

УДК 579.842.11:615.33:616.381-002-091-092.9

В.В. Мінухін, О.Ю. Косілова, Н.І. Горголь
Харківський національний медичний університет

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНІТУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ГАТИФЛОКСАЦИНУ В РЕЖИМІ МОНОТЕРАПІЇ ТА В КОМБІНАЦІЇ З КОЛІПРОТЕЙНИМ БАКТЕРІОФАГОМ

Проведено порівняльний аналіз морфологічних змін при експериментальному перитоніті у мишей, який показав, що застосування гатифлоксацину в комбінації з коліпротейним бактеріофагом чітко знижує ступінь вираженості запально-дистрофічних змін і гемореологічних порушень в очеревині та печінці. Отримані експериментальні дані свідчать, що змодельований у мишей перитоніт супроводжується структурними змінами в очеревині та печінці, характерними для морфологічної картини сепсису.

Ключові слова: експериментальна модель перитоніту, запально-дистрофічні зміни, гемореологічні порушення, антибактеріальна терапія.

Гострий перитоніт є одним із грізних захворювань абдомінальної хірургії, смертність від якого наближається до 60 %, сягаючи у разі післяопераційного ускладнення 90 % [1]. В основі захворювання лежить ексудативна реакція очеревини на патогенні мікроорганізми. В етіології гострого перитоніту провідна роль належить факультативним анаеробним грамнегативним паличкам, в основному бактеріям сімейства *Enterobacteriaceae* – *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*. Більшість цих мікроорганізмів є чутливими до антибіотиків широкого спектра дії, а саме фторхінолону левофлоксацину і карбепенему імепенему-цилостатину [2]. У той же час при гострому перитоніті зустрічаються і грамнегативні ентеробактерії, резистентні до фторхінолонів [3]. Проте у лікарів нерідко виникає необхідність терміново розпочинати антибактеріальну терапію у хворого на гострий перитоніт, незважаючи на відсутність даних щодо чутливості його мікрофлори до різних груп антибіотиків. Тому клініцисти часто змушені починати стартову емпіричну антибактеріальну терапію з призначення антибіотиків широкого спектра дії, зокрема гатифлоксацину-фторхінолону IV покоління, в режимі монотерапії або в комбінації з іншими антимікробними препаратами. На сьогодні присутність серед збудників гострого перитоніту антибіо-

тикорезистентних грамнегативних ентеробактерій являє собою серйозну медичну проблему [4]. Із літератури відомо, що можливості створення нових антибіотиків для ефективного лікування тяжких інтраабдомінальних інфекцій доволі обмежені. У той же час в літературі з'явилися повідомлення, що свідчать про відновлення інтересу до фагової терапії [5]. За наявності антибіотикорезистентності збудників гострого перитоніту зроблено спроби застосування комбінації фторхінолону з коліпротейним бактеріофагом. Дослідження у цьому напрямку підтверджують, що за ефективністю коліпротейний бактеріофаг не поступається антибіотикам, не має протипоказань до застосування, не викликає побічних токсичних і алергічних реакцій. Він здатен стимулювати чинники специфічного і неспецифічного імунітету. Окрім того, цей бактеріофаг може бути використаний в комбінації з антибіотиками та іншими антимікробними препаратами. Препарати коліпротейного бактеріофага виготовляють для перорального і парентерального застосування, а також для введення в черевну порожнину [6]. Враховуючи високу смертність від гострого перитоніту, спричиненого переважно грамнегативними ентеробактеріями, у тому числі резистентними до сучасних антибіотиків, проведення досліджень з цієї проблеми слід вважати актуальним і соціально значущим.

© В.В. Мінухін, О.Ю. Косілова, Н.І. Горголь, 2013

Мета даної роботи – порівняльна оцінка морфологічних змін очеревини і печінки на експериментальній моделі перитоніту у мишей при застосуванні гатифлоксацину в режимі монотерапії та в комбінації з коліпротейним бактеріофагом.

Матеріал і методи. Відтворено експериментальну модель гострого перитоніту на 30 мишах-самицях лінії BALB/c масою 18–20 г і віком 5–6 місяців. Усі дослідження проведено згідно з вимогами «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Маніпуляції на тваринах здійснювали під місцевою інфільтраційною анестезією 0,125%-вим розчином лідокаїну або під загальним знеболенням шляхом внутрішньочеревного введення пентобарбіталу натрію в дозі 70 мг/кг. Мишей утримували у віварії ХНМУ.

Розповсюджений гострий перитоніт моделювали за загальноприйнятою методикою [7]. Готували 10%-ву суспензію стерильних фекалій у дистильованій воді, в яку після фільтрування через подвійний шар марлі додавали культуру *Escherichia coli* ATCC 25922 (5×10^8 мікробних тіл на тварину) або *Staphylococcus aureus* 209 (1×10^9 на тварину). Отриману суспензію в об'ємі 0,5 мл вводили пункційним способом у 5 анатомічних ділянок черевної порожнини інтактним мишам. Протягом однієї – трьох діб після контамінації у всіх тварин розвинувся розповсюджений гострий перитоніт, що було підтверджено макроскопічною картиною і гістологічними дослідженнями. Усіх мишей зі змодельованим гострим перитонітом розподілили на три експериментальні групи по 10 тварин у кожній: 1-ша (порівняння) – без лікування антимікробними препаратами; 2-га – із застосуванням гатифлоксацину в режимі монотерапії; 3-тя – в якій гатифлоксацин використано в комбінації з коліпротейним бактеріофагом. Антибактеріальні препарати вводили внутрішньочеревно один раз на добу кожні 24 години: гатифлоксацин з розрахунку 0,25 мг/кг, коліпротейний бактеріофаг – 0,03 мг/кг.

На 5-ту добу від початку застосування антибактеріальних препаратів усіх тварин 2-ї та 3-ї груп було вилучено з експерименту шляхом миттєвої дислокації. Під час аутопсії проведено макроскопічну оцінку очеревини і печінки. Подальші морфологічні дослідження виконано відповідно до методик, викладених

у настановах з гістологічної техніки [8]. Для гістологічного дослідження фрагменти очеревини і печінки фіксували у 10%-вому розчині нейтрального формаліну. Після фіксації матеріал промивали у проточній воді протягом двох діб і зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації. Зі шматочків матеріалу після зневоднення готували парафінові зрізи товщиною $4-5 \times 10^{-6}$ м, які забарвлювали гематоксиліном і еозином. Морфологічні зміни оцінювали при збільшенні 200 за допомогою мікроскопа Olympus BX-41 (Японія).

Результати та їх обговорення. Усі тварини 1-ї групи без лікування антибактеріальними препаратами померли за одну-три доби. Під час аутопсії виявлено накладення на очеревині ниток фібрину. Печінка мала жовтувато-коричневий колір, гладку поверхню і тістувату однорідну консистенцію.

При морфологічному дослідженні очеревини виявлено гіперемію і набряк сполучнотканинного шару. Кровоносні судини мали ознаки різко вираженого повнокров'я і гемореологічних порушень, особливо у капілярах і веноулярній ланці мікроциркуляторного русла. Виявлено розповсюджені ендо- і периваскуліти. При гістологічному дослідженні печінки чітко визначені часточки з різко повнокровними центральними венами, синусоїдними капілярами, а також судинами порталних трактів. У судинах мікроциркуляторного русла відзначено крайове стояння нейтрофільних гранулоцитів. Виявлена виражена дискомплексція гепатоцитів і гіперплазія клітин Купфера. Серед гепатоцитів знайдені поодинокі диплоїдні клітини. Цитоплазма гепатоцитів еозинофільна, з вираженою зернистістю. Виявлено вогнища крупно- і середньокрапельного ожиріння гепатоцитів. У порталних трактах відзначена наявність лімфоплазмочитарних інфільтратів із значною домішкою нейтрофільних гранулоцитів. Також виявлено проникнення запальних інфільтратів у середину часточок і формування мікроабсцесів. У багатьох гепатоцитах відмічено явища каріолізу, ознаки маргінації хроматину, гіперхроматоз ядер, а також вогнищевий цитоліз гепатоцитів. Знайдені зміни відповідали морфологічній картині сепсису. При цьому в 7 випадках підтверджена септицемія, а в 3 випадках з наявністю в печінці мікроабсцесів – септикопемія.

Тваринам 2-ї групи відразу після введення в черевну порожнину суспензії фекалій з добо-

вою культурою *E. coli* розпочато лікування гатифлоксацином в дозі 0,25 мг/кг внутрішньочеревно 1 раз на добу в режимі монотерапії, яка проведена протягом п'яти діб. За цей період померли 3 миші, у яких при аутопсії і подальшому морфологічному дослідженні виявлена морфологічна картина сепсису. У 7 тварин, що вижили, на 5-ту добу лікування здійснено евтаназію й аутопсію для вивчення морфологічних змін в очеревині і печінці.

При морфологічному дослідженні очеревини встановлено, що гіперемія і набряк парієтального і вісцерального листків виражені слабо, вогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати мають незначну домішку нейтрофільних гранулоцитів і макрофагів. У брижі вогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати без домішки нейтрофільних гранулоцитів, але з присутністю макрофагів. Судини помірно повнокровні, гемореологічні порушення слабо виражені.

Також відзначено, що архітектоніка печінки збережена, дисконкомплексация гепатоцитів не виражена. Центральні вени і міжбалочні капіляри дещо розширені, помірно повнокровні, гемореологічні порушення виражені слабо. Виявлено гіперплазію і гіпертрофію клітин Купфера, у порталних трактах невеликі лімфогістіоцитарні інфільтрати з домішкою поодиноких нейтрофільних гранулоцитів. Зрідка відзначена внутрішньочасточкова слабо виражена запальна інфільтрація. Дистрофічні зміни гепатоцитів виражені незначно з наявністю зернистості і вакуолізації цитоплазми окремих клітин. Ознаки ожиріння і некрози гепатоцитів відсутні.

Тваринам 3-ї групи відразу після введення в черевну порожнину суспензії фекалій з добовою культурою *E. coli* розпочато лікування гатифлоксацином в дозі 0,25 мг/кг в комбінації з

коліпротейним бактеріофагом в дозі 0,03 мг/кг внутрішньочеревно 1 раз на добу протягом п'яти діб. За цей період померли 2 миші, при проведенні аутопсії і гістологічного дослідження у них відзначена морфологічна картина сепсису. У 8 тварин, що вижили, на 5-ту добу лікування гатифлоксацином в комбінації з коліпротейним бактеріофагом здійснено евтаназію і аутопсію з метою вивчення морфологічних змін в очеревині і печінці.

При гістологічному дослідженні очеревини встановлено, що гіперемія і набряк парієтального й вісцерального листків слабо виражені, вогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати з незначною домішкою нейтрофільних гранулоцитів і макрофагів. У брижі вогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати без домішки нейтрофільних гранулоцитів, але з присутністю макрофагів. Судини помірно повнокровні, гемореологічні порушення слабо виражені.

При гістологічному дослідженні печінки відзначено, що архітектоніка органа збережена, дисконкомплексация гепатоцитів не виражена. Центральні вени і міжбалочні капіляри дещо розширені, помірно повнокровні, присутні слабо виражені гемореологічні порушення. Виявлено гіперплазію і гіпертрофію клітин Купфера, в порталних трактах – невеликі лімфогістіоцитарні інфільтрати з домішкою поодиноких нейтрофільних гранулоцитів. Зрідка помітна слабо виражена внутрішньочасточкова запальна інфільтрація. Дистрофічні зміни гепатоцитів з наявністю зернистості і вакуолізації цитоплазми окремих клітин виражені незначно. Ознаки ожиріння і некрози гепатоцитів відсутні.

Результати морфологічного дослідження очеревини і печінки мишей з експериментальним перитонітом наведені в таблиці.

Морфологічні зміни у мишей з експериментальним перитонітом

Патологічні зміни	Групи мишей		
	1-ша (без лікування)	2-га (лікування гатифлоксацином)	3-тя (лікування гатифлоксацином в комбінації з КПБ)
Запалення парієтальної очеревини	+++	++	+
Запалення вісцеральної очеревини	++	+	+
Макрофаги в інфільтраті	–	–	+
Фібрин в ексудаті	++	–	–
Запалення в печінці	++++	+	+
Дистрофічні зміни в печінці	++++	+	+
Гемореологічні порушення	++++	+	+

Примітки: 1. КПБ – коліпротейний бактеріофаг.

2. $p < 0,05$.

Отже, найменші морфологічні зміни на експериментальній моделі перитоніту у мишей відзначені при лікуванні гатифлоксацином в комбінації з колипротейним бактериофагом.

Висновки

1. Отримані експериментальні дані свідчать, що змодельований перитоніт у мишей супроводжується структурними змінами в очеревині і печінці, характерними для морфологічної картини сепсису.

2. Порівняльний аналіз морфологічних змін на експериментальній моделі перитоніту у

мишей показав, що застосування гатифлоксацину в комбінації з колипротейним бактериофагом чітко зменшує ступінь вираженості запально-дистрофічних змін і гемореологічних порушень в очеревині і печінці.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати експериментального дослідження обґрунтовують подальший науковий пошук і зумовлюють доцільність клінічного етапу вивчення з розробкою ефективних методів антибактеріальної терапії перитоніту.

Список літератури

1. Перитоніт – одвічна проблема невідкладної хірургії / за ред. В.П. Польового, В.В. Бойко, Р.І. Сидорчука. – Чернівці, 2012. – 376 с.
2. Anderson V.R. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short course treatment for bacterial infection / V.R. Anderson, C.M. Perry // *Drugs*. – 2008. – № 68 (535). – P. 565.
3. Белобородов В.Б. Применение фторхинолонов: проблемы резистентности / В.Б. Белобородов // *Consillium medicum*. – 2005. – Т. 7, № 2. – С. 13–17.
4. Рижкова Т.А. Проблема антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій. Огляд літератури / Т.А. Рижкова// *Укр. журн. клінічної та лабораторної медицини*. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 11–18.
5. Kutter E. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections / E. Kutter// *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2010. – № 1. – P. 69–86.
6. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития / И.В. Красильников, К.А. Лыско, Е.В. Отрашевская, А.К. Лобастова// *Сибирск. мед. журн.* – 2011. – Т. 26, № 2 (2). – С. 33–37.
7. Deith E.A. Rodent models of intra-abdominal infections / E.A. Deith // *Shock*. – 2005. – № 24 (1). – P. 19–23.
8. Руководство по гистологической, гистохимической и иммуногистохимической технике: учеб. пособие для бакалавров / В.Д. Марковский, И.В. Сорокина, Н.В. Гольева, Л.С. Куприянова. – Харьков, 2010. – 152 с.

В.В. Минухин, О.Ю. Косилова, Н.И. Горголь

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ГАТИФЛОКСАЦИНА В РЕЖИМЕ МОНОТЕРАПИИ И В КОМБИНАЦИИ С КОЛИПРОТЕЙНЫМ БАКТЕРИОФАГОМ

Сравнительный анализ морфологических изменений на экспериментальной модели перитонита у мышей показал, что применение гатифлоксацина в комбинации с колипротейным бактериофагом чётко уменьшает степень выраженности воспалительно-дистрофических изменений и гемореологических нарушений в брюшине и печени. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что смоделированный у мышей перитонит сопровождается структурными изменениями в брюшине и печени, характерными для морфологической картины сепсиса.

Ключевые слова: экспериментальная модель перитонита, воспалительно-дистрофические изменения, гемореологические нарушения, антибактериальная терапия.

V.V. Minukhin, O.Yu. Kosilova, N.I. Gorgol

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF EXPERIMENTAL PERITONITIS AT USING GATIFLOXACIN IN REGIME OF MONOTHERAPY AND IN COMBINATION WITH BACTERIOPHAGE COLIPROTEUS

The comparative analysis of morphological changes in the experimental model of peritonitis in mice showed that the use of gatifloxacin in the combination with coliproteus bacteriophage clearly diminishes the grade of expression of inflammatory and dystrophic changes and hemorheological disorders in the peritoneum and the liver. The obtained experimental data testify to the fact that the experimental peritonitis in mice is accompanied by the structural changes in the peritoneum and the liver which are typical for the morphological picture of sepsis.

Key words: experimental model of peritonitis, inflammatory and dystrophic changes, hemorheological disorders, antimicrobial therapy.

Поступила 18.04.13