №3 – С 34-37 (Соавт Милякова М Н , Миняйлов Н А)
- 26 Источники свободных радикалов кислорода при остром экспериментальном панкреатите // Актуальные вопросы военной медицины Сборник тезисов и статей 36-й итоговой научно-практической конференции научно-педагогического состава Самарского Военно-медицинского института – 2006 – С 78-79 (Соавт Милякова М Н)
- 27 Профилактика острого послеоперационного панкреатита при лапароскопической холецистэктомии // Эндоскопическая хирургия – 2006 – №1 – С 9-11 (Соавт Цветков Б Ю , Бсиян А С)

Авторские свидетельства, патенты

1 Патент РФ на изобретение №2224298 «Способ моделирования острого панкреатита» / Шабанов В В , Перевозчиков Б Г Самарский Военно-медицинский институт – Заявка №99116667 от 29 07 1999 г – Приоритет от 29 07 1999 г – Изобретения полезные модели – 2001 – Т 13, Ч I – С 168

Рационализаторские предложения

1 Рационализаторское предложение №849 от 28 05 2007 г «Модификация метода определения эстеразной активности трипсина в биологических жидкостях»

2 Рационализаторское предложение №850 от 28 05 2007 г «Модификация метода Anderson воспроизведения острого панкреатита»

3 Рационализаторское предложение №851 от 28 05 2007 г «Метод профилактики острого послеоперационного панкреатита»

Подписано в печать 21 06 2007

Формат 60x84 /16 Бумага офсетная Печать оперативная

Объем 2,25 печ л Тираж 100 экз Заказ 524

Отпечатано в ООО "Типография "Книга"

443070, г Самара, ул Песчаная, 1 Тел (846) 267-36-82

E-mail slovo@samaramail.ru