

Экспериментальное обоснование отдельных направлений патогенетического лечения абдоминального сепсиса

В эксперименте на животных обоснованы отдельные направления патогенетического лечения абдоминального сепсиса. При этом приводятся аспекты комплексного лечения генерализованной хирургической инфекции, некоторые направления антибактериальной терапии и иммунокоррекции. Ключевые слова: абдоминальный сепсис, патогенез, синдром системного воспалительного ответа, иммунодепрессия, коррекция нарушений гомеостаза и комплексное лечение

V.G. Bogdan

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF SEPARATE DIRECTIONS OF PATHOGENETIC TREATMENT OF THE ABDOMINAL SEPSIS

In experiment on animals separate directions of pathogenetic treatment of abdominal sepsis are proved. Thus aspects of complex treatment генерализованной a surgical infection, some directions of antibacterial therapy and immunocorrection are resulted. Key words: abdominal sepsis, pathogenesis, septic inflammatory response syndrome, immunodepression, correction of infringements of a homeostasis and complex treatment

Радикальные изменения во взглядах на патогенез абдоминального сепсиса, произошедшие в конце XX-го века, привели к созданию новых и изменению существующих методов комплексного лечения этого заболевания [1, 4, 6, 10]. Вместе с тем, сохраняющийся стабильно высокий уровень летальности даёт основания утверждать, что и в настоящее время отсутствует однозначный патогенетически верный подход к адекватной коррекции нарушений, возникающих при развитии генерализованной хирургической инфекции [2, 3, 8, 12, 13].

В свете всего вышеизложенного проведены исследования, целью которых стала оценка в экспериментальных условиях эффективности использования в комплексном лечении абдоминального сепсиса различных лекарственных комбинаций.

Материалы и методы

На 113 лабораторных животных проведены эксперименты по изучению результатов лечения абдоминального сепсиса в двух периодах болезни (индукционной и катаболической фазах) расстройств введением следующих лекарственных комбинаций: гентамицина и метронидазола (АК-1, серия 1), ципрофлоксацина и метронидазола (АК-2, серия 2), ципрофлоксацина и метронидазола в сочетании с имунофаном (АК- 3, серия 3) и тиенама (АК-4, серия 4). При этом у всех животных создавали патологический процесс по разработанному нами способу, при котором фаза напряжения абдоминального сепсиса развивалась через 6 часов, а катаболическая фаза – через 12 часов с момента начала эксперимента. Через 12 часов при релaparотомии удаляли некротизированный червеобразный отросток и образовавшийся экссудат, в брюшную полость вводили антибактериальные препараты, подкожно - имунофан. В дальнейшем, в 1-е и 2-е сутки

послеоперационного периода внутрибрюшинное введение заменяли внутримышечным.

На 56 животных, с аналогичным способом моделирования абдоминального сепсиса, проведено изучение эффективности поэтапной коррекции иммунного статуса путём применения лекарственных комбинаций, направленных на подавление активности медиаторных реакций в первой (индукционной) фазе патологического процесса, и стимуляции функциональной активности иммунокомпетентных органов во второй (катаболической) фазе заболевания. В качестве патогенетической терапии в 1-ю фазу заболевания наряду с проведением адекватной санации брюшной полости и удалением гнойного очага, а также назначением базовой антибактериальной терапии (ципролет и метронидазол) использовали иммунокомбинацию № 1 (ИК-1), состоящую из пентоксифиллина 1,5 мл (ингибитора ФНО- α , ИЛ-1,6 и кислородно-радикальных комплексов), диавитола 0,5 мл (неспецифического антигипоксанта, стимулятора обменных и репаративных процессов), эмоксипина 1,5 мл (ингибитора синтеза эндотелинов, свободных радикалов - NO, O $_2$ •, OH•, H $_2$ O $_2$, NO $_2$ и антигипоксанта), вводимых внутримышечно.

Коррекцию иммунных нарушений в катаболической фазе абдоминального сепсиса проводили препаратами иммунокомбинации № 2 (ИК-2): диклофенак 0,75 мл (ингибитор синтеза простагландинов за счет подавления индуцируемой циклооксигеназы II-го типа), пентоксифиллин 1,5 мл и имунофан 0,3 мл (гексапептид 4-го поколения), а также иммунокомбинацией № 3 (ИК-3): овомин 0,5 мл [300 ЕД] (ингибитор протеолиза), диавитол 0,5 мл и имунофан 0,3 мл. Введение этих препаратов повторяли в 1-е и 2-е сутки после операции. Выведение всех животных из эксперимента производили на 5-е сутки с определением основных показателей гомеостаза.

Содержание гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрит, лейкограмму крови определяли на гематологическом анализаторе “Hegonic CA 530” (Польша). Содержание мочевины в крови определяли фотометрическим методом индукции продуктов реакции мочевины с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида. Концентрацию общих липидов сыворотки крови оценивали фотометрическим методом с помощью набора “Лахема” (Чехия). Содержание белка сыворотки крови оценивали унифицированным методом биуретовой реакции. Показатели перекисного окисления липидов определяли: диеновые конъюгаты (ДК) - спектрофотометрически (в спектре поглощения 233 нм), малоновый диальдегид (МД) – аналогично (с максимумом поглощения в полосе спектра 532 нм). Общую активность глутатионредуктазы (ГР) изучали методом I. Carlberg [7]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции окисления кварцетина. Уровень молекул средней массы (МСМ) в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим способом при различных длинах световой волны. Окислительную модификацию белков сыворотки крови регистрировали по накоплению битирозина и снижению флуоресценции остатков триптофана. Битирозиную флуоресценцию измеряли при $\lambda_{\text{возб}} = 325$ нм и $\lambda_{\text{исп}} = 416$ нм, максимумы поглощения и испускания битирозина уточняли с помощью коммерческого препарата, триптофановую флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм и $\lambda_{\text{исп}} = 336$ нм [5]. Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) и бактерицидную активность

экссудата (БАЭ) определяли по F. Precechtel et al. (1968) [11]. Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) крови определяли спектрофотометрически по степени их преципитации в 3,5%-ном растворе полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000. Концентрацию лизоцима в сыворотке крови устанавливали, калориметрируя её с суточной культурой *Bac. lysodeicticus* после инкубации в термостате. Для исследования клеточного состава экссудата изучали мазки-отпечатки с брюшины, окрашенные по Май-Грюнвальду-Романовскому-Гимза, с микроскопией под иммерсией, подсчетом форменных элементов и выведением среднего показателя по 20 полям зрения. Инфицирование брюшной полости оценивали методом подсчета колониеобразующих микробов в 1 мл смыва по П.И. Острину с соавт. (1985). Показатели основных констант гомеостаза у лабораторных животных в экспериментальных сериях оценивали в сравнении с контролем (интактные животные) и различными фазами абдоминального сепсиса с помощью методов вариационной статистики с применением прикладной программы для персональных компьютеров "STATISTICA" (Version 6-Index).

Результаты и обсуждение

Анализ летальности лабораторных животных показал: в серии №1 погибло 26 животных (81,3%), в серии №2 – 20 (76,9%), в серии №3 – 11 (68,8%) и в серии №4 – 8 (61,5%). При оценке показателей гемограммы выявлено достоверное наличие анемии во всех группах животных, с её минимальными проявлениями в 3-ой и 4-ой сериях. Со стороны показателей "белой крови" у животных 1-ой серии на 5-е сутки послеоперационного периода отмечалась лейкопения, тогда как в других сериях имел место лейкоцитоз. Выраженный сдвиг "лейкоцитарной формулы влево" за счет палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов был характерен при использовании АК-1 и АК-2. Наибольший уровень лимфоцитов ($P < 0,05$) и тромбоцитов ($P < 0,05$) определен в 3-ой и 4-ой сериях, в остальных случаях он не достигает контрольных значений. Только у животных 1-ой серии сохраняется эозинофилия, характерная для катаболической фазы абдоминального сепсиса. Во всех случаях имеется моноцитоз, с максимальными значениями в 1-ой и 2-ой сериях. При изучении основных биохимических показателей крови установлено, что большинство их превышает контрольный уровень. Вместе с тем при использовании препаратов АК-3 и АК-4 уровень мочевины, общего и прямого билирубина в этих группах на 5-е сутки послеоперационного периода был достоверно ниже ($P < 0,001$), а концентрация белка сыворотки крови превышала аналогичные показатели в других группах ($P < 0,05$). Низкий уровень активности перекисного окисления липидов (наименьшая концентрация диеновых конъюгат, малонового диальдегида) и перекисного окисления белков (высоко достоверный рост уровня триптофана и значительное снижение содержания битирозина) [$P < 0,001$], а также состояние антиоксидантной системы (повышенное накопление в крови супероксиддисмутазы) в 3-й и 4-й сериях ($P < 0,05$), позволяет говорить о высокой степени защиты от клеточной деструкции при использовании этих антибактериальных комбинаций (табл. 1). В группе животных с внутрибрюшинным введением ципрофлоксацина и метронидазола в сочетании с имунофаном отмечена максимальная бактериальная активность экссудата ($P < 0,05$).

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и перекисного окисления белков (ПОБ) у лабораторных животных после проведения лечения антибактериальной комбинацией № 1,2,3,4 (M+m)

Показатели, ед.	Группы сравнения					
	АК-1 Серия 1 n=6	АК-2 Серия 2 n=6	АК-3 Серия 3 n=5	АК-4 Серия 4 n=5	Абдоминаль- ный сепсис (12 часов) n=6	Конт- роль n=8
Дниевые конъюгаты, мкмоль/мл/час	11,0± 0,07 # / ##	11,1± 0,18 # / ##	10,8± 0,34 # / **	10,8± 0,2 # / **	12,4± 0,17#	9,09± 0,14
Общие липиды, мкмоль/мл/час	1,21± 0,05 #	1,93± 0,1 */**	2,88± 0,16 ##	2,59± 0,15 ##	1,43± 0,1#	3,18± 0,31
Малоновый диальдегид, нм/мл	4,76± 0,68 **	4,17± 0,11 */**	3,86± 0,11 **	3,47± 0,38 **	8,25± 1,21#	3,45± 0,23
Глутатионредуктаза, мкмоль/гНв/час	10,8± 0,81	16,5± 3,1 *	17,2± 1,96 */**	22,2± 1,78 #/**	11,87± 1,12	10,78± 0,82
Битирицин, усл. ед.	0,41± 0,02 ##	0,255± 0,035 ###	0,17± 0,03 #/**	0,14± 0,01 #/**	0,89± 0,22*	0,4± 0,01
Триптофан, усл. ед.	8,01± 0,78 ###	9,54± 0,69 ###	9,84± 0,92 ###	15,3± 0,58 #/**	1,3± 0,15 #	17,9± 0,32
Супероксид-дисмутаза, мкг/мл	33,6± 0,93	36,2± 1,0 **	38± 0,84 **	38,5± 1,12 **	29,9± 1,6*	40,9± 2,57

Примечание: * - различия достоверны с контролем при $P < 0,05$; ** - различия достоверны с показателем при абдоминальном сепсисе в фазе катаболических расстройств при $P < 0,05$; # / ## - то же самое при $P < 0,001$.

Наиболее выраженное снижение уровня циркулирующих иммунных комплексов выявлено в 3-й и 4-й сериях ($P < 0,001$), в них же определено наивысшее содержание лизоцима в сыворотке крови лабораторных животных ($P < 0,05$). В 4-й серии установлено максимальное значение бактерицидной активности сыворотки крови. Уровень молекул средней массы при разных длинах волн при использовании АК-3 соответствует контрольным значениям ($P < 0,05$), АК-1 и АК-2 незначительно превышает ($P < 0,05$), а при АК-4 несколько ниже, чем у интактных животных ($P < 0,001$). Уровень микробной обсемененности перитонеального экссудата у лабораторных животных после проведения лечения антибактериальной комбинацией №3 и №4 был на порядок ниже, чем в аналогичных показателях после лечения антибактериальной комбинацией №1 и №2. При этом у животных 1-й и 2-й серий превалировала грамотрицательная микробная флора. По клеточному составу в 3-й и 4-й сериях в экссудате преобладают лимфоциты, в 1-й и 2-й – нейтрофилы.

Таким образом, использование в качестве антибактериальных препаратов введение ципрофлоксацина и метронидазола в сочетании с назначением имунофана, так же как и введение карбапенемового препарата - тиенама позволяет не только добиться более полного и быстрее восстановления основных констант гомеостаза, но и снизить уровень летальности при лечении абдоминального сепсиса в фазе катаболических расстройств у лабораторных животных. Следует отметить, что применение цефалоспоринов III поколения в сочетании с метронидазолом и

гексапептидом 4-го поколения (имунофаном) не уступает, а в ряде случаев и превосходит по своей эффективности, монотерапию тиенамом.

Уровень летальности в 1-е сутки при использовании ИК-1 составил 21,4% (3 животных), а ИК-2 и ИК-3 - 40% (6). К 5-ым суткам погибло 64,3% животных в серии с назначением ИК-1 и 60% - в сериях, где лечение проводили с использованием ИК-2 и ИК-3. При анализе гематологических показателей установлено достоверное снижение уровня гемоглобина и количества эритроцитов, сочетающееся с падением уровня гематокрита у животных, в комплекс лечения которых включена ИК-1 (как проявление гемодилюции). В этой серии к 5-му дню послеоперационного периода сохранялись тромбоцитопения и лейкоцитоз (в первую очередь, за счёт сегментоядерных нейтрофилов), аналогично соответствующим показателям в фазу напряжения при экспериментальном абдоминальном сепсисе, а также выявлялась выраженная лимфопения ($P < 0,001$), указывающая на более существенное угнетение клеточного звена иммуногенеза. Содержание моноцитов и эозинофилов со-

Таблица 2

Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и перекисного окисления белков (ПОБ) у лабораторных животных после проведения лечения иммунокомбинацией № 1 в сочетании с ципрофлоксацином и метронидазолом (M+m)

Показатели, ед.	Группы сравнения		
	Контроль n=8	Абдоминальный сепсис (6 часов) n=5	ИК - 1 (серия 5) n=5
ДК, мкмоль/мл/час	9,09±0,14	9,77±0,13*	11,1±0,2##/**
Общие липиды, мкмоль/мл/час	3,18±0,31	3,53±0,35	1,97±0,16*/**
МД, нм/мл	3,45±0,23	5,54±0,66*	1,4±0,12#/**
Глутатионредуктаза, мкмоль/гНв/час	10,8±0,82	12,7±1,4	15,7±1,13*
Битирозин, у.е.	0,4±0,01	0,73±0,14*	0,08±0,008#/**
Триптофан, у.е.	17,9±0,32	15,5±0,8*	4,36±0,27###
Супероксид- дисмутаза, мкг/мл	40,9±2,57	40,1±4,2	36,1±4,55

Примечание: * - различия достоверны с контролем при $P < 0,05$; ** - различия достоверны с показателем при абдоминальном сепсисе в фазе напряжения при $P < 0,05$; # / ## - то же самое при $P < 0,001$. тветствовало контрольным значениям. При лечении ИК-2 и ИК-3 со стороны “красной крови” сохранялось достоверное снижение всех показателей. Уровень тромбоцитов превышал к сроку выведения животных из эксперимента аналогичный показатель в фазе катаболических расстройств, а при использовании ИК-3 он достоверно превышал и контрольный уровень ($P < 0,05$). Во всех сериях с использованием иммунных комбинаций имело место недостоверное повышение уровня лимфоцитов (преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов), также недостоверным был рост числа моноцитов. Содержание лимфоцитов во всех группах с применением лекарственных композиций было ниже, чем в группе интактных животных, однако выше, чем у животных с прогрессирующим абдоминальным сепсисом. Со стороны биохимического комплекса при использовании в лечебном комплексе ИК-1

установлено значительное превышение уровня мочевины: по сравнению с контрольными значениями - в 2,9 раза ($P < 0,001$), со значениями фазы напряжения - в 1,6 раза ($P < 0,05$). Содержание общего билирубина соответствовало уровню контрольной серии, а общего белка крови было несколько ниже, чем в группе сравнения ($P < 0,05$). При использовании ИК-2 и ИК-3 выявлено, что все показатели биохимического анализа крови были достоверно ниже аналогичных значений в фазе катаболических расстройств. При этом сохранялось повышенное содержание мочевины в крови относительно контроля более чем в 2 раза ($P < 0,001$). Анализируя показатели ПОЛ и ПОБ (см. табл.2.) при лечении ИК-1, отмечено достоверное уменьшение накопления к 5-м суткам послеоперационного периода МД при повышенном уровне ДК.

В структуре окислительной модификации белков при использовании первого варианта иммунокомбинации (ИК-1) установлена предельно низкая (ниже уровня контроля) концентрация как битирозина, так и триптофана ($P < 0,001$). На компенсацию систем антиоксидантной защиты при использовании разработанных комбинаций указывает достаточно высокая активность СОД. Аналогичные тенденции выявлены в сериях с использованием ИК-2 и ИК-3 (табл. 3). Вместе с тем, по сравнению с показателями фазы катаболических расстройств абдоминального сепсиса восстановление перенесенной липидной и белковой деструкции выглядит более показательно, особенно в серии № 7. В группе с применением ИК-1 уровень бактерицидной активности сыворотки крови и экссудата был существенно ниже, в то время как содержание циркулирующих иммунных комплексов и лизоцима сыворотки крови – достоверно выше контрольных значений ($P < 0,001$). При лечении ИК-2 и ИК-3 выявлены крайне низкие значения БАЭ с достоверным превышением всех остальных показателей неспецифического местного и общего иммунитета. О достоверном снижении уровня эндогенной интоксикации и существенном уменьшении интенсивности воспалительного процесса говорит тот факт, что у животных всех серий с использованием лекарственных комбинаций накопление молекул средней массы было достоверно ниже, чем в контрольных группах.

Таблица 3

Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и перекисного окисления белков (ПОБ) у лабораторных животных после проведения лечения иммунокомбинацией № 2 и 3 в сочетании с ципрофлоксацином и метронидазолом (M+m)

Показатели, ед.	Группы сравнения			
	ИК – 2 (серия 6) n=6	ИК – 3 (серия 7) n=6	Абдоминаль- ный сепсис (12 часов) n=6	Кон- троль n=8
Дневные конъюгаты, мкмоль/мл/час	11,3±0,3#/**	10,6±0,12###	12,4±0,17#	9,09±0,14
Общие липиды, мкмоль/мл/час	2,22±0,15**	2,18±0,13*/**	1,43±0,1#	3,18±0,31
Малоновый диальдегид, нм/мл	1,88±0,31#/**	1,2±0,1# / ##	8,25±1,21#	3,45±0,23
Глутатионредуктаза, мкмоль/гНв/час	16,9±1,99**	15±1,12*	11,9±1,12	10,8±0,82
Битирозин, усл. ед.	0,1±0,015#/**	0,11±0,02#/**	0,89±0,22*	0,4±0,01
Триптофан, усл. ед.	4,29±0,25###	4,53±0,17# / ##	1,3±0,15#	17,9±0,32
Супероксиддисмутаза, мкг/мл	34,6±4,1	38,7±1,91**	29,9±1,6*	40,9±2,57

Примечание: * - различия достоверны с контролем при $P < 0,05$; ** - различия достоверны с показателем при абдоминальном сепсисе в фазе катаболических расстройств при $P < 0,05$; # / ## - то же самое при $P < 0,001$.

При анализе клеточного состава и уровня микробной обсемененности перитонеального экссудата у лабораторных животных после проведения лечения с включением ИК-1 установлено, что количество лимфоцитов превышает контрольные значения ($P < 0,001$), а содержание нейтрофилов близко к аналогичному показателю у интактных животных. Степень микробной обсемененности грамотрицательной и грамположительной флоры снижалась на порядок ($P < 0,05$). В сериях №6 и №7 соотношение лимфоцитов и нейтрофилов практически было равнозначным. В микробном пейзаже преобладали грамотрицательные бактерии с уменьшением общего их числа в 10 раз относительно фазы катаболических расстройств абдоминального сепсиса.

Таким образом, использование в эксперименте предлагаемых лечебных комбинаций (антибактериального и иммунокорректирующего действия) позволяет снизить уровень летальности лабораторных животных при моделировании у них тяжёлого интраабдоминального инфекционного процесса с абсолютных цифр до 60-64,3%, эффективно проводить коррекцию основных нарушений гомеостаза вследствие многофакторного корректирующего влияния на ведущие звенья патогенеза.

Выводы:

1. В комплексном лечении абдоминального сепсиса, помимо полноценно выполненного оперативного пособия, обязательным компонентом является проведение эффективной антибактериальной терапии с использованием препаратов широкого спектра действия, позволяющих эффективно подавлять неуправляемую экспрессию основных возбудителей заболевания в различных биологических средах организма.

2. Назначение цефалоспоринов III поколения в сочетании с метронидазолом и гексапептидом 4-го поколения (имунофаном) может использоваться в качестве эмпирической лечебной схемы антибактериальной терапии до идентификации возбудителя и по своему лечебному действию сопоставимо с подтвержденной эффективностью тиенама.

3. Разработанные лекарственные комбинации позволяют регулировать изменения, происходящие в организме животных с абдоминальным сепсисом, поэтапно (постадийно) корригируя разнонаправленные сдвиги со стороны иммунной системы и оказывая позитивный эффект на функцию различных органов и систем.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Абдоминальный сепсис: современный взгляд на нестареющую проблему. Стратегия и тактика лечения / Б.Р. Гельфанд, В.А. Гологорский, С.З. Букрневич и др. // Вестник интенсивной терапии.- 1997.- № 1.- С.10-16.
2. Антибактериальная терапия и профилактика хирургической инфекции: Справочно-информационное руководство для врачей / Под ред. Ю.М. Гаина, С.А. Алексеева, В.А. Стельмаха; Авт.: Ю.М. Гаин, С.А. Алексеев, В.А. Стельмах, В.Т. Кохнюк, С.А. Жидков и др. –Москва: Редакционно-издательский центр Генерального штаба Вооружённых сил Российской Федерации, 2002.- 894 с.
3. Гринёв М.В., Громов М.И., Комраков В.Е. Хирургический сепсис. –СПб.-М.: ОАО “Типография “Внешторгиздат”, 2001.- 315 с.
4. Завада Н.В., Гаин Ю.М., Алексеев С.А. Хирургический сепсис. –Минск, 2002.- 214 с.
5. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В. Измерение флюоресценции битирозина битирозина сыворотки крови // Биохимия.- 200.- Том.53, № 15.- С.816-826.
6. Илюкевич Г.В. Абдоминальный сепсис: новый взгляд на нестареющую проблему // Медицинские новости.- 2001.- № 9.- С.35-41.
7. Карпищенко А.И., Глушков С.И., Смирнов В.В. Глутатионредуктаза гемолизатов крови // Токсикологический вестник.- 1997.- № 3.- С.18-19.
8. Козлов В.К. Иммунопатогенез и цитокинотерапия хирургического сепсиса. –СПб: Изд-во “Ясный свет”, 2002.- 48 с.
9. Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю., Лызкова С.Н. Измерение общей и триптофановой флюоресценции белков сыворотки крови // Вопросы медицинской химии.- 2000.- № 4.- С.115-117.
10. Bone R.C. Sepsis and septic shock // Freshening course of the lectures 9th European Congress of Anaesthesiology, Jerusalem, Israel, October 2-7, 1994.- P.125-139.
11. Some defense mechanisms in children suffering from rachitic: II: Bacteriostatic activity of blood serum / F. Precechtel, M. Cech, V. Zizlavsky, A. Noll // Scripta.Med.- 1968.- Vol.7-8.- P.465-469.
12. Shands J.W. Empiric antibiotic therapy of abdominal sepsis and serious perioperative infections. // Surg. Clin. North. Am.- 1993.- Vol.73 (2).- P.291-306.
13. Wittmann D.H. Intra-abdominal infections: Pathophysiology and treatment. -New York, Basel, Hong Kong, 1991.- 84 p