

УДК 616.381-002-089-092.9:615.281

## ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКССУДАТА БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АПРОБАЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МЕМБРАН В ИНФИЦИРОВАННЫХ УСЛОВИЯХ

**Липатов В.А., Затолокина М.А., Романчук Д.В., Ярмамедов Д.М.,  
Денисов А.А., Щербенёв Н.А.**

*ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск,  
e-mail: romanchukden@mail.ru*

В работе изучена цитологическая картина, формирующаяся в брюшной полости в процессе экспериментальной апробации образцов антибактериальных полимерных пленчатых имплантов в инфицированных условиях и выявлено их влияние на течение острого воспалительного процесса. Для моделирования данных условий здоровым крысам-самцам пункционно в брюшную полость вводилась 10% взвесь фекалий, после чего животные были разделены на три группы. Через 12 часов группам № 1 и № 2 была выполнена лапаротомия. С целью выявления роли антибактериальных мембран в купировании инфекционного воспаления животным первой группы была выполнена санация брюшной полости раствором фурацилина и помещение в неё антибактериальных имплантов, а группе № 2 – только санация. Животные группы № 3 лечения не получили. В работе учитывались летальность животных и клеточный состав экссудата брюшной полости, изученный в микропрепаратах, окрашенных по Романовскому – Гимзе. Как и ожидалось, наихудшие результаты наблюдались в группе № 3: летальность к 7 дню составила 91,6%, а в экссудате брюшной полости количество нейтрофилов было самым высоким, по сравнению с экспериментальными группами. Однако применение стандартной методики лечения, которая применялась в группе № 2, не дало существенных результатов, так как показатель летальности остался достаточно высоким – 50%. Наилучшие результаты наблюдались в группе № 1: летальность к 7 дню эксперимента составила 13,3%, а количество нейтрофилов уменьшилось в 4,5 раза быстрее, чем в группе № 2, и в 6,3 раза – чем в группе № 3. Это свидетельствовало о снижении интенсивности воспалительного процесса и, соответственно, более быстром выздоровлении животных.

**Ключевые слова:** полимерные мембраны, противоспаечные средства, спаечная болезнь, перитонит, антибактериальные средства, спайки

## CYTOLOGIC RESEARCH OF THE EXSUDATE OF THE ABDOMINAL CAVITY AT EXPERIMENTAL APPROBATION OF ANTIBACTERIAL POLYMERIC MEMBRANES IN THE INFECTED CONDITIONS

**Lipatov V.A., Zatolokina M.A., Romanchuk D.V., Yarmamedov D.M.,  
Denisov A.A., Scherbenev N.A.**

*Federal State-funded educational institution of the Higher Education «Kursk State Medical University»  
of the Russian Ministry of Health, Kursk, e-mail: romanchukden@mail.ru*

In this research, the cytological picture formed in the abdominal cavity in the process of experimental approbation of samples of antibacterial polymeric implants in infected conditions was studied and their influence on the course of acute inflammatory process was revealed. To model these conditions, a 10% suspension of faeces was administered puncture into the abdominal cavity in healthy male rats, after which the animals were divided into three groups. After 12 hours, groups 1 and 2 underwent laparotomy. In order to identify the role of antibacterial membranes in the relief of infectious inflammation, the animals of the first group underwent a sanitation of the abdominal cavity with a solution of furacilin and the placement of antibacterial implants in it, and group No. 2 only sanitation. Group 3 animals did not receive any treatment. The work took into account the lethality of animals and the cellular composition of the abdominal exudate, studied in micropreparations stained by Romanovsky-Giemsa. As expected, the worst results were observed in group № 3: the lethality by the seventh day was 91.6%, and in the exudate of the abdominal cavity the number of neutrophils was the highest, in comparison with the experimental groups. However, the use of the standard treatment method, which was used in group № 2, did not yield significant results, since the mortality rate remained rather high – 50%. The best results were observed in group № 1: lethality by the 7th day of the experiment was 13.3%, and the number of neutrophils decreased 4.5 times faster than in group № 2 and 6.3 times than in group № 3. This indicated a decrease in the intensity of the inflammatory process and, consequently, a faster recovery of animals.

**Keywords:** polymeric membranes, antiseptic, adhesions, peritonitis, antibacterial agents, adhesions

Одной из самых актуальных проблем в хирургии является перитонит [1]. Актуальность определяется тремя основными факторами: широчайшей распространенностью заболевания, высокой летальностью, наличием сложных и многочисленных нарушений гомеостаза [2]. Применение совре-

менных методик (антибиотики широкого спектра действия, иммуномодуляторы нового поколения, экстракорпоральные методы детоксикации и т.д.) не дает существенного снижения летальности [2, 3]. В настоящее время, несмотря на развитие современной фармакологической индустрии, ощущается

недостаток в выборе эффективного антибактериального средства в борьбе с перитонитом [4, 5]. Таким образом, все вышеперечисленные аргументы указывают на то, что методы санации брюшной полости нуждаются в доработке. Топическое использование противомикробных средств, депонированных в полимерных имплантах, улучшает результаты лечения, так как в этом случае антибактериальное средство действует локально, в зоне развития микробного воспаления, а также уменьшает вероятность перитонеальной адгезии и последующего спаечного процесса. Цитологическое исследование является одним из важнейших преимуществ сравнения и динамического изучения эффекта применения новых методов лечения воспалительных заболеваний.

Целью работы явилось изучение в сравнительном аспекте цитологической картины, формирующейся в брюшной полости, в процессе экспериментальной апробации образцов полимерных пленчатых имплантов в инфицированных условиях, а также выявление их влияния на течение острого воспалительного процесса.

#### Материалы и методы исследования

В качестве материала для экспериментальных исследований был использован антибиотик Цефтриаксон и образец полимерных мембран, разработанный ООО «Линтекс» (г. Санкт-Петербург): 76 MHR. В ранее проведенных исследованиях этот образец показал высокую степень адгезии (позволяет фиксировать его бесшовным способом); адекватные сроки деградации (от 7 дней, чего вполне достаточно, чтобы достичь необходимого эффекта); полное рассасывание (исключает необходимость повторных оперативных вмешательств для его извлечения) [6, 7]. Цефтриаксон был выбран в связи с его широким спектром антимикробной активности, наилучшими фармакокинетическими показателями, он обладает стабильностью по отношению к  $\beta$ -лактамазам и высокой проницаемостью через стенку грамотрицательных микроорганизмов [8, 9]. Данный антибиотик был взят в минимальной подавляющей концентрации в тканях – МПК (0,008 мг/мл), так как эта концентрация обладает одновременно бактерицидным действием и лимфостимулирующим [10, 11]. Опыты проводились в соответствии с конвенцией «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных целях», принятой Советом Европы (г. Страсбург, Франция 1986 г.), и директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.86 г., по согласованию законов, правил и административных распоряжений стран-участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Эксперимент был выполнен на лабораторных крысах-самцах, линии Вистар, массой 250–300 г. Перед введением в эксперимент все животные находились на двухнедельном карантине в экспериментально-биологической клинике (виварии) Курского государственного медицинского университета.

Для моделирования инфицированных условий путем моделировки наркоза умерщвлялось одно

животное. Из содержимого слепой кишки этого животного готовилась 10% взвесь фекалий в изотоническом (0,9%) водном растворе хлорида натрия. Полученная смесь после однократной фильтрации через четыре слоя марли вводилась интактным животным под наркозом пункционным способом из одного вкола (в центре белой линии живота) в правую и левую подвздошные области из расчета 0,5 миллилитров на 100 граммов массы животных не позднее чем через 20 минут после приготовления (для максимального сокращения потери анаэробной микрофлоры) [12]. Экспериментальных животных (39 крыс) делили на 3 группы. Первой группе (15 крыс) через 12 часов после моделирования инфицированных условий выполняли переднюю срединную лапаротомию, двукратное промывание брюшной полости 0,02% раствором фурацилина, после чего туда помещали 2 антибактериальные мембраны размером 1х2 см. Для обеспечения длительного бактерицидного действия Цефтриаксона в очаге инфекции, перед использованием мембраны находились в растворе антибиотика (0,008 мг/л) 20 минут. Второй группе (12 крыс) было выполнено только промывание брюшной полости фурацилином. Третьей группе (12 крыс) после моделирования инфицированных условий лечение не производилось. Для оценки цитологической картины проводился микроскопический анализ экссудата, взятого из брюшной полости через 12 часов после моделирования, а также на 7 и 14 сутки, окрашенный по Романовскому – Гимзе. Оценивалось количество макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов, в связи с тем, что соотношения этих трёх групп клеток и даёт представление о характере и интенсивности течения воспалительного процесса. Статистическая обработка результатов проводилась путем вычисления среднего значения, стандартного отклонения, доверительного интервала. Методом доверительного интервала сравнивалась группа № 1 с группами № 2 и № 3. Все расчеты выполнялись с помощью аналитического пакета приложения Microsoft Excel Office 2010, лицензией на право использования которой обладает ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В ходе данного исследования, направленного на изучение антимикробных свойств полимерных пленчатых имплантов, получены следующие результаты, представленные ниже. Клинически через 12 часов после моделирования – крысы малоподвижны, заторможены, группируются в углу клетки, выглядят вялыми, апатичны к еде, отмечается частое поверхностное дыхание, сухость кожи и взъерошенность шерсти. Цитологические данные (рис. 1) приведены для подтверждения результатов моделирования.

При микроскопии было обнаружено, что клеточный состав экссудата, взятого через 12 часов после моделирования инфицированных условий, представлен в основном лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами. Среди них значительно преобладала одна фракция – нейтрофилы. Это свидетельствует о течении острого инфекционного

процесса в брюшной полости, т.е. использованная методика позволяет в эксперименте воспроизводить перитонит, близкий к таковому в клинике. Показатели летальности, приведенные ниже (табл. 1), указывают на улучшение результатов лечения у животных после операции с применением антибактериальных полимерных имплантов.

В третьей группе животных обнаруживается самая высокая летальность, во второй она ниже, но остаётся на достаточно высоком уровне. Наилучшие показатели наблюдались в первой группе, это говорит о том, что только лишь санации брюшной полости зачастую оказывается недостаточно. Динамическое наблюдение за чис-

лом клеток экссудата брюшной полости и их соотношением (рис. 2–3) позволило удостовериться в положительном эффекте мембран.

К седьмому дню количество нейтрофилов значительно уменьшилось, но возросло число лимфоцитов. В третьей группе наблюдаются самые высокие показатели. Во второй группе значения на порядок больше, чем в первой. Таким образом, если соотнести показатели летальности и клеточный состав экссудата на 7 день, то можно сделать заключение, что применение антибактериальных мембран способствует эффективному купированию острого инфекционного процесса.

Таблица 1

Показатели летальности животных в течение исследования

Группа	Через 12 часов после операции	7-й день	14-й день
№ 1 (с применением имплантов)	2 (13,3%)	2 (13,3%)	0
№ 2 (без применения имплантов)	2 (16,6%)	5 (41,6%)	3 (25%)
№ 3 (без операции)	–	11 (91,6%)	1 (8,4%)

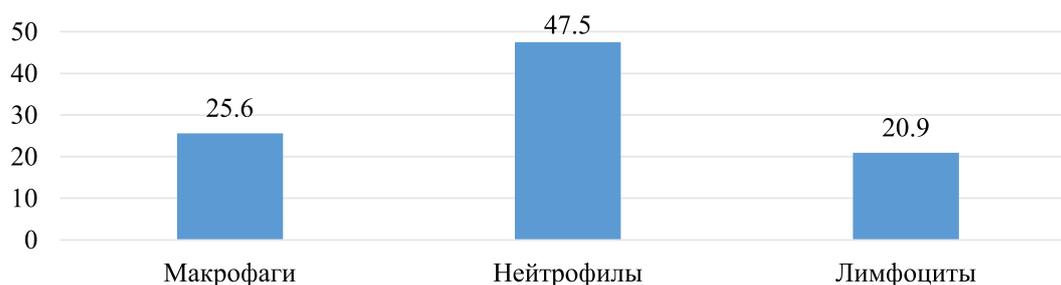


Рис. 1. Число клеток в поле зрения цитологического мазка экссудата брюшной полости через 12 часов после моделирования инфицированных условий

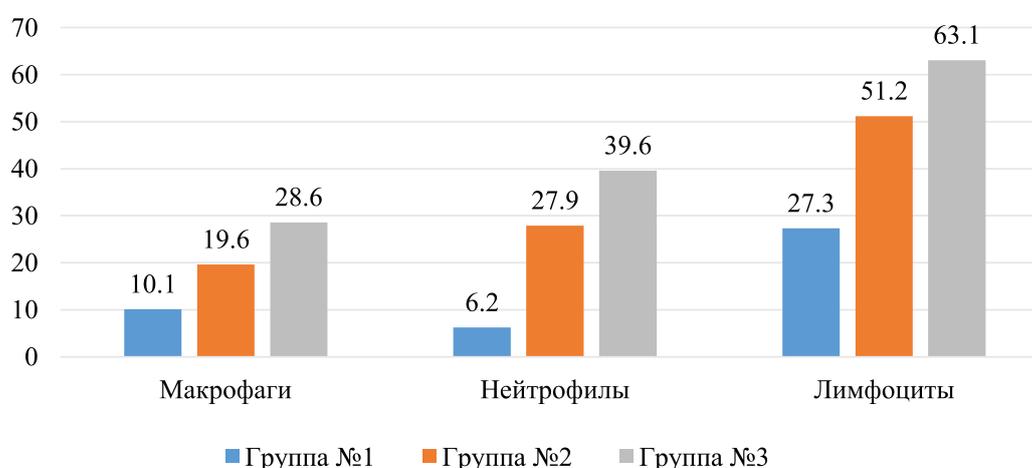


Рис. 2. Число клеток в поле зрения цитологического мазка экссудата брюшной полости на 7 день эксперимента

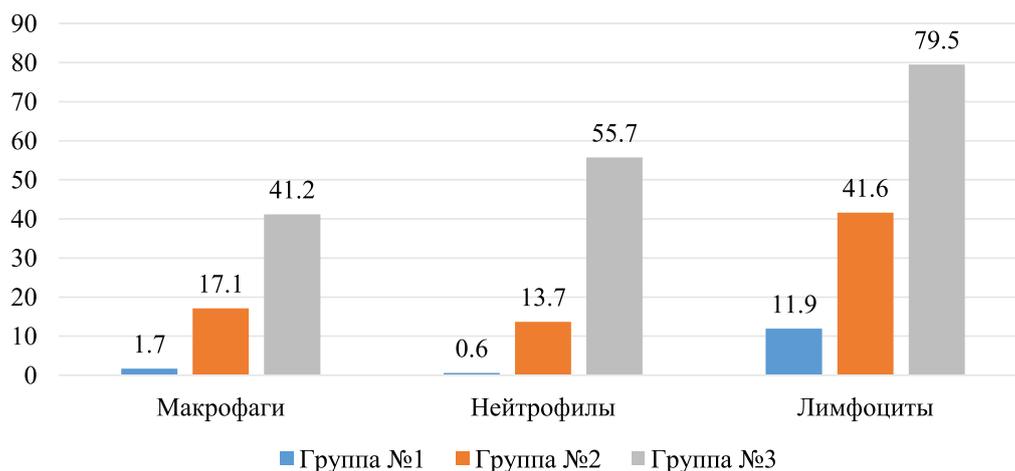


Рис. 3. Число клеток в поле зрения цитологического мазка экссудата брюшной полости на 14 день эксперимента

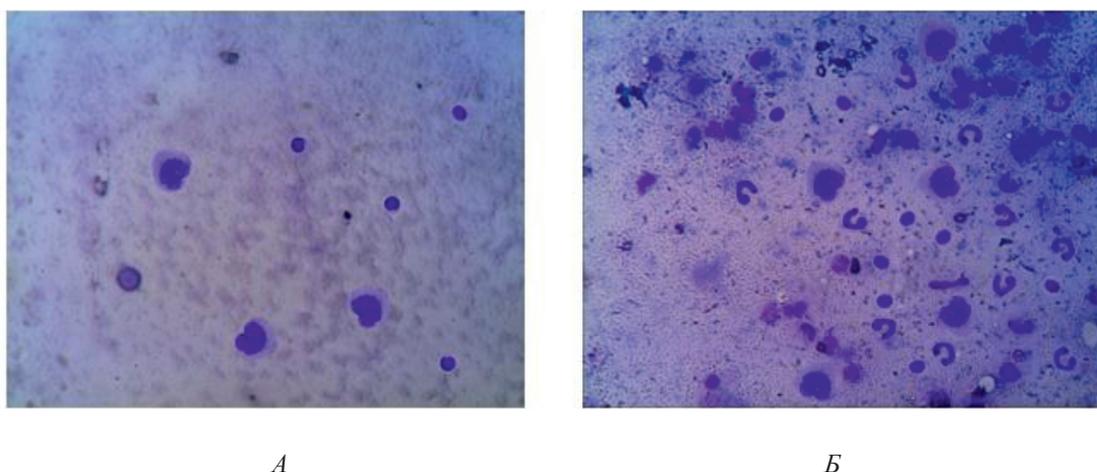


Рис. 4. Микрофото. Клеточный состав экссудата брюшной полости: А – группа № 1; Б – группа № 2. Окраска по Романовскому – Гимзе. ув.  $\times 400$

Как видно на диаграмме, к 14 дню в первой группе нет нейтрофилов, обнаруживается небольшое число лимфоцитов и единичные макрофаги. Это свидетельствует о том, что завершилось очищение очага воспаления от микроорганизмов и продуктов альтерации тканей. Ведущая роль в этом, а также в процессах пролиферации, отводится макрофагам и лимфоцитам. Именно поэтому к данному сроку в группе № 1 обнаруживаются эти клетки. На микрофотографиях (рис. 4) существенно выражены различия в количестве лейкоцитов между 1 и 2 группами.

В экссудате второй группы животных можно заметить палочкоядерные нейтрофилы, в то время как в первой – их нет. Что и отражают морфометрические данные, приведённые в данном исследовании (табл. 2). Методом доверительного интерва-

ла было выявлено статистически значимое действие антибактериальных имплантов на уровень содержания лейкоцитов в экссудате брюшной полости.

Проанализировав изменения соотношений между фракциями лейкоцитов, становятся заметны сходства в 1 и 2 группах: постепенно снижается число нейтрофилов и увеличивается количество лимфоцитов. То есть с применением методов оперативного лечения инфекционный воспалительный процесс купируется. Однако в группе, где использовались антибактериальные импланты, положительные изменения наступают значительно быстрее. Это отражается в снижении нейтрофилов к седьмому дню эксперимента: в первой группе их число снизилось в 7,3 раза, в то время как во второй группе – в 1,7 раз.

Таблица 2

Клеточный состав и количество клеток в поле зрения цитологического мазка экссудата брюшной полости

Срок выведения из эксперимента день/номер группы	Макрофаги	Нейтрофилы	Лимфоциты
Через 12 часов после моделирования	25,6 ± 3,92	47,5 ± 6,31	20,9 ± 6,08
7/группа № 1 (с применением имплантов)	10,1 ± 3,28 <sup>3,4</sup>	6,2 ± 2,39 <sup>3,4</sup>	27,3 ± 7,5 <sup>3,4</sup>
t	1,66	1,21	3,79
7/группа № 2 (без применения имплантов)	19,6 ± 4,79 <sup>2,4</sup>	27,9 ± 5,38 <sup>2,4</sup>	51,2 ± 4,49 <sup>2,4</sup>
t	2,42	2,72	2,27
7/группа № 3 (без операции)	28,6 ± 6,19 <sup>2,3</sup>	39,6 ± 6,34 <sup>2,3</sup>	63,1 ± 5,08 <sup>2,3</sup>
t	3,13	3,21	2,57
14/группа № 1	1,7 ± 1,49 <sup>6,7</sup>	0,6 ± 0,84 <sup>6,7</sup>	11,9 ± 4,6 <sup>6,7</sup>
t	0,76	0,43	2,33
14/группа № 2	17,1 ± 3,28 <sup>5,7</sup>	13,7 ± 4,69 <sup>5,7</sup>	41,6 ± 5,19 <sup>5,7</sup>
t	1,66	2,37	2,63
14/группа № 3	41,2 ± 6,97 <sup>5,6</sup>	55,7 ± 3,46 <sup>5,6</sup>	79,5 ± 7,49 <sup>5,6</sup>
t	3,53	1,75	3,79

Примечание: <sup>2,3,4,5,6</sup> – наличие статистически значимых отличий при  $p \leq 0,05$  с соответствующим сроком наблюдения. М – среднее арифметическое; m – стандартное отклонение; t – доверительный интервал.

### Заключение

По результатам исследования было выявлено, что морфологический состав клеток при остром микробном воспалении брюшной полости представлен нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами. По итогам морфометрического подсчета клеточного состава можно сказать, что наименьшее число нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов наблюдается в 1 группе. Более выраженное снижение количества лейкоцитов, по сравнению со второй группой, говорит о большей эффективности антибактериальных имплантов. Подтверждают это и низкие показатели летальности в первой группе. Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что использование антибактериальных полимерных имплантов – это эффективный метод купирования острого инфекционного воспалительного процесса. Безусловно, санация является незаменимой составляющей в лечении перитонита, однако после операции в брюшной полости создаются благоприятные условия для развития микробной флоры, что приводит к рецидиву воспалительного процесса. Чтобы избежать этого, в очаге инфекции необходимо создать условия для пролонгированного действия антимикробного средства. Именно для этого необходимы полимерные мембраны, которые помогают обеспечить локальное длительное действие антибиотика.

### Список литературы

1. Ерюхин И.А. Абдоминальная хирургическая инфекция: современное состояние и ближайшее будущее в ре-

шении актуальной клинической проблемы / И.А. Ерюхин, С.Ф. Багненко, Е.Г. Григорьев // Инфекции в хирургии. – 2007. – № 1. – С. 6–12.

2. Клиническая хирургия: национальное руководство / ред. В.С. Савельева, А.И. Кириенко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 2. – С. 434–477.

3. Антимикробная профилактика перитонита / С.В. Яковлев [и др.] // Инфекции в хирургии. – 2007. – № 4. – С. 10–14.

4. Покровский Е.Ж. Анализ причин летальных исходов при распространенном перитоните / Е.Ж. Покровский // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2012. – № 17. – С. 29–32.

5. Томнюк Н.Д. Перитонит как одна из основных причин летальных исходов / Н.Д. Томнюк, Е.П. Данилина, А.Н. Черных // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 10. – С. 81–84.

6. Изучение особенностей реактивных изменений тканей на подкожную имплантацию новых рассасывающихся мембран на основе карбоксиметилцеллюлозы в экспериментах «in vivo» / М.А. Инархов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25189> (дата обращения: 15.05.2018).

7. К вопросу изучения физико-механических и особенностей новых деградируемых полимерных пленочных имплантов для операций на органах брюшной полости / М.А. Инархов [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2016. – № 3. – С. 67–73.

8. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2014. – 1216 с.

9. Федотова Е.Н. Патогенетическое обоснование регионарной забрюшинной лимфогенной антибиотикотерапии при перитоните / Е.Н. Федотова, И.Л. Черниченко, К.В. Семенов // Вестник Новгородского государственного университета. – 2013. – № 71. – С. 114–115.

10. Влияние современных антибиотиков на моторику лимфатических сосудов в норме и при экспериментальном перитоните / Е.А. Авраменко [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2011. – № 3. – С. 119–125.

11. Попов П.В. Зависимость функционального состояния лимфатического дренажа задней конечности крысы от дозировки, длительности химиотерапии и способа введения цефтриаксона / П.В. Попов, Б.Я. Сыропятов, Т.Ф. Одегова // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – № 5. – С. 12–15.

12. Лазаренко В.А. Экспериментальная модель распространенного калового перитонита / В.А. Лазаренко, В.А. Липатов, Ю.Ю. Блинков // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 4. – С. 128–134.