

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

**ПРОЦЕССЫ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПЕРФОРАТИВНОЙ ЯЗВЫ ЖЕЛУДКА
ПОСЛЕ УШИВАНИЯ ЕЁ С ТКАНЬЮ АМНИОТИЧЕСКОЙ
МЕМБРАНЫ (ТАМ)
(МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ)**

Ташкент 2009

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

«Согласовано»

Начальник отдела по координации

Научно-исследовательской

Деятельности МЗРУз

_____ **Даминов Б.Т.**

«__» _____ **2009**

«Утверждаю»

Начальник Главного Управления

Науки и учебных заведений МЗРУз

_____ **Атаханов Ш.Э.**

«__» _____ **2009**

**ПРОЦЕССЫ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПЕРФОРАТИВНОЙ ЯЗВЫ ЖЕЛУДКА ПОСЛЕ УШИВАНИЯ
ЕЁ С ТКАНЬЮ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ (ТАМ)**

(МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ)

Ташкент 2009

СОСТАВИТЕЛИ:

Охунов А.А. – д.м.н, профессор кафедры общей и детской хирургии
лечебного и медико-педагогического факультета Т.М.А.

Рахимов Р.И. – м.н.с. ЦНИЛ ТМА.

Сайфуллаева С.А.. –м.н.с. ЦНИЛ ТМА.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

1. Ахмедов М.А. – доктор медицинских наук, профессор кафедры
хирургических болезней ВОП ТМА.

2. Юлдашев Н.М.. – доктор медицинских наук, профессор,
зав.кафедрой биохимии Ташкентского педиатрического института.

Методические рекомендации «Процессы заживления перфоративной язвы желудка после ушивания ее с тканью амниотической мембраны (ТАМ)» предназначены для патофизиологов, биохимиков, хирургов, гастроэнтерологов, клинических ординаторов, интернов, студентов.

Методические рекомендации рассмотрены на заседании проблемной комиссии по хирургии - протокол № от _____ и Ученом Совете ТМА протокол № от _____.

Секретарь Ученого Совета ТМА,
доктор медицинских наук, профессор

Рахимбаева Г.С.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ	-	анилингидроксилаза
Б(а)ПГ	-	бензпирен(а)гидроксилаза
Г-6-Фаза	-	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГЭР	-	гладкий эндоплазматический ретикулум
ЗЭС	-	зернистая эндоплазматическая сеть
Кс	-	константа связывания
КсN	-	константа суммарного сродства зонда связывания
МН	-	моноциты
МОС	-	монооксигеназная система
НАДФН-цит.		
С-ред.	-	НАДФН-цитохром С-редуктаза
НЛ	-	нейтрофильные лейкоциты
СК	-	стволовые клетки
СОЖ	-	слизистая оболочка желудка
ТАМ	-	трансплантат амниотической ткани
Фс	-	фибробласты
Цит. Р-450	-	цитохром Р-450
ЯБ	-	язвенная болезнь
N	-	константа центров связывания
НАП	-	N-деметилаза амидопирина
1,8-АНС	-	1,-анилинонафталин-8-сульфонат

ВВЕДЕНИЕ

Патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития перфоративных гастродуоденальных язв и после их ушивания до сих пор остаются нерешенной проблемой современной абдоминальной хирургии и гастроэнтерологии (Аруин Л.И. и соавт., 2005; Афенкулов С.А., Журавлев Г.Ю., 2008; Михалев А.И. и соавт., 2008). Перфорация остается угрожающим жизни осложнением, развивающимся у 10-15% больных с язвенной болезнью (ЯБ), причем число прободений, большинство из которых приходится на дуоденальную локализацию язвы, за последние года не имеет тенденции к снижению (Сауцкевич В.Н., 2001; Лобанков В.М., 2005, 2007).

Ушивание является наиболее частой операцией при перфоративных язвах (Панцырев Ю.М. и соавт., 2003), после которого у 48-85% больных возникает рецидив язвенной болезни, а у 20-27% - повторная перфорация (Петров в.П., Осипов В.В., 2003). Среди пациентов с перфоративными гастродуоденальными язвами преобладают лица молодого и среднего возраста, что создает не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему. Летальность при прободных язвах составляет 10,2-10,7% без тенденции к снижению (Хаджиев О.Г, Лупальцев В.И., 2001; Синеченко Г.И., 2007). В связи с этим вопросы эффективности хирургического лечения и изучение патогенеза перфоративных гастродуоденальных язв и развитие осложнений после их ушивания остаются открытыми. Все это свидетельствует о необходимости совершенствования диагностической и хирургической тактики лечения больных с перфоративными гастродуоденальными язвами.

В последние годы в реконструктивной хирургии стали широко применять тканевые клеточные системы (Лобзин Ю.В., Александров В.Н., 2005; Каримов Х.Я., 2006). Перспективность внедрения в хирургическое лечение резидентных стволовых клеток (СК) обусловлено позитивным влиянием их на процессы регенерации поврежденных органов и тканей (Попова О.П., 2007; Приходько А.В., 2007; Ярыгин В.Н., 2004, 2008). Важным свойством тканевых клеточных систем (чаще всего используется ткань амниотической мембраны – ТАМ) является способность стволовых клеток дифференцироваться в окружающие ткани, приобретать свойственную структуру и выполнять физиологические функции органа-реципиента (Каспаров А.А., Труфанов С.А., 2001; Лопухин Ю.М., Гусев С.А., 2004; Чертков И.Л., Дризе Н.И., 2004).

Клетки ТАМ экспрессируют неполные HLA-A, B, C и DR антигены, что объясняет факт отсутствия отторжения трансплантата (Егоров В.В. и соавт., 2003; Гольдберг Е.Д. и соавт., 2006). При подсадке ТАМ уменьшается образование рубцовой ткани, ускоряется процесс заживления долго незаживающих трофических язв и их эпителизация, усиливается противовоспалительный эффект лекарственных средств и физиотерапевтических процедур (Селиванов Е.А. и соавт., 2004; Зуева Е.Е. и соавт., 2005).

Влияние ТАМ на морфофункциональные показатели тканей слизистой оболочки желудка (СОЖ) после ушивания перфоративных язв практически не изучено. Нет сведений о влиянии ТАМ

на некоторые молекулярные механизмы, в частности на систему цитохрома P-450 (цит. P-450), участвующего в поддержании физико-химического гомеостаза, адаптации тканей СОЖ к действию агрессивных факторов внешней и внутренней среды (Арчаков А.И. и соавт., 2008; Комарин А.С. и соавт., 2007, 2008). Решение этой проблемы будет способствовать внедрению ТАМ в практику хирургического лечения перфоративных язв, снижение частоты осложнений после их ушивания

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в период 2005-2008 гг. в отделе молекулярно-клеточных технологий, экспериментальной терапии и фармакологии ЦНИЛ Ташкентской медицинской академии (директор ЦНИЛ – д.м.н., проф. Бабаджанов). Исследования проведены на 150 беспородных белых крысах-самцах массой 180-240 г в трех сериях экспериментов. 1-ю серию составляли животные с перфоративной язвой, которую воспроизводили по методу Э.М.Байбековой [4]. 2-ю серию исследований составили животные, которым на 10-е сутки язвенного процесса очищали дно, восполненное сальником, очищали от некротических тканей края язвенного дефекта до пределов нормальной ткани СОЖ, а затем непрерывным узловатым швом ушивали. 3-ю серию исследований воспроизводили путем одновременного ушивания язвенного дефекта с ТАМ. Для этого ТАМ заполняли в язвенный дефект, который как и во 2-й серии опытов предварительно очищали от некротических масс, а затем ушивали. Активность монооксигеназных ферментов, а также морфологические исследования проводили на 10, 20 и 30 сутки после ушивания перфоративной язвы.

Содержание цитохрома P-450 (расчет вели по разнице величин поглощения при λ 450-490 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции 91×10^3 $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$) и b_5 (по разнице величин поглощения при λ 490-424 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $163 \cdot 10^3$ $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$) в полученных микросомах определяли с использованием двулучевого спектрофотометра “Specord UV-Vis M40” (Германия) (Omura T., Sato R., 1964). Определение НАДФН-цитохром с-редуктазы (НАДФН-цит. с-ред.) проводилось по методу (Williams C.H., Kamin H. 1961) с использованием коэффициента молярной экстинкции $22 \cdot 10^3$ $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$. Аминопириндеметилазную (НА) активность определяли спектрофотометрически на СФ-46 (Россия) по (Bast A., Nordhook J. 1981) с использованием коэффициента молярной экстинкции $7,6 \cdot 10^6$ $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$. Анилингидроксилазную (АГ) активность (НАДФН-зависимую) определяли по (Арчаков А.И и соавт., 1975) с использованием коэффициента молярной экстинкции $9,46 \cdot 10^6$ $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$. Активность фермента бенз(а)пиренгидроксилазы (Б(а)ПГ) определяли по методу (С.Н. Yang, L.P. Kicha, 1978) на спектрофлюориметре Hitachi MPF-4 (Япония) при длине волны поглощения 350 и эмиссии 286 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $15 \cdot 10^5$ $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$. Определение глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фаза) по методу (N.C.Gnoch, N.C.Kar, 1983) на спектрофотометре СФ-46 с использованием коэффициента молярной экстинкции $32,3 \cdot 10^6$ $\text{мМ} \cdot \text{см}^{-1}$.

Структурные изменения фосфолипидного матрикса микросомальных мембран оценивали с использованием флуоресцентных зондов. Параметры связывания флуоресцентного зонда 1,8-АНС⁻ определяли по методу (Владимирова Ю.А, Добрецова Г.Е., 1980). Рассчитывали константу связывания (K_c), концентрацию центров связывания (N) и суммарное сродство зонда (K_cN) методом двойных обратных величин. Зонд готовили на 40 мМ трис-НСl буфере рН 7,4. Мембраны (концентрации 0,5 мг/мл) титровали зондом в диапазоне концентраций от 5 до 40 мкМ. Титрование 1,8 АНС⁻ (40 мкМ) мембранами микросом проводили в интервале конечных концентраций 0,1-0,6 мг/мл. Флуоресценцию 1,8 АНС⁻ регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi MPF (Japan) при длине волны возбуждения 365 нм и флуоресценции 490 нм.

Результаты пересчитывали на содержание (мг) микросомального белка, который определяли по методу (Lowry и соавт., 1951), используя в качестве стандарта раствор бычьего сывороточного альбумина.

Контролем для всех групп исследований служили интактные животные.

В отдельной серии исследований проведены опыты *in vitro* по изучению диагностической ценности N-АП в желудочном соке после ушивания перфоративных язв у 48 больных в возрасте 18-56 лет. Ушивание перфоративных язв проводили по Островскому и Опелю-Поликарпову. В 1-ю группу включены 23 пациента, получавших ингибиторы протонной помпы и блокаторы H₂-гистаминовых рецепторов, антихеликобактериальные препараты, средства, ускоряющие репаративные процессы и дающие цитопротекторный эффект, во 2-ю – 25 больных, не принимавших такого лечения. Регулярно каждые 6 месяцев в амбулаторных условиях, наряду с другими биохимическими исследованиями определяли рН желудочного сока (при рН 0,9-1,1 состояние кислотопродукции оценивали как гиперацидное, 3,0-4,5 – гипоацидное, 5,5-6,5 – нормацидное), обсемененность СО антрального отдела желудка и двенадцатиперстной кишки *Helicobacter pylori* оценивали по методу (Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. Метод. рекомендации 11с, 1998), а активность N-АП желудочного сока по (А.С.Комарину, 1994). В качестве контроля служили данные, полученные до ушивания перфоративной язвы, а также 20 условно здоровых добровольцев без признаков поражения СОЖ по данным эзофагогастродуоденоскопии и рН желудочного сока в пределах нормы (5,8-6,5).

Морфологические исследования проведены под руководством зав. гистологическим отделом ЦНИЛ ТМА д.м.н., проф. Э.М.Байбековой.

Стенка желудка в области раневого дефекта разрезалась острой бритвой на кусочки общей площадью 5x5 мм, после чего ткань фиксировалась в растворе формалина (Карнуа). Готовили серийные срезы толщиной 5-6 мк, из которых отбирали 5-6 срезов, прошедших по центру раневого дефекта, с обязательным наличием обоих краев раны. Срезы обрабатывали общеморфологическими (гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону) и электронно-микроскопическими методами исследования.

Для трансмиссионной микроскопии (ТЭС) кусочки слизистой фиксировали в 8,6% растворе на глутаровом альдегиде, заливали в смесь эпон-аралдита. Срезы изготавливались на ультратоме LKB, контрастировались уранил-ацетатом и просматривались в электронном микроскопе Хитачи-600.

Для сканирующей микроскопии образцы после общепринятой фиксации денатурировали и высушивали методом перехода через критическую точку закиси азота в аппарате НСР-2 Хитачи, монтировали на алюминиевые подложки. После напыления золотом образцы просматривали и фотографировали в сканирующем электронном микроскопе Хитачи 405 А.

Электронно-микроскопические исследования проведены в лаборатории патоморфологии НХЦ МЗ РУз (зав. лабораторией – д.м.н., проф. И.М.Байбеков).

Полученные данные обрабатывали статистическим методом с использованием пакета программ Microsoft Excel-2003 и Statistica version 6.0, 2003. Достоверность различий считали при $p < 0,05$.

ВЛИЯНИЕ ТАМ НА АКТИВНОСТЬ МОНООКСИГЕНАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ ЖИВОТНЫХ.

Проведенные исследования показали, что на 10-е сутки после воспроизведения перфоративной язвы в тканях СОЖ имело место отчетливое снижение всех изучаемых показателей МОС. Так, содержание основного звена НАДФН-зависимой электронтранспортной системы микросом в СОЖ – цитохром р-450 был снижен по сравнению с контролем на 48,3% ($P < 0,001$), среднее звено этой системы- цитохром v_5 – на 42,1% ($P < 0,001$), начальное звено – НАДФН-цитохром с-редуктаза – на 42,2% ($P < 0,001$). Одновременно были снижены ферменты, катализируемые системой цитохрома Р-450 - N-АП (субстрат I типа окисления ксенобиотиков) – на 46,6% ($P < 0,001$), а также Б(а)ПГ (субстрат окисления ксенобиотиков, катализируемых цитохромом Р-448) – на 42,9% ($P < 0,001$). Уровень Г-6-Фазы, которая была ниже контрольного уровня на 44,5% ($P < 0,001$).

После 20 суток исследования содержание цитохромов Р-450 и v_5 было еще ниже данных в контроле на 38,3 и 36,8% ($P < 0,001$), активность НАДФН-цито.с-ред. – на 35,3% ($P < 0,001$), N-АП – на 40,2% ($P < 0,001$), АГ – на 41,7% ($P < 0,001$), Б(а)ПГ – на 34,8% ($P < 0,001$), а Г-6-Фазы – на 43,9% ($P < 0,001$). К 30-м суткам опыта после воспроизведения перфоративной язвы содержание микросомальных гемопротеидов цитохромов Р-450 и v_5 были ниже контрольных данных на 25,0 и 26,3% ($P < 0,01$), активность НАДФН-цито.с-ред. – на 22,9% ($P < 0,01$), N-АП – на 27,1% ($P < 0,002$), АГ – на 33,3% ($P < 0,001$), Б(а)ПГ – на 28,6% ($P < 0,002$), а Г-6-Фазы – на 31,6% ($P < 0,001$)(табл 1).

Следовательно, проведенные исследования показали, что перфоративная гастродуоденальная язва характеризуется значительным угнетением активности ферментов МОС в СОЖ, что может быть одной из важных причин снижения ее резистентности к действию агрессивных факторов среды, поддержанию патологического процесса в этом органе и указывает на необходимость восстановления целостности желудка.

Таблица 1

Показатели активности системы монооксигеназ в СОЖ, после воспроизведения ПЯ(А), после ушивания ПЯ(Б) и ушивания ПЯ с ТАМ (В),
M±m.

Группа А							
Показатели	Р-450, нмоль/ мг	В5, нмоль/ мг	НАДФН-цит. с- ред, нмоль/мин/ мг	Б(а)ПГ, нмоль/мин/ мг	АГ, нмоль/мин/ мг	Н-АП, нмоль/мин/ мг	Г-6-Фазы, нмоль/мин/ мг
Контрольная	0,060±0,003	0,019±0,001	8,791±0,383	0,063±0,002	0,024±0,001	1,975±0,092	12,946±0,947
10-е сут.	0,031±0,002*	0,011±0,001*	5,060±0,291*	0,036±0,001*	0,012±0,001*	1,054±0,065*	7,184±0,361*
20-е сут.	0,057±0,002* ^Δ	0,012±0,001*	5,684±0,380*	0,041±0,002*	0,014±0,001*	1,181±0,073*	7,258±0,439*
30-е сут.	0,045±0,002* ^Δ	0,014±0,001* ^Δ	6,779±0,349* ^Δ	0,045±0,004* ^Δ	0,016±0,001* ^Δ	1,440±0,087* ^Δ	8,851±0,586* ^Δ
Группа Б							
Контроль	0,060±0,003	0,019±0,001	8,791±0,383	0,063±0,002	0,024±0,001	1,975±0,092	12,946±0,947
10 сут.	0,031±0,002*	0,012±0,001*	5,620±0,023*	0,039±0,002*	0,013±0,001*	1,126±0,053*	7,759±0,337*
20 сут.	0,042±0,002*	0,014±0,001*	6,457±0,310*	0,047±0,002*	0,016±0,065* ^Δ	1,340±0,065*	8,390±0,051*
30 сут.	0,052±0,003* ^Δ	0,016±0,001* ^Δ	7,792±0,299* ^Δ	0,052±0,002* ^Δ	0,019±0,001* ^Δ	1,607±0,028* ^Δ	10,560±0,473* ^Δ
Группа В							
Контроль	0,060±0,003	0,019±0,001	8,791±0,383	0,063±0,002	0,024±0,001	1,975±0,092	12,946±0,947
10 сут.	0,046±0,002*	0,015±0,001*	7,914±0,033*	0,053±0,002*	0,018±0,001*	1,423±0,081*	9,312±0,538*
20 сут.	0,055±0,003 ^Δ	0,018±0,001 ^Δ	8,711±0,420 ^Δ	0,061±0,002 ^Δ	0,021±0,065 ^Δ	1,748±0,079 ^Δ	11,822±0,796 ^Δ
30 сут.	0,059±0,003 ^Δ	0,019±0,001 ^Δ	8,832±0,299 ^Δ	0,065±0,003 ^Δ	0,025±0,001 ^Δ	1,992±0,086 ^Δ	12,684±0,870 ^Δ

Примечание: * - P<0,05 по сравнению с контролем; Δ - P<0,05 по сравнению с 10 сут. Экспериментальной группой

После 10 суток после ушивания перфоративной язвы содержания в микросомальной фракции СОЖ цитохрома P-540 после 10, 20 и 30 суток уровень был выше, чем у животных с аналогичным сроком опыта после перфоративной язвой без ушивания на 6,4 ($P<0,05$), 13,5 ($P<0,05$) и 15,5% ($P<0,05$). Сходные результаты получены при изучении содержания в микросомальной фракции цитохрома v_5 в СОЖ. Так, в группе животных с ушитой перфоративной язвой после 10 суток исследований содержание его было на 9,1% ($P<0,05$) выше, чем в аналогичной группе, на 20 и 30 сутки продолжало повышаться на 16,7 и 14,3% ($P<0,05$), по сравнению с аналогичной группой животных с перфоративной гастродуоденальной язвой без ушивания. Активность НАДФН-цит. с-ред. в микросомах СОЖ у животных после 10, 20 и суток ушивания перфоративной гастродуоденальной язвы ее уровень был выше такового значения чем у животных без ушивания в те же сроки исследования на 11,1 ($P<0,05$), 13,6 и 14,9% ($P<0,05$). Анализ динамики активности фермента N-АП в микросомальных фракциях, выделенных из СОЖ у животных после ушивания перфоративных гастродуоденальных язв, показал, что она превышает таковые данные после 10, 20 и 30 суток опыта, выявленные у животных без ушивания на 6,8 ($P<0,05$), 13,5 и 16,0 ($P<0,05$)%.

При оценке активности фермента АГ в микросомах СОЖ у животных с ушиванием перфоративной гастродуоденальной язвы установлено, что она была выше на 10, 20 и 30 сутки, чем у животных без ушивания перфоративной язвы с аналогичными сроками наблюдения на 8,3 ($P<0,05$), 14,3 и 18,7% ($P<0,05$).

Аналогичная тенденция сохраняется при изучении активности Б(а)ПГ в микросомах СОЖ в группах животных после 10, 20 и 30 суток ушивания перфоративной язвы по сравнению с группами животных без ушивания. Так, по сравнению с группой животных без ушивания перфоративной гастродуоденальной язвы в микросомах СОЖ активность Б(а)ПГ была выше у животных после ушивания перфоративной язвы на 10-е сутки на 8,3% ($P<0,05$), на 20- и 30-е сутки соответственно на 14,6 и 15,5% ($P<0,05$).

Повышение изучаемых микросомальных ферментов в СОЖ у животных с ушиванием перфоративной гастродуоденальной язвы одновременно характеризуется повышением в ней активности фермента Г-6-Фазы. Так, по сравнению с данными у животных без ушивания перфоративной язвы в микросомах СОД у животных с ушиванием активность Г-6-Фазы была выше на 10-е сутки на 8,0 ($P<0,05$), на 20- и 30-е сутки – на 15,6 и 19,3% ($P<0,05$).

Следовательно, проведенные исследования показали, что ушивание перфоративной гастродуоденальной язвы оказывает позитивное действие, направленное на активизацию угнетенной системы цитохрома P-450 в микросомах СОЖ. Однако, как видно из табл. 1, ушивание перфоративной язвы не решило проблему восстановления функционально-метаболической активности МОС в СОЖ, что, возможно, и является одной из основных причин сниженной ее резистентности к действию на желудок агрессивных факторов среды.

Одновременно установлено, что простое ушивание перфоративной язвы не восстанавливает до уровня контроля сниженную активность МОС в СОЖ. Все это обуславливает необходимость

поиска коррекции этой системы. Использование гастропротективных средств при терапии язвенной болезни у больных после ушивания перфоративных язв свидетельствуют, что они недостаточно эффективны, рецидив заболевания встречается в этих случаях до 50% (Афенкулов С.А., 2008). Все это послужило основанием для включения в перфоративное отверстие ТАМ.

Проведенные исследования показали, что ушивание перфоративного отверстия с ТАМ сопровождалось к 10-м суткам опыта к более значительному повышению содержания цитохрома р-450 в микросомах СОЖ, чем в аналогичной группе животных, соответствующего срока наблюдения из 2-1 серии опыта – на 39,4% ($P<0,001$) концентрации v_5 на – 25,0% ($P<0,001$), активности НАДФН-цит. сред. – на 28,4% ($P<0,001$), N-АП на – 26,4% ($P<0,001$), АГ – на 38,5% ($P<0,001$), Б(а)ПГ – на 35,9% ($P<0,001$) и Г-6-Фаза – на 20,0% ($P<0,02$).

После 20 сут. опыта у животных с ушиванием перфоративной язвы с ТАМ все исследуемые показатели МОС в СОЖ практически приближались к данным в контроле. Эти данные сохранялись пределах контроля вплоть до 30 суток опыта.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ушивание перфоративной язвы с ТАМ приводит к существенному сокращению сроков восстановления до уровня контроля нарушенной функционально-метаболической активности МОС в СОЖ, вызванной перфоративной язвы.

В последнее время ведется широкая дискуссия о возможности неинвазивной оценки активности МОС в СОЖ при его патологических состояниях. В этом плане перспективным является изучение N-АП желудочного сока. Имеются убедительные данные изменения активности N-АП при язвенном поражении желудка. В наших исследованиях представились оценить активность N-АП у больных с перфоративной язвой желудка у больных с перфоративной язвой желудка.

До операции активность N-АП в желудочном соке у больных с гиперацидным состоянием по сравнению с контролем ($0,042\pm 0,001$ нмоль НСНО/мл/мин) превышает аналогичный показатель у здоровых на 58%, с гипоацидным – на 38,3%, а нормаацидным – на 25,1%.

У всех повторно оперированных активность N-АП колебалась от 0,063 до 0,076 нмоль НСНО/мл/мин, превышало аналогичные показатели в контроле на 50,6-80,9%. Высокая активность N-АП сопровождалась усиленной кислотопродукцией, и рН желудочного сока составляла 1,8-3,3.

Таким образом, выраженная корреляционная связь между активностью N-АП, кислотопродукцией и частотой послеоперационных осложнений может свидетельствовать об информативности показателя N-АП при проведении дифференциальной диагностики, прогнозирования исходов хирургического лечения больных после ушивания гастродуоденальных перфоративных язв, а также при оценке эффективности послехирургического лечения. Повышение активности N-АП в желудочном соке коррелирует с уровнем кислотопродукции, но не связано с

обсемененностью слизистой оболочки антрального отдела желудка и двенадцатиперстной кишки *Helicobacter pylori*.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКНЯХ ЖЕЛУДКА ПОСЛЕ УШИВАНИЯ ПЕРФОРАТИВНОЙ ЯЗВЫ С ТАМ

По мнению ряда авторов, метаболическая активность системы цитохрома P-450 в силу локализации ее в мембранах гладкого эндоплазматического ретикулума может изменяться вследствие нарушения вязкостно-структурных свойств фосфолипидного матрикса. Эти изменения можно выявить с использованием флуоресцирующих зондов, реагирующих на изменения состояния гидрофобного слоя, развивающихся при различных патологических процессах. В этом плане наиболее подходящим флуоресцирующим зондом является 1,8-аминонафталинсульфанат (1,8-АНС⁻). Все это определило одну из задач исследования – изучить состояние гидрофобного компонента микросомальных мембран слизистой оболочки желудка в динамике после восполнения язвенного дефекта трансплантатом амниотической мембраны.

Общее представление о параметрах связывания флуоресцентного зонда 1,8-АНС⁻ с микросомальными мембранами СОЖ в динамике сроков после развития ПЯ в исследуемых группах животных представлено в таблице 2.

Таблица 2

Параметры связывания флуоресцентного зонда 1,8-АНС⁻ микросомальными мембранами СОЖ в динамике сроков наблюдения в исследуемых группах животных с ПЯ, М±m.

Показатель	Сроки исследования, сут.	Контроль	ПЯ	ПЯ+ушивание	ПЯ+ТАМ
Kc, мМ ⁻¹	10	42,70±2,10	18,53±1,15*	23,58±1,74* ^Δ	29,48±2,21* ^{Δ□}
	20		22,32±1,19*	25,63±1,45* ^Δ	39,16±2,16 ^{Δ□}
	30		30,47±2,05* ^{Δ□}	33,10±1,90*	42,67±3,36 ^{Δ□}
N, мкмоль/мг белка	10	27,19±1,03	14,90±0,73*	16,64±1,32*	21,92±1,48* ^{Δ□}
	20		19,75±0,73*	20,51±1,15*	25,89±1,08 ^{Δ□}
	30		22,26±1,54*	23,09±1,30*	26,92±1,76 ^{Δ□}
KcN, мМ ⁻¹	10	1,64±0,05	0,86±0,05*	1,12±0,07* ^Δ	1,33±0,05* ^{Δ□}
	20		1,15±0,04*	1,28±0,07*	1,55±0,04 ^{Δ□}
	30		1,23±0,06*	1,33±0,08*	1,61±0,05 ^{Δ□}

Примечание: P<0,05: * по сравнению с контролем, ^Δ по сравнению с 10-суточной ПЯ, [□] по сравнению с 20-суточной ПЯ.

Следовательно, проведенные исследования показали, что ушивание перфоративной язвы с ТАМ способствует более раннему восстановлению гидрофобных свойств фосфолипидного матрикса мембран микросом СОЖ по сравнению с группой животных, которым проведено ушивание ПЯ без ТАМ. В то же время снижение средства 1,8-АНС⁻ с гидрофобным слоем, константы связывания (Kc), концентрации центров связывания (N), суммарного средства (KcN) свидетельствует о глубоком нарушении структуры микросомальных мембран при развитии ПЯ, а также, возможном участии этого процесса в механизмах рецидива заболевания после ушивания

ПЯ. Нарушение связывания флуоресцентного зонда 1,8-АНС⁻ также свидетельствует о его важной роли в механизмах угнетения цитохрома P-450 при развитии ПЯ.

Анализ динамики процесса репарации слизистой оболочки желудка в 3 гр. животных при его ушивании в область дефекта амниотической ткани в ранние (1-10-е сут.) сроки выявил быстрое очищение раны от продуктов распада, повышением круглоклеточной реакции у ее краев, приводящей к ускорению формирования грануляционной ткани. Отмечаются более активные по сравнению с 1 и 2 гр. признаки перестройки фундальных желез по краям раны, приводящие специализированными клетками признаков дифференцировки, возрастанию пролиферативной активности железистого регенерата, т.е. новых желез и коллагенизации (во II периоде), а, с другой стороны, более ускоренная и полноценная эпителизация дефекта, как по ее поверхности, так и путем отпочкования новых желез в сторону сформированной соединительной ткани с последующим нарастанием структурных признаков вторичной дифференцировки (III период), что указывает на нормальные функциональные взаимоотношения между регенерирующими и соединительнотканными и эпителиальными структурами. Эти моменты убедительно свидетельствуют в пользу стимулирующего и регулирующего действия амниотической ткани на все основные этапы процесса репаративной регенерации, слизистой оболочки желудка, указывая на целесообразность его применения в качестве стимулятора при лечении язвенной болезни, а также после операции на желудке.

Таким образом, использованное нами оперативное воздействие при сквозном механическом дефекте слизистой оболочки желудка (ушивание дефекта и ушивание дефекта амниотической тканью) привели к активации процесса репаративной регенерации. При этом наиболее стимулирующее влияние проявилось при ушивании перфоративной язвы с ТАМ, что свидетельствует о ее выраженном на процессы регенерации действии и открывает перспективы для использования ее в хирургической практике при лечении перфоративных язв гастродуоденальной слизистой.

На основании полученных данных нами сделаны следующие **ВЫВОДЫ:**

- У животных с патофизиологической моделью перфоративной язвы желудка в микросомах клеток ее слизистой оболочки наблюдается угнетение активности ферментов монооксигеназной системы: цитохромов P-450, v_5 , НАДФН-цитохром C-редуктазы, бенз(а)пиренгидроксилазы, анилин-гидроксилазы, N-деметилазы амидопирин, глюкозо-6-фосфатазы, которые не восстанавливаются до контрольных значений даже к 30-м суткам опыта.

- Угнетение активности ферментов монооксигеназной системы ассоциируется с нарушениями вязкостно-структурных свойств фосфолипидного матрикса мембран микросом: статистически значимым ($P < 0,001$) 1,8-АНС⁻ со структурами гидрофобного слоя микросом, параметрами концентрации центров связывания (N) и параметрами суммарного сродства зонда ($K_s N$).

- Повышение активности N-деметилазы амидопирина в желудочном соке отражает степень деструкции тканей слизистой оболочки желудка, угнетение активности ферментов монооксигеназной системы микросом. Высокая скорость реакции N-деметилазы амидопирина желудочного сока, согласуется с усилением кислотопродукции, активностью течения язвенного процесса, частотой рецидивов и осложнений после ушивания перфоративной язвы у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки.

- Ушивание перфоративной язвы у экспериментальных животных характеризуется динамикой повышения активности монооксигеназных ферментов, структурно-вязкостных свойств фосфолипидного матрикса мембран микросом, ускорением процессов репаративной регенерации. Однако эти процессы еще значительно не достигают контрольных значений к завершающему сроку опыта, т.е. к 30-м суткам.

- Ушивание перфоративной язвы с тканью амниотической мембраны ускоряет процесс восстановления функционально-метаболической активности ферментов монооксигеназной системы, вязкостно-структурные свойства матрикса микросом в СОЖ, процессы репаративной регенерации на 20-е сутки раньше, чем при традиционном ушивании перфоративной язвы, полностью предотвращая случаи гибели животных.

- Гистологически ткань амниотической мембраны стимулирует процессы репаративной регенерации, перестройку эпителия главных и обкладочных желез, формируется вместо ожидаемой заместительной рубцовой ткани, морфологически состоятельные специализированные функциональные структуры.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Выявленные свойства ТАМ стимулировать функционально-метаболическую активность монооксигеназ, вязкостно-структурные соединения фосфолипидного матрикса мембран микросом, ускорять процессы репаративной регенерации, перестройку эпителия главных и обкладочных желез, формирование морфологически зрелых функционально активных структур, вместо образования соединительнотканного белого рубца у животных с патофизиологической моделью перфоративной язвы гастродуоденальной зоне открывает перспективу использования ТАМ в реконструктивной хирургии, в частности при ушивании перфоративных язв желудка и двенадцатиперстной кишки.

Оглавление

1. Список условных сокращений.....	4стр
2.Введение.....	5стр
3.Материалы и методы исследования.....	6стр
4. Влияние ТАМ на активность монооксигеназ слизистой оболочки желудка в исследуемых группах животных	8стр
5. Структурные изменения в тканях желудка после ушивания перфоративной язвы с ТАМ.....	12стр
6.Выводы.....	13стр
7.практические рекомендации.....	14стр
8.Рекомендуемая литература	16стр

Рекомендуемая литература

1. Аруин Л.И., Капулер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая характеристика болезней желудка и кишечника.-М.: Триада-Х, 1998.-486 с.
2. Афендулов С.А., Журавлев Г.Ю. Хирургическое лечение больных язвенной болезнью.-М.: ГЭОТАР Медиа, 2008.-336 с.
3. Гидроксирование производных анилина и аминотриптилина (1-фенил – 2,3 диметиламинопиразолон-5) в эндоплазматическом ретикулуме печени / Арчаков А.И., Карузина А.И., Твеританов В.Н., Кокарева И.С. // Биохимия.-1975.-Т.40, Вып.1.-С.32-39.
4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете// Клеточные технологии в биол. и мед.-2006.-№ 3.-С. 123-126.
5. Егоров В.В., Иванов А.А., Пальцев М.А. Стволовые клетки человека// Молекуляр. мед.-2003.-№ 2.-С. 3-14.
6. Зуева Е.Е., Куртова А.В., Комарова Л.С. Стволовые клетки. Некоторые биологические особенности и терапевтические возможности// Гематология.-2005.-№ 6.-С. 705-724.
7. Лобанков В.М. Хирургия язвенной болезни на рубеже XXI века// Хирургия.-2005.-№1.-С. 58-64.
8. Лобзин Ю.В., Александров В.Н. Правовые аспекты применения клеточной терапии в клинической практике на территории Российской Федерации// Клеточная трансплантол. и тканевая инженерия.-2005.-№ 1.-С. 64-66.
9. Лопухин Ю.М., Гусев С.А. Этические проблемы стволовых клеток// Вестн. РАМН.-2004-№ 9.-С. 19-23.
10. Михалев А.И., Федоров Е.Д., Чернякевич С.А. Результаты лапароскопического ушивания перфоративных дуоденальных язв // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.-2008.-№ 5.-С. 33-37.
11. Моисеев С.В. Лекарственная гепатотоксичность// Клин. фармакол.-2005.-№ 14 (1).-С. 10-14.
12. Панцырев Ю.М., Михалев А.И., Федоров Е.Д. Хирургическое лечение прободных и кровоточащих гастродуоденальных язв // Хирургия.-2003.-№ 3.-С. 43-49.
13. Петров В.П., Осипов В.В. Эффективность консервативного и хирургического лечения больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки// Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.-2003.-№ 5.-С. 14-18.
14. Попова О.П. Стволовые клетки человека: возможности изучения, перспективы и правовые аспекты использования// Сестр. дело.-2007.-№ 7.-С. 4-8.
15. Приходько А.В. Правовое регулирование деятельности БСК в США и РФ// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.-2007.-№ 2.-С. 92.

16. Реальность и проблемы использования стволовых клеток в клинической практике/ Селиванов Е.А., Беляков Н.А., Сериков В.Б., Абдулкадыров К.М. // Вестн. РАМН.-2004.-№ 3.-С. 76-79.
17. Сацукевич В.Н., Сацукевич Д.В. Факторы риска острых осложнений гастродуоденальных язв.-М.: Либерия, 1999.-416 с.
18. Способ определения активности N-деметилазы амидопирин / Комарин А.С., Худайбергенов р.У., Давлетшина Л.Н., Лапасов Ш. // Расмий ахборотнома 1-сон. Узбекистон Республикаси фан ва техника давлат куматаси. Давлат патент идораси.- Ташкент.-1994.-13с.
19. Хаджиев О.Ч., Лупальцев В.И. Лечение прободных гастродуоденальных язв // Хирургия.- 2001.№ 5.-С. 28-30.
20. Чертков И.Л., Дризе Н.И. «Пластичность» костно-мозговых стволовых клеток// Тер. арх.- 2004.-№ 7.-С.5-11.
21. Ярыгин В.Н. Тканевые клеточные системы – основа биомедицинских клеточных технологий нового поколения: контуры идеологии// Вестн. РАМН.-2004.-№ 9.-С. 12-19.

«_____» _____ 200 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Методические рекомендации _____

Предложено: _____

Источник информации _____

Где и когда внедрено _____

Общее количество наблюдений _____

Результаты наблюдений за период с _____ по _____

положительные (кол-во наблюдений) _____

неопределенные (кол-во наблюдений) _____

отрицательные(кол-во наблюдений) _____

Эффект внедрения (конкретизация стадии болезни, определение эффективности
терапии, др.показатели) _____

Дата _____ подпись ответственного исполнителя: _____