

Дослідження динаміки накопичення антимікробних лікарських засобів у вогнищі запалення при експериментальній абдомінальній інфекції, спричиненій *Streptococcus pyogenes*

А.Я. ЦИГАНЕНКО, академік, д. мед. н., професор; Ю.В. ПАЩЕНКО, д. мед. н., професор;
М.М. МІШИНА, к. мед. н., доцент; К.Ю. ПАЩЕНКО; Ю.М. МІШИН

/Харківський національний медичний університет/

Резюме

Исследование динамики накопления антимикробных лекарственных средств в очаге воспаления при экспериментальной абдоминальной инфекции, вызванной *Streptococcus pyogenes*

А.Я. Цыганенко, Ю.В. Пащенко, М.М. Мишина, К.Ю. Пащенко, Ю.М. Мишин

Изучено влияние диадинамофореза (ДДФ) на физико-химические и биологические свойства противомикробных средств, получена возможность выбора адекватного антимикробного воздействия на воспалительный процесс с учетом патологической контаминации и чувствительности микроорганизмов к указанным препаратам. Доказано, что применение способа накопления лекарственных препаратов в очаге воспаления снижает риск инфицирования брюшной полости, что в определенной мере является противомикробной профилактикой при воспалительных процессах брюшной полости.

Ключевые слова: диадинамофорез, противомикробные средства, абдоминальная инфекция, *Streptococcus pyogenes*

Summary

The Study of the Dynamics of Accumulation of Antimicrobial Drugs in the Inflammation in Experimental Abdominal Infection Caused by *Streptococcus Pyogenes*

A.Ya. Tsyganenko, Yu.V. Pashchenko, M.M. Mishina, K.Yu. Pashchenko, Yu.M. Mishin

The influence of diadinamophoresis on the physicochemical and biological properties of antimicrobial agents was studied, were able to choose an adequate antimicrobial effect on the inflammatory process in the light of pathological contamination and the susceptibility of microorganisms to these drugs. Proved that the use of a process of accumulation of drugs in the inflammation reduces the risk of infection of the abdominal cavity, which to some extent is the antimicrobial prophylaxis of inflammatory processes of the abdominal cavity.

Key words: DDP, anti-microbial agents, abdominal infection, *Streptococcus pyogenes*

Антибактеріальна терапія є одним із найважливіших розділів комплексного лікування перитонітів. Традиційні шляхи введення антибіотиків (внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний) мають суттєві недоліки, пов'язані з важкими порушеннями мікроциркуляції в органах і тканинах черевної порожнини при поширених формах перитоніту. Крім того, симптоматична гіпопротеїнемія, в свою чергу, також порушує транспорт антибіотиків у тканини [1, 3, 8, 10, 18]. Це у значній мірі ускладнює доставку антибіотиків у вогнище запалення, не дозволяючи утворювати в ньому достатньо високі концентрації.

Одним із резервних шляхів підвищення концентрації антибіотиків у тканинах є спосіб внутрішньотканинного діадинамофорезу (ДДФ), що був розроблений В.Б. Давиденком у 1994 році. Цей спосіб також сприяє покращенню трофіки, видаленню продуктів метаболізму з патологічного осередку, чинить протизапальну дію, знижує резистентність мікрофлори до антибіотиків [22], сприяє нормалізації секреторної і моторної функції органів травлення [5, 7, 9, 20]. При ньому один із електродів розміщується у просвіті кишечника, а другий розташовується циркулярно навколо тулуба в області передньої черевної стінки, при цьому внутрішньооче-

реальні органи знаходяться у міжелектродному просторі. За рахунок електроелімінації препаратів із руслу кровообігу концентрація лікарських засобів у міжелектродному просторі зростає у декілька разів, а також суттєво подовжується час фіксації антибіотиків у тканинах. Цей спосіб за ефективністю достовірно відрізняється від звичайного внутрішньовенного введення препарату [14].

Невелика кількість робіт, присвячених вивченню можливості селективного накопичення лікарських препаратів у вогнищі запалення при абдомінальній інфекції за допомогою внутрішньотканинного ДДФ, спонукає до проведення досліджень у цьому напрямку. В умовах зростання резистентності мікрофлори, котра призводить до розвитку внутрішньоочеревних ускладнень гнійного характеру, пошук резервних шляхів доставки протимікробних препаратів у зону ураження є актуальною метою вдосконалення способів протимікробної терапії.

У зв'язку з вищевикладеним, метою цього розділу досліджень є: вивчення впливу внутрішньотканинного ДДФ на динаміку накопичення антимікробних препаратів у вогнищі гнійного ураження при перитоніті.

Матеріали та методи дослідження

Матеріал збирали та доставляли в лабораторію згідно з вимогами забору і доставки матеріалу для мікробіологічних досліджень, запропонованих медичною академією післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика. Мікробіологічне дослідження включало виділення та ідентифікацію вилучених мікроорганізмів за допомогою загальноприйнятих в мікробіології методів [2, 15]. Ідентифікацію ізолятів проводили за допомогою наборів Мікро-Ла-Тест® (Enterotest, Anaerotest, Staphytest, Streptotest, Nefermtest), що призначені для вивчення біохімічних властивостей мікроорганізмів із використанням мікротестів й дозволяють швидко провести ідентифікацію більшості клінічно важливих штамів.

Інтерпретацію, аналіз й оцінку результатів проводили за допомогою «ВАСТ-програми» АТ «Аналітика» (м. Москва) автоматично на рідері «Multiskan EX» (тип 355), що є фотометром зі змінними фільтрами, котрий здатен проводити стандартні фотометричні вимірювання.

Визначення антибіотикорезистентності виділених культур до хіміотерапевтичних препаратів проводилось за допомогою стандартних дисків та мікротест-систем «ТПК» [13, 19, 21].

Визначення субпопуляцій T- та B-лімфоцитів проводили із застосуванням моноклональних антитіл у реакції мембранної імунофлюоресценції – CD3+, CD4+, CD5+, CD8+, CD11b, CD18+, CD19+, CD22+. Визначення рівнів цитокінів та IgA та IgM – методом твердофазного імуноферментного аналізу [4, 6].

Для статистичної обробки результатів застосовували загальноприйняті формули. Були використані методи параметричної статистики з урахуванням середньої арифметичної, стандартної помилки й показників достовірності. Результати оброблені з використанням пакету статистичних програм за допомогою персонального комп'ютера й з використанням методів варіаційної статистики [11].

Результати та їх обговорення

У своїй роботі ми використовували діадинамічні струми. Суть методу полягає у впливі на тканини організму імпульсними струмами низької частоти. Для запобігання адаптації до них тканин було запропоновано декілька різновидів струму з послідовним чергуванням частот у 50 і 100 Гц, що змінюються за тривалістю імпульсу та пауз, а також форми імпульсу.

Ми використовували двонапівперіодний безперервний струм із частотою 100 Гц, тривалістю імпульсу 10 мс, що має гальванічну складову, високий анальгезуючий, вазоактивуючий, вібраційний та міотонізуючий вплив, а також найбільш високий коефіцієнт електрофоретичної активності [12, 20].

При внутрішньотканинному ДДФ внутрішньовенно вводили лікарський препарат гатіфлоксацин (Бігафлон, ТОВ «Юрія-Фарм», м. Київ, Україна) і цефепім (Цефепім, ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна), а після досягнення максимальної концентрації його у крові здійснювали поперечну гальванізацію, при розташуванні патологічного вогнища у міжелектродному просторі.

Модельовання стрептококового (*S. pyogenes*) перитоніту проводили на кролях [16], які знаходилися в умовах стандартного лабораторного утримання та раціону харчування. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною або іншою метою» [23].

Операції виконували в експериментальній операційній біологічній клініці ЦНДЛ ХНМУ. Операція проводилась під загальним знеболюванням шляхом внутрішньовенного введення кетаміну (5–7 мг/кг), тіопенталу натрію (5–8 мг/кг), натрію оксидитрату (20–40 мг/кг), метамізола натрію (0,5 мл 50% розчину). Премедикацію здійснювали за допомогою розчину атропіну та дифенгідраміну в дозі, розрахованій відповідно до маси тіла тварини. Вступний наркоз здійснювали за допомогою внутрішньом'язового введення розчину кетаміну (7–10 мг/кг) і тіопенталу натрію (15–20 мг/кг) [17].

Після вступного наркозу кроля розміщали на операційному столі в положенні лежачи на спині, кінцівки фіксували, у крайову вену вуха встановлювали внутрішньовенний катетер типу венфлон, наркоз поглиблювали. Операційне поле на передній черевній стінці та зону накладення на шкірних електродів (спина, живіт) ретельно виголювали та обробляли розчинами антисептиків (повідон-йод). Через окремий розріз передньої черевної стінки проводився кишковий зонд з електродом для ДДФ. Зонд з електродом виводили через окремий боковий розріз та фіксували до шкіри. Внутрішньотканинний ДДФ проводили, використовуючи апарат «Тонус-2», котрий працює в режимі двонапівперіодичного безперервного струму, частотою 100 Гц. Сила струму на виході може коливатися від 0,1 до 50 мА. Ендоінтестинальний електрод, виготовлений із нержавіючої сталі, довжиною 200 мм та діаметром 0,2 мм в робочій проекції мав площу 125,6 мм². Він проводився через середину перфорованого по довжині поліхлорвінілового зонду з оливою на кінці з того самого матеріалу. Цей електрод підключався як катод. Як шкірні електроди використовували стандартні свинцеві пластинчасті електроди з гідрофільними прокладками (10x2см). Їх накладали на шкіру живота та спини і приєднували до аноду.

При такому розташуванні електродів вогнище запалення знаходилось у міжелектродному просторі. Протягом 30 хвилин через венфлон у крайову вену внутрішньовенно крапельно вводили протимікробний препарат у терапевтичній дозі. На 15-й хвилині від початку введення протимікробного препарату електроди підключались до апарата «Тонус-2» відповідними полюсами. Використовувались діадинамічні струми силою 3 мА, щільність струму 0,3 мА/см². Тривалість сеансу становила 30 хвилин, тобто продовжувалась ще 15 хв після закінчення інфузії.

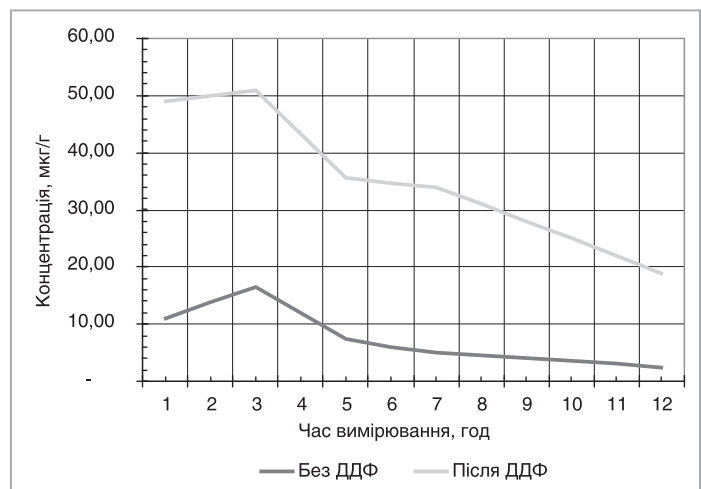


Рис. 1. Співвідношення динаміки накопичення гатіфлоксацину у вогнищі запалення

Враховуючи однакову спрямованість графіків накопичення гатіфлоксацину у вогнищі запалення у кролів за стандартних умов відповідно до критеріїв знаків, п'ятикратне підтвердження результатів є статистично достовірним при $p \leq 0,05$. Для порівняльної оцінки отримані дані накопичення гатіфлоксацину у вогнищі запалення під впливом ендоеінтестинального ДДФ і при традиційному введенні подано на рисунку 1 у вигляді графіків накопичення.

Отримані результати свідчать про те, що використання традиційного шляху введення гатіфлоксацину призводить до максимального накопичення його у вогнищі запалення на третій годині спостереження. При цьому концентрація становить $14,9 \pm 0,5$ мкг/г тканини з подальшим зниженням протягом 12 годин. Таким чином, концентрація гатіфлоксацину через 12 годин спостереження становила $2,2 \pm 0,4$ мкг/г і не перевищувала мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК).

Використання ендоеінтестинального ДДФ призводило до більш вираженого ефекту. Максимальне накопичення гатіфлоксацину в тканинах також спостерігається ближче до третьої години дослідження, але його концентрація досягає $51,8 \pm 0,6$ мкг/г тканини (рис. 2).

Площа накопичення гатіфлоксацину в тканинах після використання ендоеінтестинального ДДФ під фармакологічною кривою відповідала концентрації 395,7 мкг/г тканини, що у 4,73 разу пере-

вищує аналогічний показник у контрольній групі. Застосування ДДФ гатіфлоксацину призводить до швидшого зниження концентрації препарату в крові, котре чітко спостерігається вже через 1 годину та досягає найбільшої різниці через 3 години після введення препарату ($154 \pm 3,38$ мкг/мл). У подальшому вміст гатіфлоксацину поступово зменшувався і на 12-й годині був на рівні $39 \pm 1,14$ мкг/мл, що становить 12,56% початкової концентрації (рис. 3).

При зіставленні даних накопичення гатіфлоксацину в тканинах і його елімінації з крові видно, що при значному підвищенні концентрації препарату при використанні ДДФ у порівнянні з контрольною групою спостерігається більш виражене зниження її в крові протягом перших годин. Вказане явище свідчить про ефективну елімінацію препарату із загального судинного русла в міжелектродний простір.

Таким чином, було виявлено, що діадинамічний струм не змінює ні фізико-хімічні, ні біологічні властивості гатіфлоксацину.

Аналіз даних накопичення протимікробного засобу у вогнищі запалення показав, що використання ендоеінтестинального ДДФ сприяє значному збільшенню накопичення гатіфлоксацину в міжелектродному просторі за рахунок підвищення елімінації його з кров'яного русла.

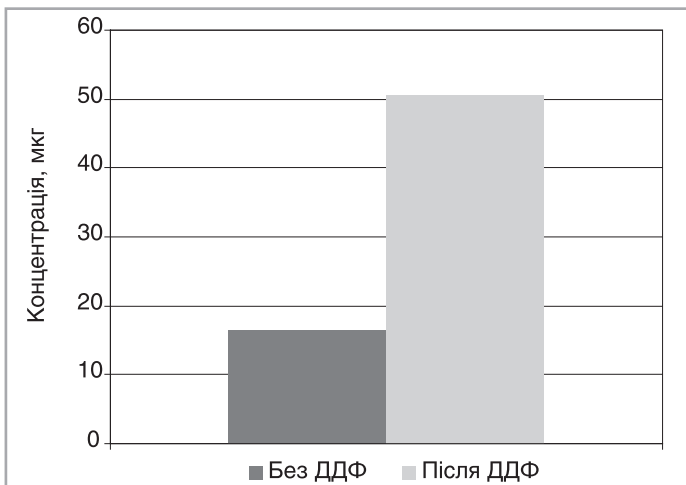


Рис. 2. Концентрація гатіфлоксацину у вогнищі запалення через 3 год

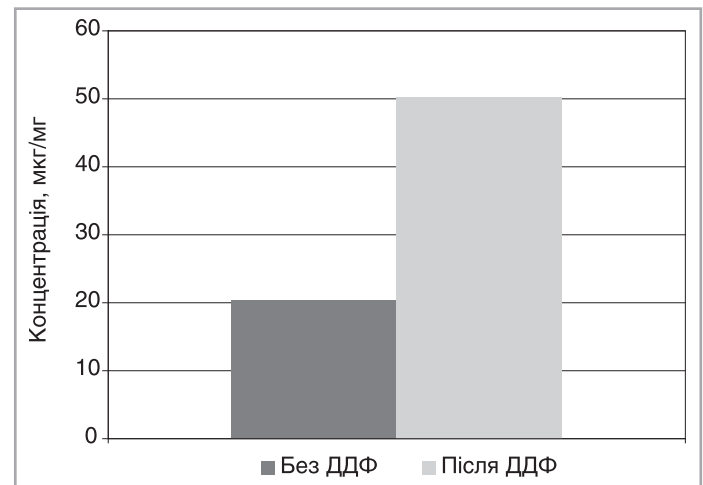


Рис. 4. Концентрація цефепіму у вогнищі запалення через 3 години

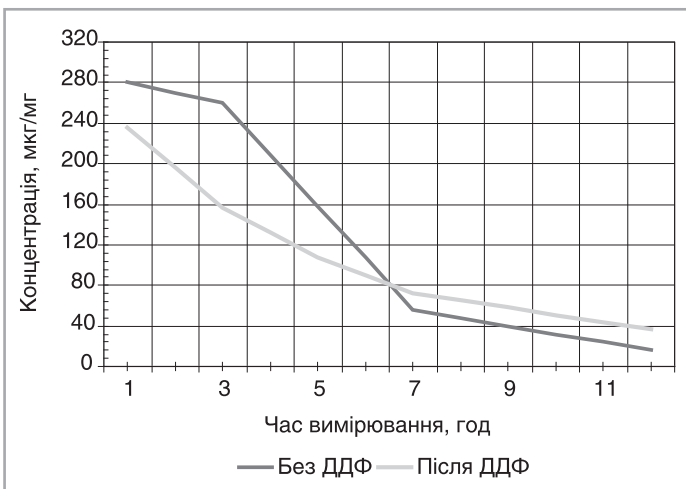


Рис. 3. Співвідношення динаміки концентрації гатіфлоксацину в сироватці крові тварин дослідної та контрольної груп

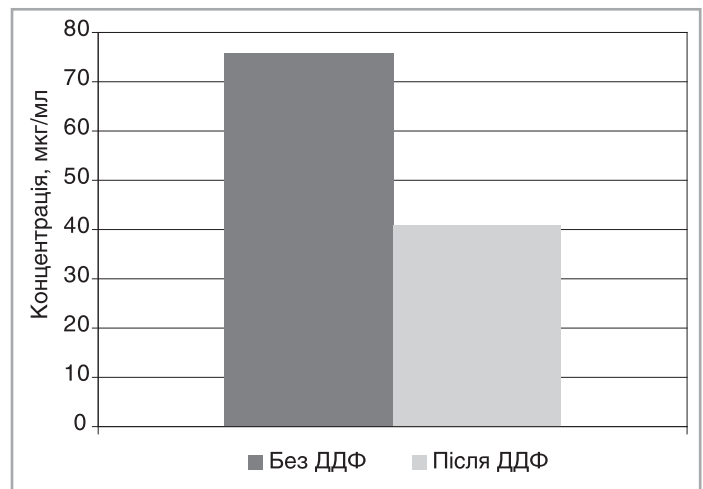


Рис. 5. Концентрація цефепіму у сироватці крові через 3 години

Для цефепіму було виявлено, що в контрольній групі кролів максимальний вміст його в осередку запалення спостерігався через 3 години після ведення і становив $21,7 \pm 0,9$ мкг/г. При про-

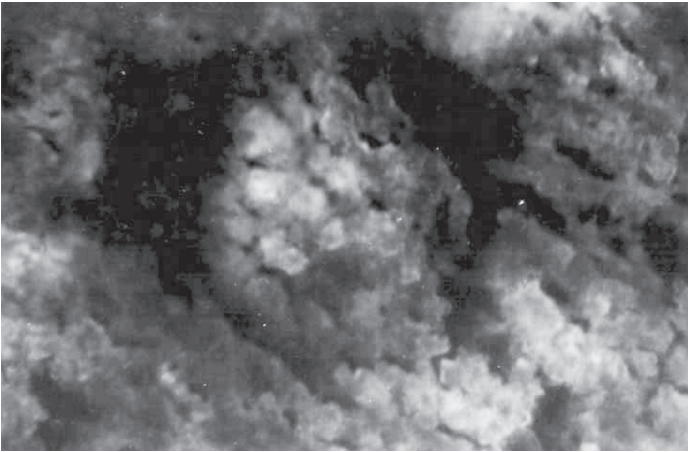


Рис. 6. Чисельність Т-лімфоцитів (CD3) у паракортикальній зоні лімфатичного вузла. Непрямий метод Кунса з МКА CD3 x 200

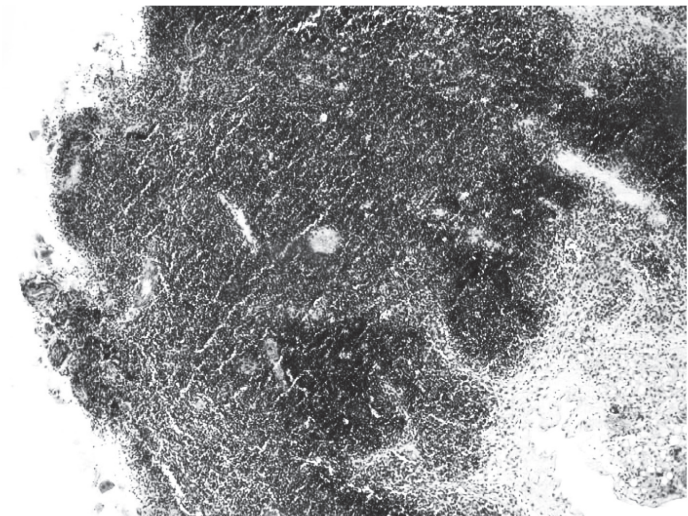


Рис. 7. Ознаки відновлення структури лімфатичного вузла: збільшення вмісту лімфоцитів у лімфатичних фолікулах, зниження проліферації клітин синусів. Повнокрів'я судин. Забарвлення гематоксином та еозином x 100

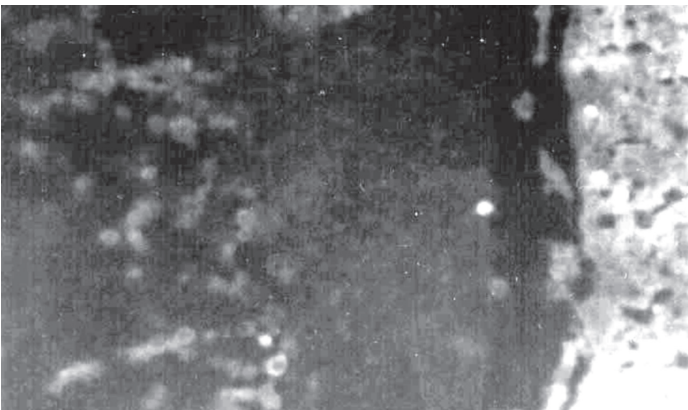


Рис. 8. Велика кількість плазмобластів IgG у запальному інфільтраті. Непрямий метод Кунса з МКА до IgG x200

веденні ДДФ через 3 години спостереження відмічалось значне підвищення рівня цефепіму в осередку запалення до $81 \pm 2,1$ мкг/г при одномоментному зниженні концентрації протимікробного препарату в сироватці крові порівняно з таким самим періодом у тварин контрольної групи (рис. 4-5).

Таким чином, під впливом діадинамічних струмів через 3 години спостерігається збільшення накопичення цефепіму у вогнищі запалення в 3,12 разу порівняно з контролем. З огляду на односпрямованість графічної картини накопичення потреби у подальшому спостереженні підвищення концентрації окремо для цефепіму не виникало.

При гістологічному та імуноморфологічному дослідженні було виявлено, що в зоні ураження та периферичних лімфатичних вузлах інфікованих лабораторних тварин виявляються клітини – продуценти цитокінів, причому їхній вміст збільшений, у порівнянні з групою інтактних тварин. Ступінь вираженості макрофагальної реакції, реакції плазматизації, а також відносного обсягу клітин-продуцентів цитокінів вірогідно вище ніж у контрольній групі. Відмічається внутрішньосудинна фіксація поодиноких нейтрофільних гранулоцитів до поверхні. Кількість плазмобластів і клітин-продуцентів інтерлейкінів IL-1, IL-6, TNF, IL-2RL, IL-4 – підвищена. Стінки деяких судин з осередковим фібриноїдним некрозом, відмічається проліферація ендотелію. При мікроскопічному дослідженні лімфатичних вузлів визначено повнокрів'я кровоносних капілярів, набряк слабко фуксинофільної стромі. Виявлена лімфоїдна гіперплазія фолікулів, у світлих центрах котрих і мозковому шарі переважають плазмобласти, плазматичні клітини, багатоядерні макрофаги. Т-лімфоцити розташовані переважно в паракортикальній зоні кори (рис. 6).

Після проведеного ДДФ у лімфатичних вузлах спостерігається відновлення їхньої структури. Лімфатичні вузлики звичайних розмірів зі світлими центрами, в них переважають лімфоцити, лімфобласти і макрофаги з помірно вираженими реакціями на дезоксинуклеопротейди (ДНП) і рибонуклеопротейди (РНП) в ядрах і цитоплазмі (рис. 7). У клітинному складі мозкової речовини переважають лімфоцити, плазматичні клітини та макрофаги. При цьому не відзначається проліферація клітин синусів.

В-лімфоцити (CD45RA) визначалися в корі і мозковій речовині. В усіх зонах лімфатичного вузла визначалися макрофаги, моноцити (ED1), клітини-продуценти імуноглобулінів G (рис. 8) і M, а також інтерлейкінів IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2RL, IL-4.

При використанні спрямованого транспортування хіміотерапевтичних препаратів за допомогою ДДФ у зону запалення морфологічна картина характеризувалася значним зниженням ступеня вираженості запально-проліферативних і деструктивно-некротичних процесів у стромі, судинах, зменшення вираженості дистрофічних і дисциркуляторних порушень. У лімфатичних вузлах спостерігалися ознаки відновлення їхньої структури і зменшення вираженості морфологічних проявів антигенної стимуляції.

Аналіз даних накопичення вищевказаних лікарських препаратів у вогнищі запалення показав, що використання ендоінтестинального ДДФ сприяє значному збільшенню накопичення гатіфлоксацину та цефепіму в міжелектродному просторі за рахунок підвищення елімінації його з кров'яного русла. Підвищення концентрації лікарських препаратів, відповідно, призводить до збільшення терміну фіксації їх в уражених тканинах.

Висновки

Розроблено доступну для абсолютної більшості хірургічних стаціонарів методику вдосконалення протимікробної терапії

на основі внутрішньотканинного ДДФ хіміотерапевтичних препаратів. Застосування способу накопичення лікарських препаратів у вогнищі запалення зменшує ризик інфікування черевної порожнини, що в певній мірі є протимікробною профілактикою при запальних процесах черевної порожнини.

Література

1. Барам Г. И. Перспективы применения баз данных для определения веществ методом ВЭЖХ / Г. И. Барам, И. Н. Азарова. – Хроматограф «Миличром А-02». Определение веществ с применением баз данных «ВЭЖХ-УФ». – Новосибирск: ЗАО «ЭкоНова», 2005. – С. 3–4.
2. Баснакян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И. А. Баснакян – М.: Медицина, 1992. – 191 с.
3. Горшевикова Э. В. Особенности возбудителей гнойно-септической хирургической инфекции и их антибиотикорезистентность / Э. В. Горшевикова // Клиническая антибиотикотерапия. – 1999. – № 1(1). – С. 41–43.
4. Змушко Е. И. Клиническая иммунология: Руководство для врачей / Е. И. Змушко, Е. С. Белозеров, Ю. А. Митин – СПб: Питер, 2001. – 576 с.
5. Исаков Ю. Ф. Абдоминальная хирургия детей / Ю. Ф. Исаков, Э. А. Степанов, Т. В. Красовская – М.: Медицина, 1988. – С. 171–177.
6. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов человека с помощью панели моноклональных антител / А. В. Филатов, П. С. Багурин, Н. А. Маркова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 1990. – № 1. – С. 16–19.
7. Іфтодій А. Г. Використання постійного струму в профілактиці і комплексному лікуванні запальних та гнійно-некротичних захворювань у хірургії / А. Г. Іфтодій, С. О. Боровкова, П. В. Кіфяк // Бук. мед. вісник. – 2001. – Т. 5, № 4. – С. 66–68.
8. Іфтодій А. Г. Вплив електричного поля постійного струму на госпітальну мікрофлору / А. Г. Іфтодій // Клінічна хірургія. – 1998. – № 3. – С. 26–27.
9. Іфтодій А. Г. Профілактика та комплексне лікування післяопераційних гнійно-запальних ускладнень в порожнинній хірургії / А. Г. Іфтодій, В. П. Піщак, І.Й. Сидорчук. – Чернівці: Мед. академія, 2004. – 200 с.
10. Комарова Л. А. Сочетанные методы физиотерапии / Л. А. Комарова, Л.А. Терентьева, Г. И. Егорова. – Рига: Зинатне, 1986. – 175 с.
11. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
12. Лещинский А. Ф. Комплексное использование лекарственных средств и физических лечебных факторов при различной патологии / А. Ф. Лещинский, В. С. Улащик. – К.: Здоровья. – 1989. – 244 с.
13. Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам. Приказ МЗ СССР № 250 от 13.03.1975 г. – 31 с.
14. Пат. 2051700 Российская Федерация, 6 А 61 N 1/30, 1/32. Способ лечения больных перитонитом и устройство для его осуществления / В.Б., А.Я. Цыганенко, В. Н. Васильченко [и др.]; заявитель и патентообладатель Харьк. мед. ин-т. – № 5013612; заявл. 19.07.91; опубл. 10.01.96, Бюл. № 1. – 8 с.
15. Рубинова Г. Е. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии / Г. Е. Рубинова – М.: Медицина, 1994. – 234 с.
16. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова / Под ред. Э.Э. Звартау. – СПб., 2003. – 57 с.
17. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. – Москва, 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513–1516.
18. Саенко В. Ф. Антибиотикопрофилактика в абдоминальной хирургии (обзор) / В. Ф. Саенко, Л. И. Голопыхо, А. П. Викторов // Клиническая хирургия. – 1992. – № 2. – С. 54–57.
19. Сидоренко С. В. Антибиотикограмма: диско-диффузионный метод. Интерпретация результатов / С. В. Сидоренко, В. Е. Колупаев – М.: Sanofi Pasteur, 1999. – 32 с.
20. Улащик В. С. Новые методы и методики физической терапии / В. С. Улащик. – Минск: Беларусь, 1986. – 175 с.
21. Чутливість до антибіотиків збудників гнійно-запальних захворювань хірургічного профілю / І. С. Гайдаш, В. В. Флегонтова, М. Ю. Шевченко [та ін.] // Укр. хіміотерапевт. журн. – 2001. – № 2. – С. 29–32.
22. Яковлев С. В. Современный взгляд на антибактериальную терапию интраабдоминальных инфекций / С. В. Яковлев // Consillium Medicum. – 2001. – № 4. – С. 304–309.
23. European Convention for the protection of vertebratae animals used for experemental and other scientific purposes // Strasbourg. Council Treaty Series. – 1986. – № 123. – 52 p.