

И.В. Писарева<sup>1</sup>, О.В. Карасева<sup>2</sup>, Л.М. Рошаль<sup>2</sup>, С.В. Петричук<sup>1</sup>, В.М. Шищенко<sup>1</sup>, В.Ф. Письменский<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научный центр здоровья детей РАМН, Москва

<sup>2</sup> НИИ Неотложной детской хирургии и травматологии, Москва

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

## Цитохимическая оценка течения раннего послеоперационного периода при аппендикулярном перитоните у детей

В СТАТЬЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ АППЕНДИКУЛЯРНОГО ПЕРИТОНИТА. ЦЕЛЬЮ РАБОТЫ ЯВИЛСЯ ПОИСК ИНФОРМАТИВНЫХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ ТЕЧЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА АППЕНДИКУЛЯРНОГО ПЕРИТОНИТА У ДЕТЕЙ. УСТАНОВЛЕНО, ЧТО ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ЭНЕРГООБМЕНА ЛИМФОЦИТОВ ОПРЕДЕЛЯЮТСЯ ТЯЖЕстью ЗАБОЛЕВАНИЯ. ВЫЯВЛЕНЫ РАЗЛИЧИЯ В АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ДЕТЕЙ С НЕОСЛОЖНЕННЫМ И ОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ РАННЕГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА. ПРИ ОСЛОЖНЕННОМ ТЕЧЕНИИ НА 1-Е, 3-И, 7-Е СУТ НАБЛЮДАЕТСЯ УГНЕТЕНИЕ ЭНЕРГООБМЕНА В ЛИМФОЦИТАХ, ПРИЧЕМ ВЫРАЖЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ОТМЕЧАЮТСЯ УЖЕ В ТЕЧЕНИЕ 1-Х СУТ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ. ТАКИМ ОБРАЗОМ, ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ МОГУТ ИСПОЛЬЗОВАТЬСЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТЕЧЕНИЯ РАННЕГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ АППЕНДИКУЛЯРНОГО ПЕРИТОНИТА.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДЕТИ, ФЕРМЕНТЫ, ЛИМФОЦИТЫ, АППЕНДИЦИТ, АППЕНДИКУЛЯРНЫЙ ПЕРИТОНИТ, ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ.

### Контактная информация:

Писарева Ирина Валериевна,  
младший научный сотрудник  
лаборатории цитохимии Научного  
центра здоровья детей РАМН  
Адрес: 119991, Москва,  
Ломоносовский проспект, д. 2/62,  
тел. (495) 134-13-98  
Статья поступила 12.01.2007 г.,  
принята к печати 08.06.2007 г.

Несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения острого аппендицита у детей, доля послеоперационных осложнений при наиболее тяжелых формах заболевания сохраняется на высоком уровне и составляет 5–30% [1–3]. Причем развитие осложнений при аппендикулярном перитоните остается мало прогнозируемым, а значит, и недостаточно управляемым процессом. Существующие на современном этапе различия в хирургической тактике в отношении методов санации и дренирования брюшной полости, самой методики операции (открытая или лапароскопическая) не оказывают значительного влияния на число послеоперационных внутрибрюшных осложнений [1–5]. В сложившейся ситуации дальнейшее улучшение результатов лечения может быть достигнуто путем эффективного воздействия на патофизиологические механизмы развития перитонита. Доказательные исследования, направленные на обоснование патогенетической терапии на клеточно-молекулярном уровне, весьма ограничены и в основном посвящены изучению систем протеолиза и антиоксидантной защиты.

I.V. Pisareva<sup>1</sup>, O.V. Karasiova<sup>2</sup>, L.M. Roshal<sup>2</sup>,  
S.V. Petrichuk<sup>1</sup>, V.M. Shishchenko<sup>1</sup>, V.F. Pis'mensky<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Scientific Center of Children Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup> Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology, Moscow

<sup>3</sup> V.A. Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

**Cytochemical evaluation of the run of the early postoperative period among children, suffering from appendicular peritonitis**

THE ARTICLE DEMONSTRATES THE FINDINGS OF THE RESEARCH, DEALING WITH THE ENERGETIC METABOLISM IN LYMPHOCYTES OF THE PERIPHERAL BLOOD AMONG CHILDREN WITH DIFFERENT FORMS OF APPENDICULAR PERITONITIS. THE OBJECTIVE OF THIS WORKS WAS TO LOOK FOR THE INFORMATIVE CRITERIA FOR THE EVALUATION OF THE RUN OF THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD OF APPENDICULAR PERITONITIS AMONG CHILDREN. IT WAS UNCOVERED THAT CHANGES IN THE CELLULAR POWER EXCHANGE OF LYMPHOCYTES WERE DEFINED BY THE SEVERITY OF A DISEASE. THE RESEARCHERS DISCOVERED DIFFERENCES IN THE ENDOENZYME ACTIVITY AMONG CHILDREN WITH THE UNCOMPLICATED AND AGGRAVATED RUN OF THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD. IN THE COURSE OF THE AGGRAVATED RUN, ON THE 1<sup>ST</sup>, 3<sup>RD</sup> AND 7<sup>TH</sup> DAY, THEY OBSERVED THE INHIBITION OF THE POWER EXCHANGE IN LYMPHOCYTES, WHEREAS THE MARKED METABOLIC IMBALANCES WERE ALREADY NOTED ON THE 1<sup>ST</sup> DAY AFTER THE SURGERY. THUS, THE INDICES OF THE ENERGETIC METABOLISM IN LYMPHOCYTES MAY BE USED TO EVALUATE THE RUN OF THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD AMONG CHILDREN WITH DIFFERENT FORMS OF APPENDICULAR PERITONITIS.

**KEY WORDS:** CHILDREN, ENZYMES, LYMPHOCYTES, APPENDICITIS, APPENDICULAR PERITONITIS, POSTOPERATIVE COMPLICATIONS.

Активность ферментов лимфоцитов периферической крови адекватно отражает состояние энергетического обмена других клеток и тканей организма [6]. Известно, что митохондриальная недостаточность лежит в основе развития тканевой гипоксии, являющейся одним из ведущих факторов патогенеза перитонита [7, 8]. Таким образом, цитохимическая активность лимфоцитов может рассматриваться как критерий тяжести гнойно-воспалительного процесса, что определяет интерес к исследованию функционального состояния митохондрий в оценке течения послеоперационного периода при аппендикулярном перитоните у детей.

**Целью** настоящего исследования явилась разработка информативных критериев прогноза течения послеоперационного периода при аппендикулярном перитоните у детей на основании ферментного статуса лимфоцитов периферической крови.

### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В работе проанализировано течение раннего послеоперационного периода у 90 детей (мальчики — 51, девочки — 39) в возрасте от 3-х до 17 лет, оперированных по поводу различных форм аппендикулярного перитонита в период с 2004 по 2006 гг. Свободные формы перитонита были диагностированы у 52 (58%) детей (ограниченный перитонит — у 34, разлитой — у 18), абсцедирующие — у 38 (42%) больных (периаппендикулярный абсцесс — у 14 детей, сочетанный перитонит — у 24). Всем детям выполнена лапароскопическая аппендэктомия, санация и дренирование брюшной полости по А.И. Генералову. В послеоперационном периоде проводилось клинико-лабораторное обследование и лечение по протоколу, принятому в НИИ неотложной детской хирургии и травматологии. Для более детального анализа все дети были разделены на 2 группы по тяжести форм аппендикулярного перитонита: первую группу составили пациенты со среднетяжелыми формами — периаппендикулярный абсцесс, ограниченный перитонит; вторую — с тяжелыми формами — разлитой перитонит, сочетанный перитонит (табл.). В качестве группы сравнения обследовано 18 детей с неосложненным деструктивным аппендицитом. Контрольную группу составили 48 условно-здоровых детей, проходящих обследование в Детской городской поликлинике № 76 Северного административного округа Москвы. На момент обследования этих детей выявлено отсутствие клинических симптомов заболевания, лабораторные показатели гемо-

граммы, иммунограммы и ферментного статуса лимфоцитов соответствовали норме.

Оценку активности митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови — сукцинатдегидрогеназы (СДГ [КФ, 1.3.5.1]),  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа ( $\alpha$ -ГФДГ) [КФ, 1.1.1.8], НАДН-дегидрогеназы — (НАДН-Д [КФ, 1.6.5.3]) — проводили на 1-е, 3-и и 7-е сут послеоперационного периода. Интенсивность ферментных реакций определяли количественным цитохимическим и цитоморфоденситометрическим методами [9]. Количественный цитохимический анализ по методу Р.П. Нарциссова основан на способности п-нитротетразолия фиолетового в процессе ферментных реакций образовывать нерастворимые в воде гранулы формаза, число которых можно определить в каждой клетке методом световой микроскопии. Определяли не только среднюю активность фермента, но и параметры распределения по активности — коэффициенты вариации, асимметрии, эксцесса, а также относительную энтропию информации. Цитоморфоденситометрический анализ проводили с использованием анализатора изображения клетки «Диаморф». Метод позволяет определить функциональную активность отдельно лежащих митохондрий и митохондрий, объединенных в кластеры, с учетом их геометрических (площадь) и оптических (интенсивность ферментной реакции) параметров. Дополнительно рассчитывали цитохимический индекс — соотношение активности СДГ/НАДН-Д.

Для объективизации течения послеоперационного периода оценивали сроки регресса синдрома системной воспалительной реакции, тяжесть и длительность послеоперационного синдрома кишечной недостаточности, наличие послеоперационных осложнений.

Результаты исследований обработаны с использованием статистических программ Microsoft Excel, Statistica 6.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных данных установлено, что уже на 1-е сут послеоперационного периода при аппендикулярном перитоните у детей показатели ферментного статуса лимфоцитов крови существенно отличались от таковых у здоровых детей. У здоровых детей основную метаболическую активность в митохондриях проявляет СДГ, ее активность примерно на 30% выше активности НАДН-Д. СДГ, как ключевой фермент цикла Кребса, катализирующий превращение янтарной кислоты в фумаровую, является маркером энергетического обмена митохондрий.  $\alpha$ -ГФДГ —

**Таблица.** Клинико-лабораторная характеристика пациентов при поступлении

Аппендикулярный перитонит. Клинические и лабораторные параметры	Среднетяжелые формы, n = 48	Тяжелые формы, n = 42
<b>Длительность заболевания (сут), M <math>\pm</math> m</b>	41,6 $\pm$ 4,5	48,4 $\pm$ 6,3
<b>Изменения в гемограмме, M <math>\pm</math> m:</b> лейкоциты ( $\times 10^9$ /л) лейкоцитарный индекс интоксикации (усл. ед.) С-реактивный белок (мг/л) молекулы средней массы (ед. опт. плот.) лактатдегидрогеназа (нмоль/с*л)	18,8 $\pm$ 1,15 6,5 $\pm$ 0,58 44,0 $\pm$ 9,9 0,37 $\pm$ 0,01 237 $\pm$ 35,9	19,5 $\pm$ 1,04 7,0 $\pm$ 0,73 49,8 $\pm$ 6,9 0,36 $\pm$ 0,02 181 $\pm$ 7,3
<b>Степень синдрома системной воспалительной реакции (СВР), n = 57</b> СВР 2 СВР 3–4	<b>28 (58%)</b> 15 (31%) 13 (27%)	<b>29 (70%)</b> 13 (31%) 16 (39%)
<b>Степень синдрома кишечной недостаточности (СКН), n = 36</b> СКН 1 СКН 2–3	<b>13 (27%)</b> 10 (21%) 3 (6%)	<b>23 (54%)</b> 12 (28%) 11 (26%)

митохондриальный фермент, характеризующий сопряженность гликолиза и цикла Кребса. НАДН-Д катализирует перенос водорода с НАДН на флавиномононуклеотид. НАДН-Д — один из начальных компонентов дыхательной цепи, неразрывно связанной с работой цитратного цикла. Отношение СДГ/НАДН-Д определяет течение окислительно-восстановительных процессов в клетке, его снижение менее 1 свидетельствует о наличии внутриклеточной гипоксии.

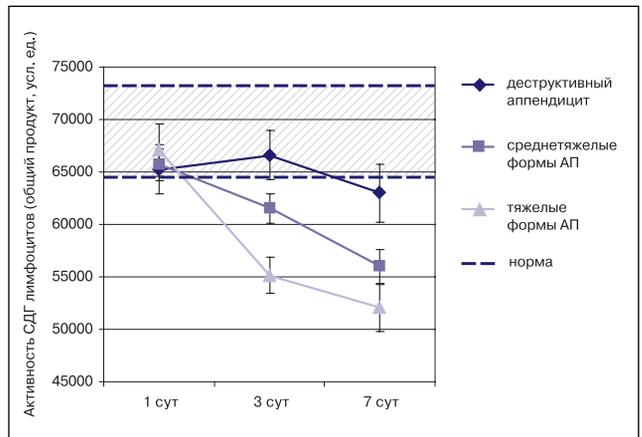
У 62% детей с аппендикулярным перитонитом имело место достоверное снижение активности СДГ ( $47550 \pm 783$ ;  $n = 68100 \pm 1150$  усл. ед.), у 82% — активности  $\alpha$ -ГФДГ ( $4,8 \pm 0,3$ ;  $n = 7,7 \pm 0,3$  гр/лф), и у 61% пациентов наблюдалась выраженная активация НАДН-Д ( $80743 \pm 3903$ ;  $n = 46600 \pm 1400$  усл. ед.). У больных с аппендикулярным перитонитом активность НАДН-Д на 20–30% (в отдельных случаях в 2 раза) была выше нормы и превышала активность СДГ. Индекс СДГ/НАДН-Д у 80% больных был снижен более чем на 30% и составил в среднем  $1,08 \pm 0,08$  (в норме  $1,44 \pm 0,05$ ), причем при тяжелых формах его значение в 2 раза было ниже нормы и составило  $0,74 \pm 0,09$  ( $p < 0,05$ ). Полученные данные подтверждают наличие внутриклеточной гипоксии у обследованных больных при развитии воспалительного процесса в брюшной полости, о чем свидетельствует активация НАД-зависимого пути окисления в ответ на гипоксическое воздействие.

При изучении динамики митохондриальной активности лимфоцитов были выявлены следующие закономерности. Активность СДГ продолжала снижаться, а активность НАДН-Д сохранялась на высоких значениях. Причем при тяжелых формах аппендикулярного перитонита активность СДГ снижалась более чем на 20% уже к 3-м сут послеоперационного периода, а активность НАДН-Д стабильно превышала норму практически в 2 раза ( $p < 0,05$ ). Таким образом, цитохимический индекс сохранял чрезвычайно низкие значения. При среднетяжелых формах отклонения активности ферментов от нормы были менее выраженными и приобретали крайние значения к 7-м сут послеоперационного периода, что также сопровождалось снижением отношения СДГ/НАДН-Д. Следует отметить, что цитохимический индекс при всех формах аппендикулярного перитонита и даже в группе деструктивного аппендицита на протяжении раннего послеоперационного периода имел значения ниже нормы (рис. 1–3).

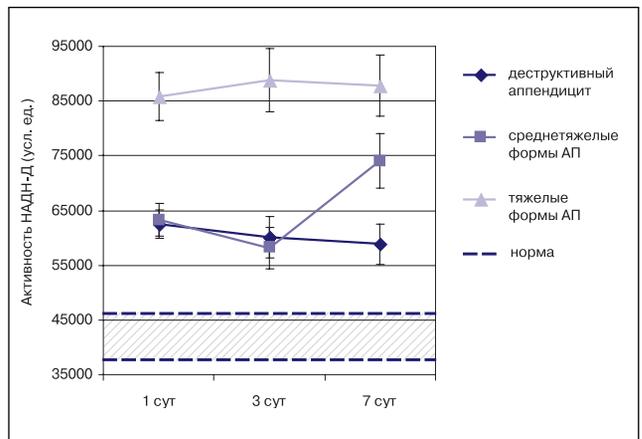
Таким образом, проведенный анализ позволяет говорить о выраженных нарушениях митохондриального энергообмена в послеоперационном периоде при всех формах аппендикулярного перитонита у детей. Наиболее выраженное угнетение аэробного дыхания с компенсаторной активацией НАД-зависимого пути окисления происходило при тяжелых формах заболевания (1-е, 3-и, 7-е сут). При среднетяжелых формах описанные нарушения максимально нарастают к 7-м сут послеоперационного периода. Это нередко совпадает с клиническими проявлениями вялотекущего воспалительного процесса (инфильтративно-спаечный процесс по данным УЗИ, субфебрилитет, повышение СОЭ) без развития типичных гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений, таких как абсцессы и инфильтраты брюшной полости. Отсутствие метаболической коррекции в данной ситуации зачастую приводит к развитию вышеупомянутых осложнений, возникновение которых трудно прогнозировать на основании традиционного клиничко-лабораторного мониторинга.

Особый интерес представляет изучение динамики митохондриальной активности лимфоцитов при осложненном течении послеоперационного периода. В нашем исследо-

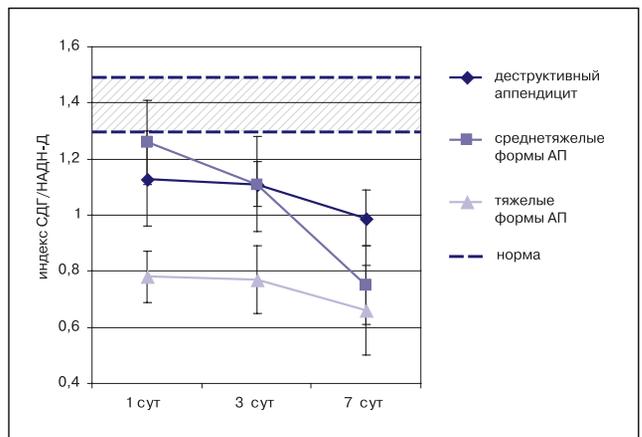
**Рис. 1.** Динамика активности СДГ лимфоцитов при аппендикулярном перитоните у детей



**Рис. 2.** Динамика активности НАДН-дегидрогеназы лимфоцитов при аппендикулярном перитоните



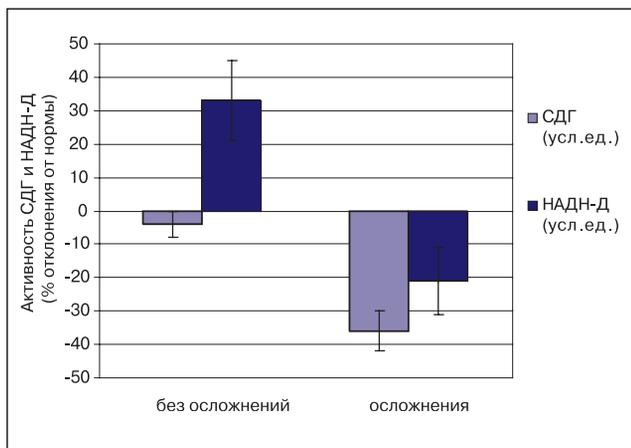
**Рис. 3.** Динамика цитохимического индекса лимфоцитов при аппендикулярном перитоните у детей



вании у 3-х (3,3%) детей было отмечено формирование послеоперационных абсцессов брюшной полости (1 — вскрылся через дренажную апертуру; 2 — пунктированы под контролем УЗИ), других осложнений не было. Следует отметить, что в 1-е сут после операции у этих больных выявлены глубокие нарушения митохондриальной активности в виде выраженной депрессии активности обоих ферментов энергообмена, что свидетельствует о значительном энергодефиците уже на момент поступления (рис. 4).

Для более детальной оценки течения послеоперационного периода мы попытались проанализировать соотноше-

**Рис. 4.** Активность ферментов лимфоцитов у детей с аппендикулярным перитонитом в 1-е сут после операции в зависимости от наличия послеоперационных осложнений (% отклонений от нормы)



ние цитохимических показателей с длительностью температурной реакции, являющейся основным наиболее характерным критерием длительного воспалительного процесса, а также с наличием и длительностью синдрома кишечной недостаточности. У детей с затяжным субфебрилитетом (> 8 сут) в 1-е сут после операции выявлено достоверное снижение активности СДГ на 17% ниже нормы, сопровождаемое значительным увеличением числа низкоактивных клеток, при этом активность НАДН-Д возросла на 28%, в результате чего цитохимический индекс имел значение меньше 1. У детей с быстрым регрессом температурной реакции (< 4 сут) происходила активация

как СДГ, так и НАДН-Д за счет компенсаторного увеличения числа лимфоцитов с высокой активностью фермента, при этом значение цитохимического индекса было больше 1. При анализе функциональной активности лимфоцитов у детей с развитием синдрома кишечной недостаточности в раннем послеоперационном периоде сохранялась аналогичная закономерность.

Следовательно, для гладкого течения послеоперационного периода в 1-е сут после операции характерен умеренный рост активности СДГ и НАДН-Д с сохранением их соотношения на уровне > 1, что говорит об эффективной компенсаторной активации процессов энергообразования в клетке при росте энергозатрат в условиях воспаления. При осложненном течении послеоперационного периода наблюдалось угнетение энергетического обмена клеток на фоне истощения компенсаторных механизмов клеточного окисления. Наиболее выраженные нарушения метаболизма были выявлены у детей с формированием в последующем послеоперационных абсцессов брюшной полости.

Таким образом, наши наблюдения показывают, что нарушение клеточного энергообмена при аппендикулярном перитоните у детей существенно влияет на течение послеоперационного процесса. Активность ферментов лимфоцитов отражает течение послеоперационного периода и коррелирует с тяжестью формы аппендикулярного перитонита у детей. Показатели активности митохондриальных ферментов в 1-е сут после операции позволяют прогнозировать развитие осложнений в раннем послеоперационном периоде. Наиболее информативными прогностическими критериями являются функциональная активность СДГ и НАДН-Д и соотношение активности СДГ и НАДН-Д.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карасева О.В. Абсцедирующие формы аппендикулярного перитонита у детей: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 2006. — 46 с.
2. Читинин В.Е., Коровин С.А., Дворовенко Е.В. Хирургическая тактика при аппендикулярном перитоните у детей // *Детская хирургия*. — 2000. — № 4. — С. 13–15.
3. Брожик В.Л. Оптимизация комплексного лечения местного перитонита у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Донецк, 2001. — 35 с.
4. Newman K., Ponsky T., Kittle K., Dyk L., Throop C., Giesecker K., Sills M., Gilbert J. Appendicitis 2000: variability in practice, outcomes, and resource utilization at thirty pediatric hospitals // *J. Pediatr. Surg.* — 2003. — V. 38, № 3. — P. 372–379.
5. Perovic Z. Drainage of the abdominal cavity and complications in perforating appendicitis in children // *Med Pregl.* — 2000. — V. 53, № 3–4. — P. 193–196.
6. Петричук С.В., Шищенко В.М., Духова З.Н. и соавт. Диагностические и прогностические возможности клинической цитохимии. — М.: 2005. — 74 с.
7. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии // *Вестник РАМН*. — 2000. — № 9. — С. 3–11.
8. Гумеров А.А., Миронов П.И., Викторов В.В., Викторова Т.В. Метаболические и иммунологические изменения при аппендикулярном перитоните у детей, осложненном полиорганной недостаточностью // *Вестник хирургии*. — 1997. — № 5. — С. 61–64.
9. Нарциссов Р.П. Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии // *Педиатрия*. — 1998. — № 4. — С. 101–105.

## Знаменательные и юбилейные даты из истории медицины

### 3 мая — 80 лет со дня смерти Эрнста Старлинга (1866–1927)

Старлинг — выдающийся английский физиолог, организовавший и возглавивший Физиологический институт в Лондоне (1895). Он впервые установил значение коллоидно-осмотического давления в водном обмене и таким образом объяснил механизмы всасывания растворов в кишечнике, а также механизм образования

мочи. Совместно с Бейлиссом он исследовал механизм секреции поджелудочной железы, выделил секретин и изучил его физиологическое действие. В 1905 г. он ввел понятие «гормон». Старлингом установлена закономерность, согласно которой механическое раздражение стенок кишечника вызывает их сокращение выше этой точки и расслабление ниже нее: одно из объяснений механизма перистальтики желудка и кишечника (впослед-

ствии это явление было названо «законом кишечника» Бейлисса–Старлинга). Старлинг обнаружил также прямую зависимость силы сокращений сердца от степени растяжения миокардиальных волокон (то есть от степени кровенаполнения сердца в диастолу), названную впоследствии законом Старлинга. Эрнст Старлинг — создатель крупной английской физиологической школы был также президентом Лондонского королевского общества.