

На правах рукописи

ВОЛКОВ АЛЕКСАНДР ГЕННАДЬЕВИЧ

**КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
АБДОМИНАЛЬНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ И
ЕЕ ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ**

14.01.17 – хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Пермь 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой факультетской хирургии №2
с курсом гематологии и трансфузиологии ФДПО
ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский
университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Заривчацкий Михаил Федорович

кандидат медицинских наук, доцент,
заведующий лабораторией биохимии развития
микроорганизмов Института экологии и генетики
микроорганизмов Уральского отделения РАН

Коробов Владимир Павлович

Официальные оппоненты:

заслуженный деятель науки РФ, доктор
медицинских наук, профессор кафедры общей
хирургии ГБОУ ВПО «Южно–Уральский
государственный медицинский университет»
Минздрава России (г. Челябинск)

Привалов Валерий Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор
кафедры госпитальной хирургии, анестезиологии и
реаниматологии, урологии, травматологии и ортопедии
Медицинского факультета имени Т.З. Биктимирова ФГБОУ ВО
«Ульяновский государственный университет»
Министерства образования и
науки Российской Федерации

Смолькина Антонина Васильевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» (г. Саранск) Министерства образования и науки Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.03 при ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990 г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26, зал заседаний диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д.26, а с авторефератом на сайтах www.psm.ru и www.vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

**Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
доктор медицинских наук,
профессор**

Наталья Николаевна Малютина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одной из наиболее сложных проблем абдоминальной хирургии и интенсивной терапии остается лечение гнойно-воспалительных заболеваний органов брюшной полости и их осложнений (Мороз В.В. и соавт., 2004; Власов А.П. и соавт., 2005; Савельев В.С. и соавт., 2006; Чернов В.Н. и соавт., 2007; Кукош М.В. и соавт., 2009; Привалов В.А. и соавт., 2010; Reinders J.S.K. *et al.*, 2013). Летальность при этих патологических процессах не имеет выраженной тенденции к снижению и колеблется, по данным последних лет, от 19% до 70% (Томнюк Н.Д. и соавт., 2010; Bonne R.C. *et al.*, 1997; Holzheimer R.G. *et al.*, 2003). Спасение жизни больных в этих случаях зависит от своевременной диагностики и эффективности хирургического вмешательства. Тяжелые воспалительные и деструктивные поражения органов брюшной полости являются, по своей сути, абдоминальными инфекционными заболеваниями, нередко приводящими к развитию некурабельного сепсиса (Гельфанд Е.Б., 1999; Власов А.П. и соавт., 2014; Мидленко И.Н., Смолькина А.В. и соавт., 2015; Rainhart K. *et al.*, 2002; Ivatury, 2006; Corfield R., 2007; Van R.O. *et al.*, 2007).

Благодаря созданию новых антибактериальных препаратов, удалось разработать методы эффективного лечения многих заболеваний инфекционной природы (Кишкун А.А., 2002; Мельникова О.А. и соавт., 2004; Serra E.P. *et al.*, 2013). Вместе с тем, частое применение антибиотиков без должных показаний, нарушения схем лечения, неадекватные дозировки препаратов привели к тому, что микроорганизмы, вызывающие гнойно-септические заболевания, стали малочувствительными к известным современным антибактериальным препаратам (Murray V. *et al.*, 1983; Lecrec R. *et al.*, 1988). При этом необходимо отметить, что повышение резистентности, практически, всех доминирующих патогенных микроорганизмов происходит гораздо быстрее, нежели создаются новые препараты, способные влиять на антибиотикоустойчивые бактерии (Lecrec R. *Et al.*, 1988; Castro I. *et al.*, 1993).

Кроме того, антибиотикотерапия сопровождается рядом нежелательных эффектов, таких как дисбиоз кишечника, аллергические реакции, угнетение функций печени и др. В этой связи возникает необходимость создания принципиально новых антибактериальных препаратов, обладающих выраженным антимикробным действием, основой которых могут быть низкомолекулярные катионные пептиды (Silver L. *et al.*, 1993; Marshall J.C. *et al.* 1995; Tytler E. *et al.* 1995; Hancock R.E. 1998). Известно, что эта группа пептидов проявляет высокую ингибирующую активность в отношении некоторых антибиотикоустойчивых клинических штаммов бактерий (Severina E. *et al.*, 1998; Mota-Meira M. *et al.*, 2000).

В 90-х годах прошлого столетия было обнаружено, что препараты природного лейкоцитарного альфа-интерферона также обладают антибактериальным действием за счет наличия в них комплекса низкомолекулярных пептидов (Korobov V.P. *et al.* 1988). Позднее на базе Пермского НПО "Биомед" был выделен антибактериальный фактор,

синтезируемый донорскими лейкоцитами в процессе вирусиндуцированного интерфероногенеза. Данный пептидный комплекс был изучен с оценкой его физико-химических и некоторых биологических свойств. Исследование специфической активности комплекса подтвердило его антимикробное действие в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий (Волкова Л.В. и соавт., 2004, 2005; Косарева П.В., 2004).

Все это служит предпосылкой для создания нового лечебного препарата, предполагающего этап доклинической оценки с изучением эффективности антибактериального действия на моделях заболеваний, при которых новое лекарственное средство может быть эффективно использовано.

Степень разработанности темы исследования

Согласно клиническим рекомендациям по лечению острых хирургических заболеваний органов брюшной полости, методом выбора является своевременное выполнение оперативного вмешательства с проведением в послеоперационном периоде рациональной противовоспалительной и детоксикационной терапии. В России этот лечебный комплекс выполняется широко, однако, нет данных относительно терапевтического использования в этих целях комплекса низкомолекулярных антибактериальных пептидов лейкоцитов человека, а существующие принципы моделирования перитонита у животных требуют усовершенствования в сторону их повышения объективности и снижения травматичности.

Изложенное выше определило выбор цели и задач настоящего исследования.

Цель исследования

Повышение эффективности лечения абдоминальных хирургических инфекций за счет использования препарата, состоящего из комплекса антибактериальных пептидов, синтезируемых и выделяемых лейкоцитами человека в процессе интерфероногенеза.

Задачи исследования

1. Изучить особенности микробного пейзажа у больных с абдоминальной хирургической инфекцией в условиях многопрофильного стационара.
2. Определить динамику антибиотикочувствительности штаммов, выделенных у больных острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом.
3. Исследовать *in vitro* антибактериальное действие комплекса низкомолекулярных пептидов лейкоцитов человека на штаммы микроорганизмов, выделенных у больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом.
4. Разработать модель экспериментального перитонита с учетом особенностей микробного пейзажа при остром аппендиците, остром холецистите и остром панкреатите.
5. Провести оценку эффективности использования лейкоцитарного антибактериального пептидного комплекса, синтезируемого в процессе

интерфероногенеза, для подавления экспериментального перитонита у животных.

Научная новизна исследования

Установлено, что в перитонеальных выпотах при остром аппендиците, остром холецистите и остром панкреатите микроорганизмы переставлены в основном родами бактерий *Escherichia*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*, на долю которых приходится 36,36, 19,13 и 19,37% соответственно.

С января 2008 г. по декабрь 2012 г. проведен сравнительный анализ антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных у больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом, при котором выявлено снижение чувствительности к антибиотикам у штаммов *Escherichia* – на 7,32%, *Staphylococcus* – на 14,37% и *Streptococcus* – на 26,23%.

Разработана оригинальная модель экспериментального перитонита, которая обеспечивает проведение оценки лечебной эффективности различных противомикробных препаратов.

Впервые доказана лечебная эффективность комплекса низкомолекулярных лейкоцитарных пептидов при экспериментальном перитоните у животных, проявляющаяся заметным снижением симптомов интоксикации и летальности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе данные расширяют представления о характере микрофлоры при остром аппендиците, остром холецистите и остром панкреатите и ее значении в развитии хирургических инфекций у больных многопрофильного стационара. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при выборе лекарственных препаратов для проведения рациональной антибиотикопрофилактики, а также эмпирической и этиотропной антибактериальной терапии (Акт внедрения от 15 апреля 2015 г.).

Доказана лечебная эффективность комплекса лейкоцитарных антибактериальных пептидов в отношении бактерий, выделенных у больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом.

Разработана и апробирована модель экспериментального перитонита у лабораторных животных (белых крыс) при внутрибрюшинном введении микст-культур бактериальных штаммов, выделенных из экссудатов больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом, обеспечивающая изучение эффективности антибактериальных препаратов.

Выявленная антибактериальная эффективность использования изученного пептидного препарата при лечении экспериментального перитонита является основанием для внедрения его в практику.

Методология и методы исследования

При выполнении работы использовались клинические, лабораторные, инструментальные, морфологические и статистические методы исследования. Объектами изучения являлись: больные с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом, а также лабораторные животные (белые крысы) для разработки экспериментальной модели перитонита и оценки

эффективности методов его лечения. Предмет исследования – таксономическая характеристика возбудителей наблюдаемых хирургических инфекций и выявление их чувствительности к антибиотикам, разработка экспериментальной модели перитонита с использованием выделенных у пациентов бактериальных штаммов, изучение лечебной эффективности комплекса низкомолекулярных антибактериальных пептидов лейкоцитов человека.

Положения, выносимые на защиту

1. В структуре клинически значимой микрофлоры при острых абдоминальных инфекциях преобладают представители грамотрицательной микрофлоры, в частности, рода бактерий *Escherichi*, доля которых в структуре пейзажа микроорганизмов выделяемых из перитонеального выпота, составляет более 40%. Штаммы бактерий, выделенных из перитонеального выпота у больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом, как правило, обладают множественной устойчивостью к антибиотикам.

2. Выделяемые лейкоцитами человека низкомолекулярные пептиды обладают выраженным антибактериальным действием в отношении микроорганизмов родов *Escherichia* и *Staphylococcus*, высеваемых из перитонеального выпота больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом.

3. Разработанная модель экспериментального бактериального перитонита у крыс может быть использована для оценки эффективности действия новых антибактериальных препаратов.

4. Интраперитонеальное введение лейкоцитарного антибактериального пептидного комплекса (АБПК) способствует уменьшению эндотоксикоза и приводит к снижению летальности у животных при распространенном экспериментальном гнойном перитоните.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты экспериментальных исследований внедрены в работу хирургических отделений ГБУЗ "Клиническая медико-санитарная часть №1" г. Перми при лечении больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом, а также используются в учебном процессе на кафедре факультетской хирургии №2 с курсом гематологии и трансфузиологии ФПДО ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация результатов

Статистический анализ результатов диссертационных исследований проведен с помощью программы Statistica 6.0 (№ лицензии АХХR009E747530FAN25).

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на XVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2011), XIV региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология–2012» (Пермь, 2012), 17-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология –

наука XXI века» (Пушино, 2013), 51-ой Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», Медицина (Новосибирск, 2013.), XVII региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология – 2015» (Пермь, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них три в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, оформлено две заявки на патенты РФ «Способ моделирования перитонита в эксперименте» (Заявка № 2015111066 от 26.03.2015) и «Способ профилактики спонтанно возникающего острого перитонита у экспериментальных животных» (Заявка № 2015150010 от 20.11.2015).

Связь работы с научными программами

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Номер государственной регистрации темы 115031920001.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация по поставленной цели, решенным задачам и полученным результатам соответствует паспорту специальности 14.01.17 – хирургия.

Личный вклад автора в проводимое исследование

Автором проведен патентно-информационный поиск и анализ литературы по теме диссертации; составлены и оформлены протоколы исследований; принято участие в проведении бактериологических исследований клинического материала у больных с хирургическими инфекциями; проведены экспериментальные доклинические исследования на животных; разработана модель экспериментального перитонита; определен круг возбудителей, наиболее чувствительных к АБПК, синтезируемому лейкоцитами человека в процессе интерферогенеза; проведена оценка клинической эффективности АБПК на экспериментальной модели перитонита у крыс. Автором проведен ретроспективный анализ историй болезни обследованных больных и статистическая обработка результатов исследований.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, пяти глав исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель включает в себя 188 источников, из них 123 отечественных и 65 иностранных авторов.

Диссертация изложена на 126 страницах компьютерного текста, содержит 23 таблицы, 32 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клинико-лабораторные исследования проведены в период с января 2008 г. по декабрь 2012 г. на базе отделений экстренной, плановой и гнойной хирургии городской клинической больницы № 2 им. Ф.К. Грала г. Перми (главный врач - В.Н. Грязнов) у 244 пациентов в возрасте от 16 до 89 лет, из абдоминальных экссудатов которых в диагностических титрах выделялись микроорганизмы родов *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Klebsiella*, а также вида *Pseudomonas aeruginosae* в различных титрах (рис. 1).

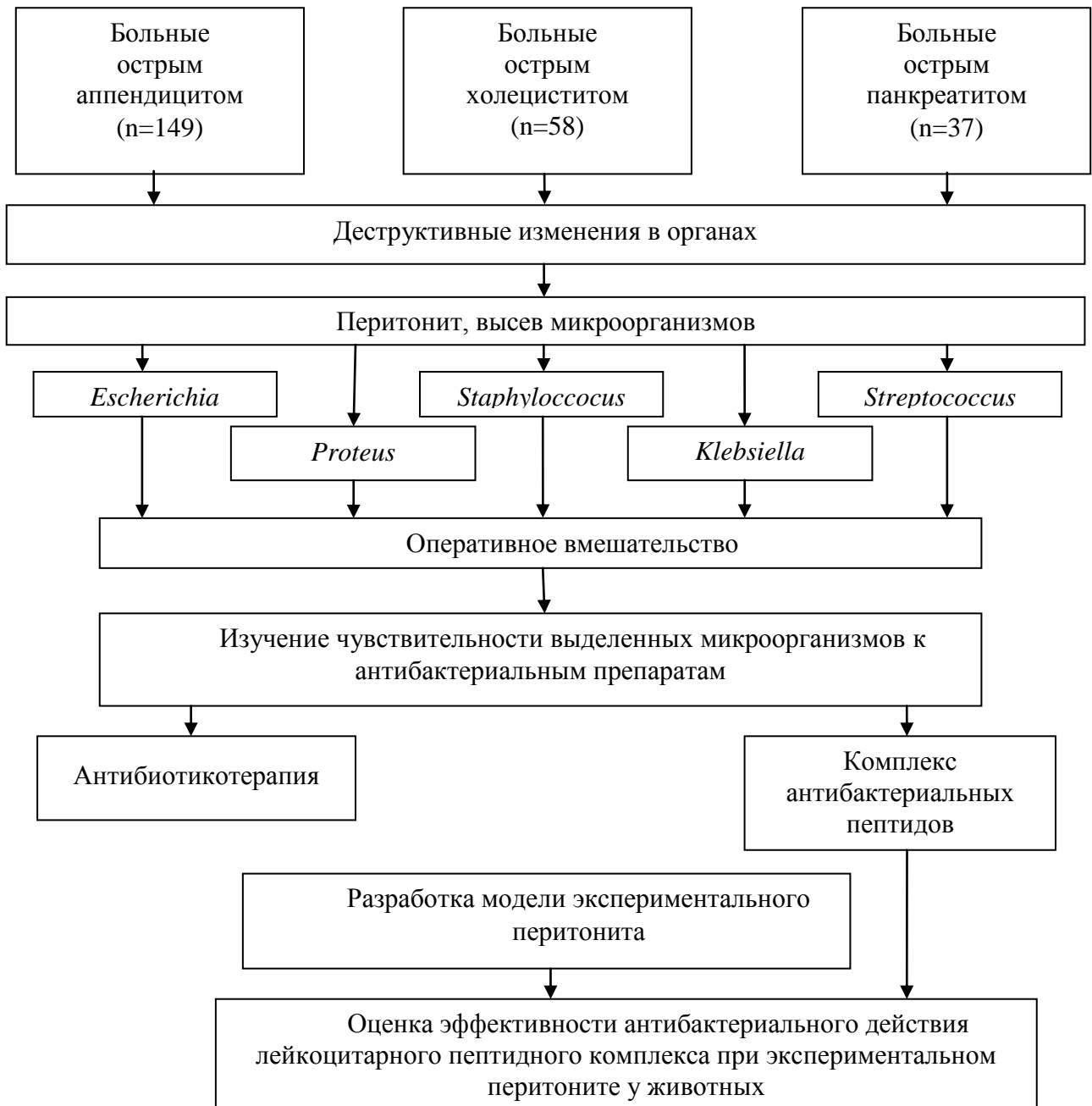


Рис. 1. Дизайн исследований

Исходя из формулировок клинических диагнозов, все больные были разделены на три группы: первую составили 149 больных острым аппендицитом,

вторую – 58 больных острым холециститом и третью – 37 больных острым панкреатитом. Набор больных проводился методом случайной выборки по мере поступления.

Основными клиническими и лабораторными методами при обследовании больных были:

1. Изучение анамнеза и результатов объективного обследования.
2. Изучение динамики показателей периферической крови проводили с определением уровня гемоглобина (г/л), эритроцитов ($\times 10^{12}$ /л), лейкоцитов ($\times 10^9$ /л), лейкоформулы капиллярной крови (%) и скорости оседания эритроцитов (мм/ч).

3. Определение биохимических показателей сыворотки крови включало: исследование концентрации общего белка биуретовым методом (г/л), активности ферментов аспартатаминотрансферазы (АСАТ), аланинаминотрансферазы (АЛАТ) и амилазы, а также изучение концентрации креатинина по цветной реакции Яффе (Е.А. Кост, 1964).

4. Анализ штаммов микроорганизмов, выделенных от больных, проводили по следующей методике: биологический материал засеивали на чашки Петри с 5% кровяным агаром, на среду Сабуро и сахарный бульон. Посев на чашки Петри с агаром проводили методом "тампон-петля": тампоном проводили "дорожку" по диаметру чашки, затем другой стороной тампона в обратном направлении засеивали еще одну "дорожку", параллельную первой. После этого материал рассеивали по чашкам при помощи петли штрихами, перпендикулярными "дорожкам". Такой посев позволяет достаточно эффективно выделить микроорганизмы в виде отдельных колониеобразующих единиц даже из ассоциации микроорганизмов.

Идентификацию выделенных чистых культур *S. aureus* проводили при помощи системы для дифференциации микроорганизмов рода *Staphylococcus* «ПБДС» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород).

Препарат комплекса антибактериальных пептидов, синтезируемых вирусиндуцированными лейкоцитами человека, состоит из пептидов с молекулярной массой 1296,8 – 1673,11 Да, клиническая эффективность которого была установлена в рамках настоящего исследования, был получен в филиале ФГУП МЗ РФ НПО «Микроген» «Пермское НПО Биомед» (Волкова Л.В. и соавт., 2004).

Антибактериальное действие катионного пептидного комплекса на штаммы бактерий, выделенных от больных абдоминальной хирургической инфекцией, определяли микрометодом серийных разведений (В.П. Коробов и др., 1988).

Изучение эффективности лечебного действия пептидного комплекса проведено в 2013–2014 гг. на разработанной экспериментальной модели острого перитонита с использованием 96 животных – нелинейных белых крыс (самцов и самок) четырехмесячного возраста (масса тела 200-235 г.) Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г., N 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных

научных целях от 18.03.1986 г.» на базе ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Для моделирования экспериментального перитонита заражение животных осуществляли путем интраперитонеального введения микробных суспензий бактерий: *E. coli* (10 штаммов) и *S. aureus* (5 штаммов), в концентрации 10^5 КОЕ/мл, выделенных из экссудатов больных абдоминальной инфекцией с диагнозом «перитонит», входящих в клиническую выборку.

Идентификацию культур *E. coli* проводили с помощью системы для дифференциации микроорганизмов семейства энтеробактерий «ЭНТЕРОтест 24» («Diagnostica s.r.o.», PLIVA-Lachema, Чехия).

У экспериментальных животных до начала и по окончании исследований определяли лейкоцитарную формулу, относительное содержание клеток в мазке и их абсолютные значения.

Статистические исследования

Для оценки клиничко-лабораторных и бактериологических показателей применялись методы вариационной статистики. Определяли следующие величины: среднюю арифметическую (M), относительный показатель в % (P) и сравнение двух величин по t-тесту Стьюдента с определением вероятности различий - p. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью персонального компьютера с использованием стандартного пакета прикладных программ для «Microsoft-Excel», версия 7,0 для Windows 2000, Biostat.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты клинического обследования пациентов

Гендерная характеристика пациентов выявила, что среди больных острым аппендицитом доля мужчин оставила 54,36%, а женщин – 45,64%, острым холециститом – соотношение мужчин и женщин было равным, а при остром панкреатите – 70,3% мужчин и 29,7% женщин. Острый аппендицит наиболее часто выявлялся в возрасте от 16 до 30 лет, острый холецистит – от 60 до 70 лет, а острый панкреатит – от 40 до 50 лет. В первые сутки от начала заболевания было госпитализировано 65,3% острым аппендицитом, на 2-4-е сутки – 36,84%, острым холециститом – 26,1 и 52,1% соответственно. Сроки поступления в клинику больных острым панкреатитом варьировали от одних суток до двух недель от начала заболевания, но преобладающими были 2-4 и 5-7 сутки.

Учитывая, что в диагностике острого аппендицита, острого холецистита и острого панкреатита определяющими являются локализация и характер болей, а также данные объективного обследования пациентов, нами проведен их скрининг. Показано, что больные острым аппендицитом отмечали боли в животе в 100% наблюдений, тошноту – в 63,26% и слабость – в 53,06%. Менее часто они отмечали сухость во рту – 22,44%, повышение температуры тела – 18,36%, жидкий стул – 12,24% и рвоту – 6,12%. Из местных симптомов обращали на себя внимание положительные симптомы Ровзинга, Ситковского, Бортемье-Михельсона, Воскресенского, Щеткина-Блюмберга и др.

Больные острым холециститом предъявляли жалобы на боли в животе в 95,65% случаев, тошноту – в 86,95%, сухость во рту в 56,52%, слабость – в 47,82% и повышение температуры тела – в 17,39%. Рвота и желтушность кожи и склер встречались с одинаковой частотой, составлявшей 13,04%. Среди местных симптомов положительными были симптомы Ортнера, Кера, Мерфи, Мюсси-Георгиевского, Щеткина-Блюмберга и др.

В качестве преобладающих симптомов у больных с острым панкреатитом регистрировали боли в животе – в 100% наблюдений, слабость – в 46,66%, тошноту – в 40%, рвоту – в 33,33% и сухость во рту – в 13,33%. При объективном обследовании были выявлены положительные симптомы Мондора, Грея-Тернера, Грюнвальда, Мейо-Робсона, Керте, Воскресенского, Щеткина-Блюмберга и др.

В соответствии с существующими медико-экономическими стандартами диагноза острого аппендицита, острого холецистита и острого панкреатита были подтверждены лабораторными исследованиями. При остром аппендиците исходно лейкоцитоз ($11,7 \pm 0,65 \times 10^9/\text{л}$) выявлен у 97,36% пациентов, а при остром холецистите и остром панкреатите он отмечен в 100% наблюдений. Аналогичная закономерность выявлена и при исследовании сдвига в лейкоцитарной формуле. Увеличение содержания палочкоядерных форм нейтрофилов выше 5% было выявлено у 86-100% пациентов всех групп со статистически значимыми колебаниями между ними ($p < 0,05$).

Увеличение СОЭ до 30 мм/ч и выше встречалось при остром аппендиците в 55,26% случаев, при остром холецистите – в 46,66%, при остром панкреатите в – 33,33%.

В то же время, относительно колебаний уровня эритроцитов, гемоглобина и общего белка в периферической крови не было установлено какой-либо определенной закономерности ($p > 0,05$).

В сыворотке крови больных острым холециститом отмечалось повышение содержания креатинина до $122,6 \pm 12,62$ мкмоль/л, АлАТ – до $56,64 \pm 13,93$ Ед/л и билирубина – до $26,6 \pm 6,15$ мкмоль/л. При остром панкреатите наблюдалось возрастание уровня амилазы до $213,5 \pm 39,47$ ед/л и глюкозы – до $6,9 \pm 2,14$ ммоль/л. У больных острым аппендицитом эти показатели не претерпевали существенных изменений ($p > 0,05$).

Для повышения информативности исследований, снижения диагностических ошибок и уменьшения количества необоснованных оперативных вмешательств по показаниям применяли экстренные ультразвуковые исследования УЗИ, а также КТ, МРТ и диагностическую лапароскопию.

УЗИ при остром холецистите позволили выявить утолщение стенок желчного пузыря у 98,27% пациентов, деформацию органа – у 84,48%, инфильтрацию околопузырной ткани – у 87,93%, застой желчи у – 70,68%, наличия конкрементов – у 81,03%.

Информативность УЗИ при остром панкреатите составила 93,32%, а КТ и МРТ достигала 100%. Следует особо отметить, что информативность диагностической лапароскопии при изучаемых острых хирургических заболеваниях является абсолютной.

Таксономическая принадлежность выделенных бактериальных культур и их чувствительность к антибиотикам

Для правильной поставки диагноза и эффективного лечения пациентов особое внимание уделялось результатам микробиологических исследований экссудатов (рис. 2). В процессе исследования микрофлоры пациентов при остром аппендиците высеяно 249 штаммов различных бактерий. Они были представлены, в основном, штаммами *Escherichia* – 30,52%, *Staphylococcus* – 20,08%, *Streptococcus* – 16,46%, *B. fragilis* – 14,85%, *Pseudomonas aeruginosae* – 9,23% и др. Частота выявления смешанных инфекций составляла – 46,98%.

Диагноз острого холецистита был поставлен 58 пациентам, из них только у 29 была выявлена бактериальная монокультура. Частота выявления монокультур составила 50,0%, как и смешанной инфекции – 50,0%. При остром холецистите было выделено 106 штаммов микроорганизмов. Среднее количество высеваемых культур на одного больного составляло 1,82. Ведущее место среди возбудителей занимали микроорганизмы вида *Escherichia coli* (53,77%), родов *Streptococcus* – (17,92%), *Staphylococcus* – (16,98%), а также вида *Bacteroides fragilis* – (4,71%).

При анализе распределения микрофлоры у больных острым панкреатитом было установлено, что среди 37 пациентов наблюдалось выделение монокультуры в 19 случаях, что составило 51,35%. Частота выделения смешанной инфекции равнялась 48,65%. При остром панкреатите было высеяно 63 штамма микроорганизмов. Среднее количество высеваемых культур на одного больного составляло 1,70. Наиболее часто высевались микроорганизмы родов *Streptococcus*. – (33,33%), *Escherichia* – (30,15%) и *Staphylococcus* – (19,04%).

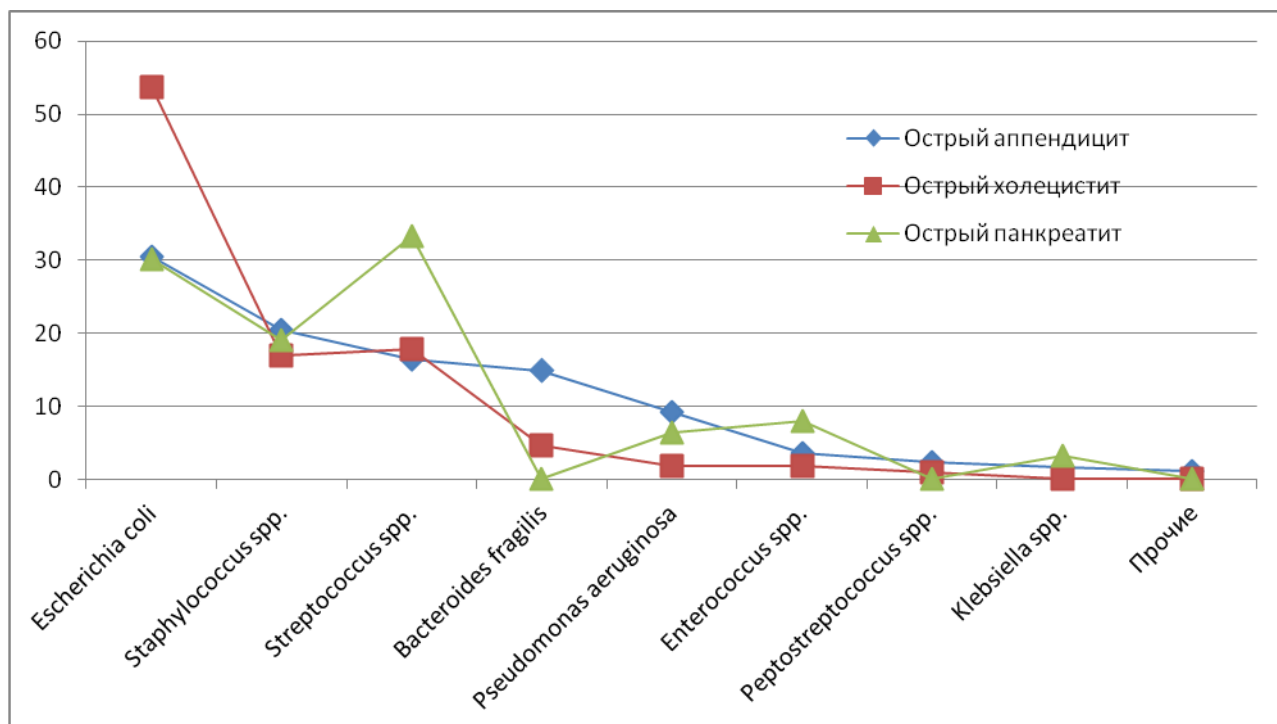


Рис. 2 Выявляемость патогенной микрофлоры при абдоминальных инфекциях, %

Проведенный микробиологический анализ свидетельствует о том, что наиболее часто из экссудатов больных абдоминальной инфекцией высеваются бактерии вида *E. coli*. Доля этих бактерий в структуре абдоминальных микроорганизмов составляет не менее 36,36%. Значимыми в этиологическом плане являются также микроорганизмы родов *Streptococcus* (19,37%) и *Staphylococcus* (19,13%).

Следующим этапом исследований явилось сравнительное изучение чувствительности штаммов бактерий, изолированных из операционного поля пациентов с абдоминальной инфекцией, к наиболее широко применявшимся в 2008 г. и 2012 г. антибиотикам: амикацину, амоксиклаву, гентамицину, цефоперазон-сульбактаму, цефотаксиму, цефтазидиму, ципрофлоксацину, ампициллину, линкомицину, эритромицину, ванкомицину, оксациллину, левомицетину и левофлоксацину. Всего было изучено 123 бактериальных штамма, выделенных из абдоминальных экссудатов наблюдаемых больных: 52 штамма относились к виду *Escherichia coli* и родам *Staphylococcus* 35 – и *Streptococcus* – 36 (рис. 3).

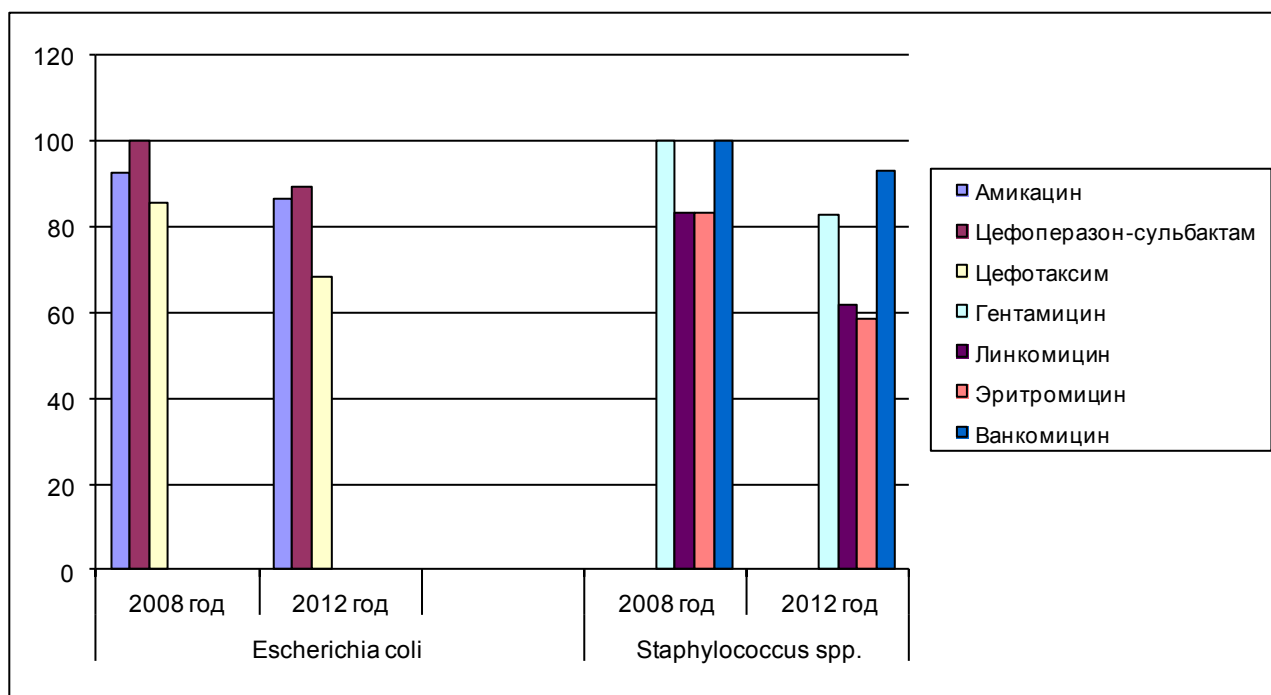


Рис.3. Сравнительная оценка эффективности действия антибиотиков на патогенные штаммы бактерий *Escherichia u Staphylococcus*

Определение антибиотикочувствительности выделенных бактериальных штаммов показало, что в настоящее время подобрать «универсальный» антибиотик, который бы мог служить эффективным средством антимикробной терапии абдоминальной инфекции, крайне сложно. Так, бактерии *Escherichia coli*, наиболее чувствительны к цефоперазон-сульбактаму и амикацину, а рода *Staphylococcus* к гентамицину и ванкомицину. Поэтому проблема поиска новых эффективных и нетоксичных антибактериальных препаратов для лечения инфекций при абдоминальной патологии стоит достаточно остро.

Изучение антимикробного действия лейкоцитарного пептидного комплекса на экспериментальной модели животных

Как представлено на рис. 4, к антибактериальному действию пептидного комплекса оказалось чувствительно большинство протестированных штаммов микроорганизмов. Характерно, что для ингибирования роста большинства исследованных бактериальных штаммов достаточно действия АБПК в концентрации 2000 УЕ/мл. Наибольшая чувствительность всех выделенных бактерий к компонентам пептидного комплекса отмечалась при более высоких его концентрациях. Известно, что катионные антибактериальные пептиды более активны в отношении грамположительной, нежели грамотрицательной микрофлоры (В.Н. Кокряков, 1999). В наших исследованиях эта закономерность проявлялась лишь частично (рис. 4).

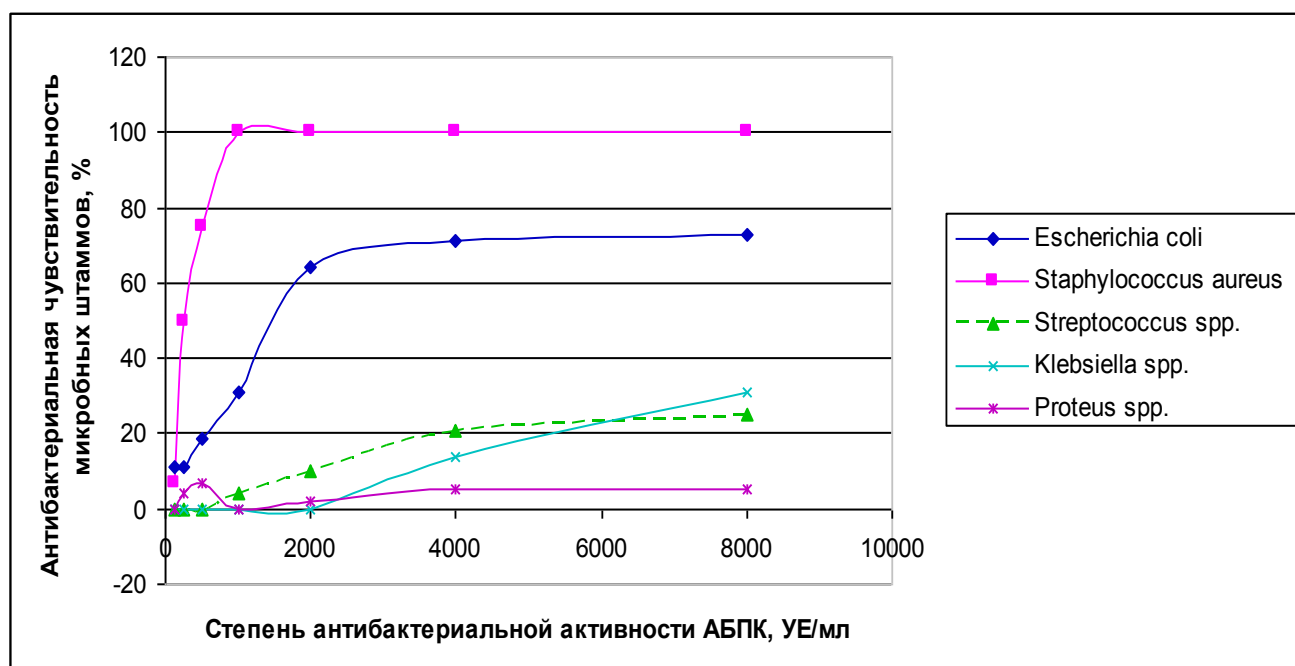


Рис. 4. Антибактериальная чувствительность к комплексу лейкоцитарных пептидов микробных штаммов, выделенных от больных абдоминальной инфекцией при содержании микробных клеток в среде инкубации в количестве 1×10^6

Так, большинство исследованных штаммов *Escherichia coli*, выделенных при абдоминальных инфекциях, оказались менее чувствительны к пептидному комплексу. Очевидно, что для полного (100%) подавления роста микроорганизмов, выделенных из экссудатов больных с абдоминальной хирургической инфекцией, обусловленной бактериями рода *Staphylococcus*, необходимы концентрации пептидного комплекса более 1000 УЕ/мл, в то время, как подавление развития инфекции, вызванной *Escherichia coli*, может быть достигнуто при значительно больших концентрациях пептидного препарата 4000-8000 УЕ/мл (рис. 5).

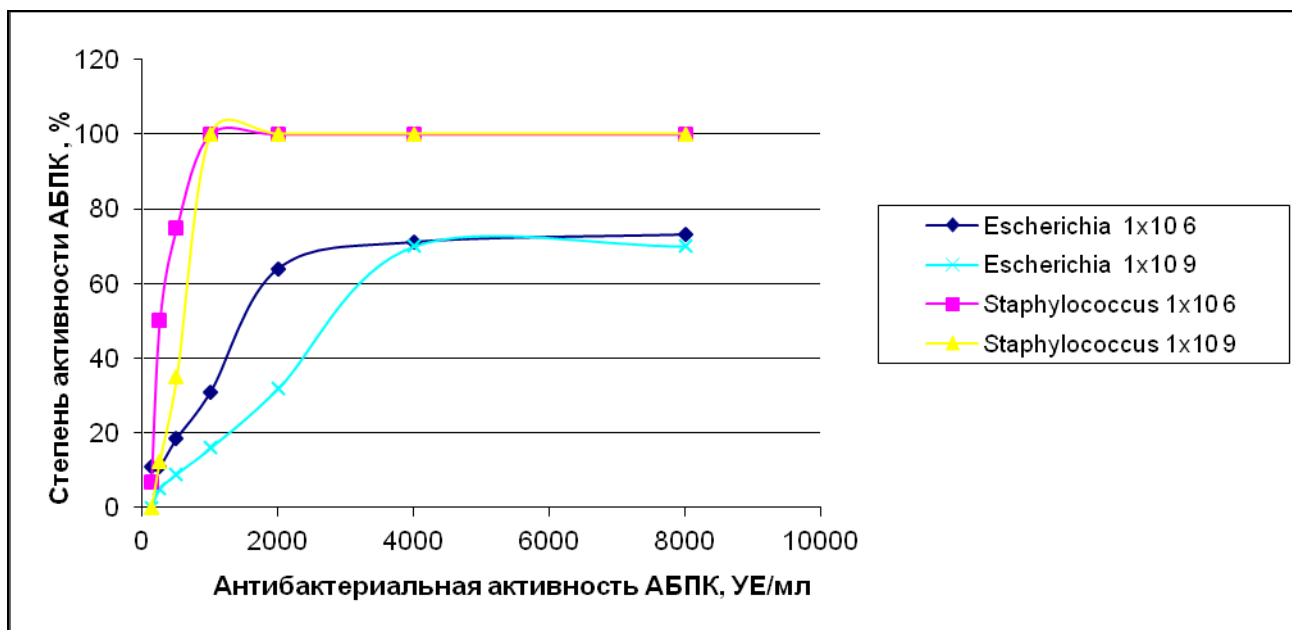


Рис.5. Сравнительный анализ чувствительности к АБПК бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia* при концентрациях 1×10^6 и 1×10^9 микроб. клеток/мл

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что наиболее часто встречающиеся представители патогенной микрофлоры при абдоминальной инфекции, такие как бактерии вида *Escherichia coli* и рода *Staphylococcus*, обладают чувствительностью к катионному пептидному комплексу в 100% случаев, но различаются степенью ее проявления.

Создание модели острого перитонита с учетом микробного пейзажа абдоминальных инфекций

Доклиническое изучение и апробация новых методов оценки эффективности разрабатываемых антибактериальных препаратов является актуальной проблемой настоящего времени. Согласно данным литературы, существует несколько моделей острого перитонита, обусловленного введением в брюшную полость экспериментальных животных вирулентных бактериальных штаммов.

Нами предпринята попытка создания модели экспериментального перитонита путем введения взвесей смешанных культур бактерий, выделенных от больных абдоминальной инфекцией.

Моделирование перитонита осуществляли следующим образом. Все животные (белые крысы) были разделены на 8 групп по 12 животных в каждой. Животному однократно под легким эфирным наркозом интраперитонеально вводили свежеприготовленную суспензию смеси бактериальных культур *Escherichia coli* (75%) и *Staphylococcus spp.* (25%), изолированных из брюшной полости пациентов с клинической картиной перитонита, подтвержденного лабораторными данными, в суммарной дозе от 2×10^9 до 8×10^9 микр. тел на 100 г массы животных. Контрольной группе вводили питательную среду, на которой культивировали микроорганизмы из расчета суммарного объема до 2 мл на 100 г массы животного.

Результаты этих экспериментов показали, что разработанная нами модель острого разлитого перитонита у крыс путем инфицирования введением в брюшную полость взвеси микробных культур родов *Escherichia* и *Staphylococcus*, выделенных от больных с острым аппендицитом, отличающаяся тем, что в брюшную полость вводят микроорганизмы родов *Escherichia* – $4,5 \times 10^9$ клеток /мл и *Staphylococcus* – $1,5-10 \times 10^9$ клеток/мл на 100 г массы крысы в объемах от 1,0-3,0 мл с одновременным введением культуральной среды в объеме не более 2,0 мл, может быть использована для оценки клинической эффективности исследуемого препарата. Таким образом, нами разработан новый способ моделирования острого перитонита у экспериментальных животных с использованием взвеси микробных культур, выделенных от больных острым аппендицитом, и оформлена заявка на Патент РФ № 2015111066 от 26.03.2015 г.

Определение клинической эффективности АБПК на модели экспериментальных инфекций у животных явилось одной из главных задач работы. Для изучения эффективности АБПК (4000 УЕ/мл) *in vivo* было проведено сравнение различных способов его введения, в том числе, внутримышечное, комплексное внутримышечное с внутриабдоминальным, а также внутриабдоминальное. Введение АБПК начинали на вторые сутки после подтверждения диагноза перитонита на вскрытии выводимых из эксперимента животных.

Изучение влияния АБПК на динамику массы тела опытных и экспериментальных животных показало, что на вторые сутки после инфицирования состояние всех экспериментальных животных ухудшалось: животные лежали, были вялыми, плохо пили воду и отличались тусклостью шерсти у отдельных животных. При взвешивании у всех животных выявлялось снижение массы тела в сравнении с исходными данными: у I группы животных исходный вес составлял $229 \pm 3,8$ г, на вторые сутки $197 \pm 1,3$ г; у II и III групп аналогично: $229 \pm 3,8$ г и $199 \pm 3,1$ г; $228 \pm 3,4$ г и $200 \pm 3,1$ г.

Независимо от способа введения АБПК на четвертые сутки экспериментов у животных отмечалось улучшение общего самочувствия, все животные становились подвижными, активно поедали корм. Масса тела крыс 2–4 групп постепенно начинала возвращаться к исходным величинам. В ходе исследований было установлено, что животные, которым вводился АБПК, независимо от способа введения, хорошо переносили его введение.

Учитывая, что лейкоцитоз является одним из главных определяющих факторов воспаления, нами была проведена оценка общего количества лейкоцитов в крови животных, в ходе эксперимента. Полученные результаты представлены в табл. 1. В динамике лечения АБПК общее количество лейкоцитов у всех экспериментальных крыс закономерно снижалось. Так, с момента инфицирования количество лейкоцитов крови крыс I группы увеличилось с $13,6 \pm 0,77 \times 10^9$ /л до $16,1 \pm 0,69 \times 10^9$ /л. В тоже время, начиная с 4-х суток наблюдений, у крыс III группы количество лейкоцитов снизилось до $11,4 \pm 0,47 \times 10^9$ /л, а к 8 сут – до $8,3 \pm 0,45 \times 10^9$ /л. Во все сроки наблюдения общее количество лейкоцитов в крови крыс III группы было статистически ниже, чем у животных II и IV групп.

Содержание лейкоцитов в периферической крови экспериментальных животных ($M \pm m$)

| Группы экспериментальных животных | Количество лейкоцитов в крови у животных в течение всего эксперимента, 10^9 /л | | | |
|--|--|-----------------|----------------|-----------------|
| | I | II | III | IV |
| Исходные данные (до начала эксперимента) | 7,7 ± 0,61 | 7,9 ± 0,53 | 7,4 ± 0,73 | 7,2 ± 0,46 |
| 2-е сутки эксп. | 13,6 ± 0,77 | 12,8 ± 0,63** | 12,5 ± 0,61** | 12,6 ± 0,66# |
| 4-е сутки эксп. | 15,1 ± 0,73 | 12,2 ± 0,14*,** | 11,4 ± 0,47*,# | 11,9 ± 1,56*,** |
| 6-е сутки эксп. | 16,1 ± 0,69 | 11,7 ± 0,46# | 11,1 ± 0,38*,# | 11,1 ± 0,37# |
| 8-е сутки эксп. | гибель | 9,0 ± 0,88 | 8,3 ± 0,45 | 9,1 ± 0,24 |

Примечание: * – различие достоверно ($p < 0,05$) с исходными данными внутри группы; ** – различие достоверно ($p < 0,05$) с контрольной группой; # – различие достоверно ($p < 0,005$) с контрольной группой.

Проведенные экспериментальные исследования показали эффективность подавления перитонита введением лейкоцитарного пептидного комплекса.

Таким образом, полученные данные позволяют констатировать выраженную терапевтическую эффективность низкомолекулярного пептидного комплекса, синтезируемого лейкоцитами человека в процессе интерферонотенеза, при лечении экспериментального перитонита у животных.

Выводы

1. Превалирующими в микробном пейзаже больных абдоминальной хирургической инфекцией в условиях многопрофильного стационара являются бактерии родов *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.*, доля которых в структуре микроорганизмов, выделяемых из брюшной полости при этих состояниях, составляет не менее 36,36%, 19,37 и 19,13% соответственно.

2. Показано, что с 2008 г. по 2012 г. произошло снижение чувствительности к антибиотикам *Escherichia coli* на 7,32%, *Staphylococcus spp.* – на 14,37% и *Streptococcus spp.* – на 26,23%.

3. Установлена антибактериальная чувствительность комплекса низкомолекулярных лейкоцитарных пептидов в отношении родов *Escherichia* и *Staphylococcus*, выделенных из экссудатов больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом.

4. Разработанная оригинальная экспериментальная модель острого разлитого перитонита позволяет проводить оценку эффективности различных антимикробных препаратов.

5. Препарат комплекса низкомолекулярных антибактериальных пептидов, выделяемых лейкоцитами человека, обладает высокой антимикробной активностью и клинической эффективностью, проявляющейся в снижении симптомов интоксикации и летальности при экспериментальном перитоните.

Практические рекомендации

1. Для эффективного лечения острых хирургических заболеваний органов брюшной полости необходима идентификация микроорганизмов из экссудата очага воспаления и определение их чувствительности к антибиотикам.
2. При назначении антибиотикотерапии следует учитывать, что бактериальные монокультуры выделяются у 51,35%, а смешанная микрофлора – у 48,65% пациентов.
3. Для оценки эффективности способов лечения перитонита в эксперименте мы рекомендуем простую модель воспроизводства патологического процесса с использованием взвеси микробных культур, выделяемых из экссудата больных перитонитом.
4. Низкомолекулярные пептидные соединения, выделяемые лейкоцитами в процессе интерферогенеза, обладают выраженной терапевтической эффективностью при экспериментальном перитоните и могут быть рекомендованы для разработки рекомендаций по их клиническому использованию.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Биологические свойства нового низкомолекулярного пептидного комплекса, ассоциированного с процессом интерферогенеза // Гужева Л.Б., **Волков А.Г.**, Артющкин М.В., Ерошенко Д.В., Коробов В.П.- Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. – № 4/1. – С. 131 – 132.
2. Антимикробные препараты при лечении абдоминальных хирургических инфекций // Заривчацкий М.Ф., **Волков А.Г.**, Коробов В.П.- Пермский медицинский журнал. – 2013. – №2, Т.30. – С. 130 – 140.
3. Микробный пейзаж абдоминальных хирургических инфекций у больных многопрофильного стационара // **Волков А.Г.**, Заривчацкий М.Ф. Пермский медицинский журнал. – 2014. – №1, Т.31. – С.53 – 57.

Публикации в других журналах и сборниках

4. Антибактериальный комплекс – побочный продукт интерферонгенеза // **Волков А.Г.**, Коробов В.П. Международная конференция "Биология – наука XXI века". – Тез. докл. – Москва, 2012. – С.168.
5. Опыт получения низкомолекулярного пептидного комплекса // **Волков А.Г.** 17 – я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "БИОЛОГИЯ-НАУКА XXI ВЕКА". – Тез. докл. – Пущино, 2013. – С.329.
6. Микробный пейзаж у больных с абдоминальной хирургической инфекцией // **Волков А.Г.** 51-ая международная научная студенческая конференция "Студент и научно-практический прогресс". – Тез. докл. – Новосибирск, 2013. – С.61.
7. Антибактериальное действие низкомолекулярного пептидного комплекса из лейкоцитов человека в отношении условно-патогенных микроорганизмов – возбудителей абдоминальных инфекций человека // **Волков А.Г.**, Косарева П.В. X mezinárodní vědecko – praktická konference – Praha, 2014. – С.7 – 11.
8. Оценка биологических свойств пептидов, синтезируемых в процессе интерферонгенеза // Гришина Т.А., Волкова Л.В., **Волков А.Г.** XVII региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология-2015». – Тез. докл. – Пермь, 2015 – С.134 – 136.
9. Антибактериальное действие лейкоцитарного пептидного комплекса на культуры микроорганизмов, выделенных от больных абдоминальной хирургической инфекцией. // **Волков А.Г.**, Гришина Т.А. II Международная научно-практическая конференция «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития». – Уфа, 2015. – С. 139 – 141.
10. Низкомолекулярные катионные пептиды лейкоцитов, индуцированные различными антигенами // Волкова Л.В., Гришина Т.А., **Волков А.Г.** Ж. «Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология». – Пермь, 2015. – С. 35 – 48.

Заявки на патенты РФ

1. Заривчацкий М.Ф., **Волков А.Г.**, Волкова Л.В., Коробов В.П., Косарева П.В., «Способ моделирования острого перитонита у крыс» (Заявка № 2015111066 от 26.03.2015).
2. Заривчацкий М.Ф., **Волков А.Г.**, Волкова Л.В., Коробов В.П., Косарева П.В., «Способ профилактики спонтанно возникающего острого перитонита у экспериментальных животных» (Заявка № 2015150010 от 20.11.2015).

Список сокращений

| | |
|------|--|
| АБПК | - антибактериальный пептидный комплекс |
| Да | - дальтон, единица молекулярной массы |
| ж | - женщины |
| ИРЛ | - интерфероновая реакция лейкоцитов |
| ИФН | - интерферон |
| ИОХВ | - инфекционные осложнения хирургических вмешательств |
| КТ | - компьютерная томография |
| КОЕ | - колониеобразующие единицы |
| м | - мужчины |
| МЕ | - международные единицы |
| МРТ | - магнитно-резонансная томография |
| МЭС | - медико-экономические стандарты |
| НПО | - научно-производственное объединение |
| ОРИТ | - отделение реанимации и интенсивной терапии |
| ОЭП | - острый экспериментальный перитонит |
| СОЭ | - скорость оседания эритроцитов |
| УЕ | - условные единицы |
| УЗИ | - ультразвуковое исследование |
| ЧЛИ | - человеческий лейкоцитарный интерферон |