

© Коллектив авторов, 2009
УДК 616.381-007.274-092

С.В.Минаев, В.С.Обозин, Л.Т.Пустошкина, Г.М.Барнаш, И.Н.Туллюбаев

НОВЫЕ АСПЕКТЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ СПАЕЧНОГО ПРОЦЕССА БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ¹

Кафедра детской хирургии (зав. — проф. С.В.Минаев) Ставропольской государственной медицинской академии

Ключевые слова: ангиогенез, иммуногистохимия, брюшная полость, спайки.

Введение. Спаечный процесс в брюшной полости и развивающиеся в этой связи осложнения занимают ведущее место в структуре причин заболеваемости и смертности в абдоминальной хирургии. Патогенез образования спаек — многофакторный и недостаточно изученный процесс. Любое оперативное вмешательство на органах брюшной полости сопровождается выпадением фибрина [6, 12]. Последний может приводить к развитию внутрибрюшных сращений, являясь одной из главных причин кишечной непроходимости. Несмотря на прогресс в лечении внутрибрюшных спаек, число осложнений и случаев развития кишечной непроходимости остается высоким. В литературных источниках практически отсутствуют работы по изучению факторов ангиогенеза в возникновении интраабдоминального спаечного процесса [13]. Вместе с этим, исследование данного процесса является очень важным для решения вопросов лечения и профилактики спаек после хирургического вмешательства.

Цель исследования — изучение патогенеза спаечного процесса в брюшной полости и проведение мероприятий, направленных на снижение фиброзного процесса в абдоминальной хирургии.

Материалы и методы. Клиническую часть исследования осуществляли на клинической базе хирургических отделений Краевой детской клинической больницы г. Ставрополя. Под нашим наблюдением находилось 126 детей с кишечной непроходимостью, которые ранее были оперированы по поводу: острого аппендицита — 86 (68,3%), тупой травмы живота — 11 (8,7%), инвагинации кишечника — 27 (21,4%), синдрома Пейтца—Джигерса — 2 (1,6%). Все больные были разделены на 2 группы — основная (57 пациентов) и контрольная (69 пациентов). Соотношение мальчиков и девочек было примерно одинаковым и составляло 1,2:1. Средний возраст больных был (7,6±0,6) года. В послеоперационном периоде дети, наряду со стандартным лечением,

получали противоспаечную терапию: в контрольной группе в виде моноферментной физиотерапии (электрофорез гиалуронидазы), в основной — полиферментную терапию препаратом Вобэнзим (Германия), который использовали в послеоперационном периоде, начиная с момента восстановления функции кишечника, в течение 4 нед по 1 драже на 6 кг массы тела 3 раза в сутки. В состав Вобэнзима входят: панкреатин (100 мг), трипсин (24 мг), химотрипсин (1 мг), амилаза (10 мг), липаза (10 мг), папаин (60 мг), бромелаин (45 мг), рутин (50 мг).

Эффективность лечения основывалась на следующих критериях: динамика общих и местных симптомов, длительность лечения в стационаре; лабораторные данные (общий анализ крови и мочи, биохимическое исследование, С-реактивный белок), а также исследование качества жизни [1].

Экспериментальную часть исследования проводили на 70 крысах с массой 150–180 г. Моделирование спаечного процесса в брюшной полости осуществляли под кислородно-эфирной смесью, после выполнения срединной лапаротомии производили десерозирование стенки толстой кишки и брюшины передней брюшной стенки 75 ° этиловым спиртом. Животные были разделены на две равные группы по 35 крыс в каждой. В опытной группе проводилось зондовое введение полиферментного препарата Вобэнзим, растворенного в 2 мл стерильного физиологического раствора. Полиэнзимный препарат вводили при помощи шприца через металлический зонд в желудок за 30 мин до приема пищи 2 раза в сутки в течение 21 дня в дозе 100 мг/(кг•сут). В контрольной группе животным проводили зондовое введение физиологического раствора. Животные выводились из эксперимента на 1-, 3-, 7-, 21-, 28-е и 90-е сутки послеоперационного периода. После секционного определения степени развития спаечного процесса выполняли забор париетальной и висцеральной брюшины с последующим изготовлением срезов толщиной 8–10 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и микрофуксином по Ван-Гизону.

Иммуногистохимическое исследование проводили на операционном материале на депарафинированных срезах толщиной 4–5 мкм, расположенных на предметных стеклах, покрытых L-полилизин. Использовали моноклональные антитела к белку базальной мембраны — Ламинину (Laminin γ), к факторам ангиогенеза: к васкулоэндотелиальному фактору (VEGF) и к основному фактору роста фибробластов (bFGF). Контрольная реакция проводилась без использования первичных специфических антител (негативный контроль).

¹ Исследование проводилось в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук МД-84.2008.7.

Результаты окрашиваний оценивались для VEGF и bFGF: положительной реакцией считали окрашивание клеточной мембраны или/и цитоплазмы эндотелиоцита сосуда в желто-коричневый цвет. Было исследовано не менее 5 полей зрения в случайном порядке под световым микроскопом (ув. 400), число клеток, накапливающих фактор ангиогенеза, подсчитывали в 500 эндотелиоцитах. Регистрацию результата проводили согласно количественному соотношению клеток, накапливающих маркер, и критерию, сформулированному на Пекинской конференции по стандартизации иммуногистохимических методов диагностики [2]: 0–25% — отрицательный результат (–); 26–50% — слабо положительный (+); 51–75% — умеренно положительный (++) ; 76–100% — резко положительный результат (+++).

Исследование ламинина проводили следующим образом: резко положительный результат (+++) — ламинин в виде выраженной темно-коричневой жирной линии по базальной мембране капилляра; умеренно положительный результат (++) — выраженная коричневая прерывистая жирная линия по базальной мембране капилляра; слабо положительный результат (+) — ламинин в виде поверхностного фрагмента коричневого окрашивания по базальной мембране капилляра и отрицательный результат (–) — отсутствие ламинина [15].

Статистический анализ осуществлялся при помощи χ^2 -теста, критерия Вилкоксона и критерия Стьюдента с использованием программ Biostatistics 4.03 (SA Glantz, McGraw Hill), Statistica v.6.0 (StatSoft, USA).

Результаты и обсуждение. Всем пациентам с явлениями ранней спаечной кишечной непроходимости лечение начинали с проведения комплекса консервативных мероприятий (постановка назогастрального зонда, инфузионная терапия, антихолинэстеразные средства, очистительная или гипертоническая клизма). Отсутствие эффекта от проводимого лечения являлось показанием к проведению лапаротомии с висцеролизом и устранением причины непроходимости.

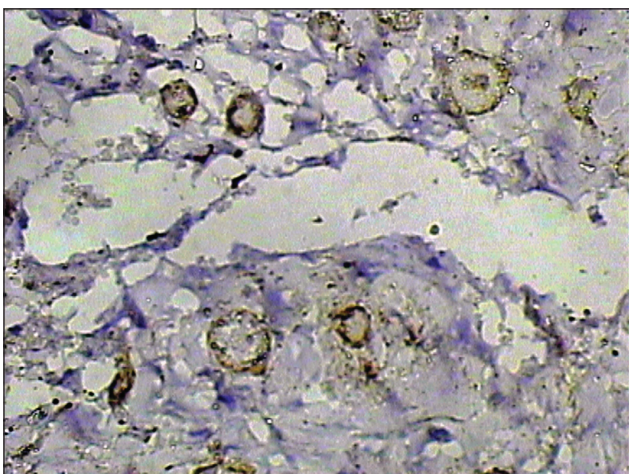


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование VEGF в контрольной группе.

Резко положительное окрашивание эндотелиоцитов сосудов за счет высокого накопления васкулоэндотелиального фактора в контрольной группе (световое ув. 400).

Длительность послеоперационного периода в стационаре в основной группе была короче — $(17,9 \pm 3,7)$ сут, чем в контрольной — $(19,4 \pm 1,4)$ сут. Время заживления операционной раны было короче в основной группе $(10,2 \pm 1,3)$ сут, чем в контрольной группе — $(12,1 \pm 0,9)$ сут. Наряду с локальным снижением активности воспалительного процесса, в основной группе ко 2–4-м суткам происходила нормализация температуры тела, а в контрольной группе лихорадка держалась на протяжении 3–6 сут. Болевой синдром купировался в основной группе достоверно раньше — к $(3 \pm 0,3)$ -м суткам ($p < 0,05$) после оперативного вмешательства.

У 5 больных (5,8%) контрольной группы, которым проводилось комплексное лечение с включением моноферментной терапии (электрофорез ферментов), развилась: ранняя (у 1 ребенка) и поздняя (у 3 детей) спаечная кишечная непроходимость, нагноение послеоперационной раны — у 1, расхождение ее краев — у 1. В основной группе отмечался 1 случай (1,7%) поздней спаечной кишечной непроходимости.

Таким образом, применение в комплексном лечении полиферментной терапии у пациентов со спаечной кишечной непроходимостью позволяет добиться уменьшения длительности послеоперационного периода и количества послеоперационных осложнений.

Изучение патогенеза спаечного процесса в экспериментальных условиях выявило, что в контрольной группе распространенность спаечного процесса была значительно более выражена по сравнению с опытной группой. Количество животных с отсутствием спаек в опытной группе было на уровне 60%, в то время как в контрольной

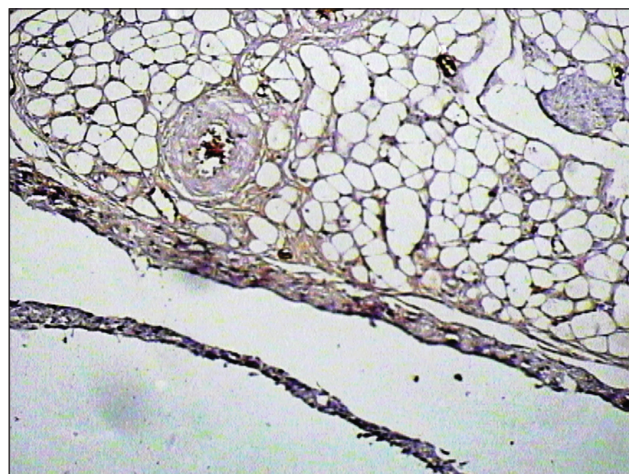


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование bFGF в основной группе.

Слабо положительное накопление фактора роста фибробластов в эндотелиоцитах сосудов в основной группе (световое ув. 400).

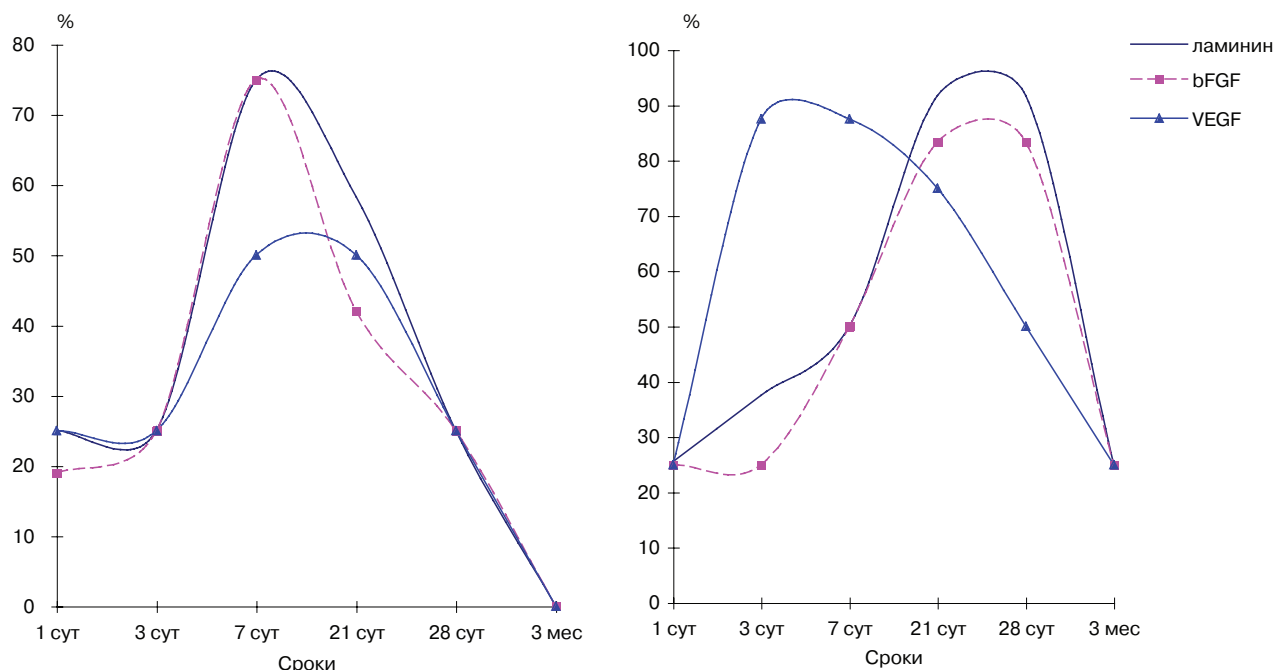


Рис. 3. Динамика накопления VEGF, bFGF и ламинина в основной и контрольной группе.

ной группе оно составляло 20%. Проведенные расчеты подтвердили достоверность уменьшения спаечного процесса у животных, которым проводилась полиферментная терапия ($\chi^2=23,1$, $df=2$, $p=0,001$).

Оперативное вмешательство в исследуемых группах приводило к выпадению фибрина в брюшной полости. При этом до 3-х суток после начала эксперимента на большей части висцеральной брюшины отмечали десквамацию и разрушение эпителиальных клеток в обеих группах животных. Подлежащая соединительнотканная строма была отечна и разрыхлена с выраженными сосудистыми нарушениями (гиперемия сосудов, стазы, тромбоз и кровоизлияния). В контрольной группе сохранялись отек и гиперемия сосудов, кровоизлияние, диффузная инфильтрация серозной оболочки полиморфно-ядерными лейкоцитами, также имелась эозинофильная инфильтрация. В опытной группе в подлежащей строме брюшины отмечалось уменьшение отека при сохраняющихся сосудистых нарушениях.

Результаты иммуногистохимического исследования также свидетельствовали в пользу снижения спаечного процесса в брюшной полости в опытной группе. Сравнение двух групп показало, что выраженность накопления VEGF в опытной группе была меньше почти в 2 раза (рис. 1), чем в контрольной группе и позднее. Вместе с этим, высокая концентрация bFGF в эндотелиоцитах и ламинина в базальной мембране отмечалась в контрольной группе (рис. 2). Следует отметить, что в

опытной группе концентрация bFGF и ламинина была максимальной к 7-м суткам, а в контрольной группе — к 21-м суткам (рис. 3).

Факторы ангиогенеза активируют или ускоряют развитие кровеносных капилляров, из которых VEGF и bFGF представляют собой два вида различных по действию фактора. VEGF является основным фактором ангиогенеза, который непосредственно влияет на развитие кровеносных сосудов, а выраженность его накопления в тканях тесно связана с плотностью капилляров и видом новообразованных сосудов [11].

FGF является стимулятором ангиогенеза, который поддерживает и стимулирует дифференцировку клеток различных нейрональных типов *in vivo* и *in vitro*. Помимо основной и кислой форм FGF, семейство включает фактор роста кератиноцитов и фактор роста эндотелия сосудов [2, 8].

Внеклеточный матрикс (ВКМ) — это вещество, окружающее подлежащую соединительную ткань эпителиальных и эндотелиальных клеток, которое обеспечивает механическую поддержку для целостности всего организма. Образование ВКМ является одним из неотъемлемых условий для васкуляризации. На ранних этапах заживления тканей образующаяся базальная мембрана состоит в основном из сети ламинина и не содержит коллагена типа IV. Ламинин — адгезивный гликопротеин, который выступает в роли основного цементирующего субстрата в процессе ангиогенеза [7].

Новообразование сосудов (неоангиогенез) происходит в условиях повреждения клеток и тканей и нередко сопровождается воспалением. Выделяют следующие стадии неоангиогенеза: 1) увеличение проницаемости эндотелия и разрушение базальной мембраны; 2) миграция эндотелиальных клеток; 3) пролиферация эндотелиальных клеток; 4) «созревание» эндотелиальных клеток и ремоделирование сосудов [5].

Ангиогенез является неотъемлемым этапом при формировании спаек. Патологический ангиогенез происходит тогда, когда эффект стимулирующих молекул превосходит эффект ингибирующих. Тщательные исследования привели к осознанию того, что процесс ангиогенеза включает в себя нечто большее, чем просто пролиферацию эндотелиоцитов. Эндотелиоциты делятся и внедряются в базальную мембрану, а затем подвергаются дифференцировке и участвуют в формировании капилляров [4, 10]. Этот процесс контролируется ангиогенными молекулами, а также другими факторами, такими как распавшиеся ферменты, которые опосредуют вышеуказанный процесс. Прием смеси ферментов, содержащей бромелаин, трипсин, химо tripsин и папаин, стимулирует клеточную экспрессию факторов роста, VEGF, bFGF, PDGF-BB и TIMP-1. Известно, что добавление протеаз стимулирует цитотоксичность периферических нейтрофилов *in vitro*. Проведенное исследование показало [3], что полиферментный препарат Вобэнзим увеличивает уровень ингибитора ангиогенеза (TIMP-1) и снижает уровень стимуляторов ангиогенеза в крови (VEGF и bFGF).

Основным звеном физиологической профилактики спайкообразования является целостность брюшины. Последняя отвечает за выработку плазминогенактивирующего фактора, способствующего лизису фибрина. Наиболее активно процесс фибринолиза происходит в первые 3–4 сут после выпадения фибрина в очаге воспаления. Если же фибринолитическая активность не восстанавливается (из-за деструкции мезотелия), то продолжающееся снижение уровня плазминогенактивирующего фактора на поверхности брюшины приводит к организации фибрина и образованию коллагеновой ткани [9].

Гидролитические ферменты широко применяются в медицинской практике путем приема *per os* при различных заболеваниях. Комплексные ферментативные препараты дают лучший эффект, чем моноферментные препараты. Известно, что бромелаин, папаин и амилаза, которые являются типичными протеазами, стимулируют выделение цитокинов *in vitro* мононуклеарными клетками периферической крови, а также индуцируют респираторный взрыв в гранулоцитах, сопровож-

дающийся продукцией реактивных кислородных радикалов. Кроме этого, бромелаин расщепляет CD44 и усиливает ответную реакцию на трипсин. Как следствие этих процессов активируются Т-лимфоциты и макрофаги, которые снижают воспалительную реакцию [14].

Таким образом, проведенное клинико-экспериментальное исследование показало, что образование спаек в брюшной полости связано с процессом формирования внеклеточного матрикса (Ламинин) и факторов ангиогенеза (васкулоэндотелиального фактора и фактора роста фибробластов). Одновременное повышение концентрации данных факторов в раннем послеоперационном периоде предотвращает развитие спаечного процесса в брюшной полости. Поздняя активация развития внеклеточного матрикса на фоне высоких значений факторов ангиогенеза приводит к развитию осложнений (спаек) после интраабдоминального вмешательства. Благодаря полученным данным появляется возможность целенаправленного проведения лечебных и профилактических мероприятий.

Выводы. 1. Иммуногистохимическое исследование экспрессии факторов ангиогенеза (VEGF и bFGF) с формированием базальной мембраны (Ламинин) позволяет не только диагностировать, но и прогнозировать развитие спаечного процесса в брюшной полости после оперативного вмешательства.

2. Гидролитические ферменты обеспечивают синхронизацию процесса формирования базальной мембраны и экспрессии факторов ангиогенеза (VEGF и bFGF), благодаря этому обеспечивается снижение спаечного процесса в брюшной полости после оперативного вмешательства.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гордеев В.И., Александрович Ю.С. Методы исследования развития ребенка: качество жизни (QOL) — новый инструмент развития детей. — СПб.: Речь, 2001. — 200 с.
2. Куеон Я.О., Гудмэн З.Д., Диемстаг Ж.Л. и др. Снижение фиброгенеза: иммуногистохимическое исследование парной биопсии клеток печени после проведения терапии ламивудином у пациентов с хроническим гепатитом В // *Journal of Hepatology*. — 2001. — № 9. — С. 749–755.
3. Минаев С.В., Немилова Т.К., Кнорринг Г.Ю. Полиферментные препараты в профилактике спаечного процесса в брюшной полости у детей // *Вестн. хир.* — 2006. — № 1. — С. 49–54.
4. Харин Г.М., Челышев Ю.А., Джорджикия Т.Р. и др. Иммуногистохимический анализ динамики заживления кожных ран // *Росс. биомед. журн.* — 2003. — № 1. — С. 93–94.
5. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease // *Nature Medicine*. — 2003. — Vol. 9, № 8. — P. 653–660.
6. Diegelmann R.F., Evans M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing // *Front. Biosci.* — 2004. — Vol. 9, № 1. — P. 283–289.

7. Haas T.L., Milkiewicz M., Davis S.J. et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*—2000.—Vol. 279.—P. H1540–H1547.
8. Kohyama T., Liu X., Wen F.Q. et al. IL-4 and IL-13 induce chemotaxis of human foreskin fibroblasts, but not human fetal lung fibroblasts // *Inflammation.*—2004.—Vol. 28, № 1.—P. 33–37.
9. Manhart N., Akomeah R., Bergmeister H. et al. Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4+ cells and the interferon- γ response in Peyer's patches and spleen in endotoxemic balb/c mice // *Cell. Immunology.*—2002.—Vol. 215, № 2.—P. 113–119.
10. Oettgen P. Transcriptional regulation of vascular development // *Circ. Res.*—2001.—Vol. 89, № 4.—P. 380–388.
11. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system // *Nat. Med.*—2003.—Vol. 9, № 10.—P. 677–684.
12. Schuster T.G., Montie J.E. Postoperative ileus after abdominal surgery // *Urology.*—2002.—Vol. 59, № 4.—P. 465–471.
13. Wagoner L.E., Merrill W., Jacobs J. et al. Angiogenesis protein therapy with human fibroblast growth factor (FGF-1): Results of a phase I open label // *Circulation.*—2007.—Vol. 116, № 6.—P. 443–446.
14. Wald M. Wound healing under pathological conditions // *Int. medicina pro praxi.*—2002.—№ 10.—P. 6–10.
15. Xu W., Niu A., Li Zh. et al. Effect of pingyangmycin emulsion on the microenvironment of infantile proliferating capillary hemangioma // *World J. Pediatr.*—2006.—Vol. 3, № 3.—P. 217–222.

Поступила в редакцию 16.10.2008 г.

S.V.Minaev, V.S.Obozin, L.T.Pustoshkina, G.M.Barnash, I.N.Tulubaev

NEW ASPECTS OF PATHOGENESIS OF ADHESIVE PROCESS IN THE ABDOMINAL CAVITY

Adhesive process in the abdominal cavity is the leading cause of morbidity and mortality in abdominal surgery. The clinical investigation included 126 children with acute adhesive intestinal obstruction. All patients were divided into two groups: polyenzyme and monoenzyme groups. In the polyenzyme group there was one case of intestinal obstruction. In the monoenzyme group there were 4 children with intestinal obstruction. The experiment included 70 adult rats divided in two equal groups: the main and control groups. The main group animals were given a polyenzyme preparation. The control group had a high incidence of cecal adhesions, which was significantly higher than the number of adhesions in the main group (Chi-square test=23.1, df=2, p=0.001). Proteolytic enzymes induce cells to express, de novo, the vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor and Laminin. As a consequence of these effects, activation of T-lymphocytes and macrophages mediating the inflammatory response will be down-regulated. It was found that the levels of VEGF, FGF and Laminin in the abdominal cavity, detected by immunohistochemistry, were different in the rats having high level and having no postoperative abdominal adhesion. The level of angiogenesis factors was also rapidly normalized by means of polyenzyme therapy.

СИСТЕМНАЯ ЭНЗИМОТЕРАПИЯ — эффективный метод современной медицины

Системная энзимотерапия — метод лечения с помощью целенаправленно составленной смеси гидролитических энзимов животного и растительного происхождения, оказывающих кооперативное воздействие на ключевые физиологические и патофизиологические процессы в организме.

Вобэнзим

Флогэнзим

Фармакологические свойства

- | | |
|---|----------------------------|
| • Противовоспалительное | • Вторично анальгезирующее |
| • Противоотечное | • Иммуномодулирующее |
| • Тромболитическое | • Фибринолитическое |
| • Потенцирование действия антибиотиков, уменьшение их побочных эффектов | |

Применение препаратов системной энзимотерапии показано и доказано эффективно при различных воспалительных заболеваниях в гинекологии и урологии, в хирургии и ангиологии, в терапевтической практике, в том числе при аутоиммунных и иммунодефицитных состояниях.

Системная энзимотерапия оказывает положительное воздействие на ход воспалительного процесса, ограничивает патологические проявления аутоиммунных и иммунопатологических процессов, положительно влияет на показатели иммунологической реактивности организма, улучшает состояние сосудистой стенки, реологические свойства крови и функцию клеток крови. Осуществляет стимуляцию и регуляцию уровня функциональной активности моноцитов-макрофагов, естественных киллерных клеток, стимулирует противоопухолевый иммунитет, цитотоксические Т-лимфоциты, фагоцитарную активность клеток. Регулирует течение репаративных процессов, контролируя продукцию и транспорт цитокинов и ростовых факторов, оптимизируя тем самым формирование рубцовой ткани.

Применение системных энзимов в послеоперационном периоде позволяет:

- уменьшить выраженность отека, болевого синдрома;
- ускорить рассасывание гематом;
- оптимизировать течение репаративных процессов;
- предупредить развитие осложнений (инфекционных, сосудистых, фиброзных);
- увеличить эффективность действия антибиотиков.

Справки по тел. (812) 315 9295; (495) 231 2731.

www.mucos.ru

e-mail: mucos@mucos.ru