

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ »

УДК 616.36-089.843

ТРЕТЬЯК
Дмитрий Станиславович

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕК-
ТИВНОСТЬ АНТИЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО ГЕМОСОРБЕНТА В ИН-
ТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ СЕПСИСА
(экспериментально-клиническое исследование)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.01.20 – анестезиология и реаниматология

Минск 2015

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» и в государственном предприятии научно-практический центр «ЛОТИОС».

Научные руководители: Кирковский Валерий Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией гемо- и лимфосорбции учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Гапанович Владимир Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор государственного предприятия научно-практический центр «ЛОТИОС»

Официальные оппоненты: Гаин Юрий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, проректор по научной работе государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Спас Владимир Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Защита состоится 24 июня 2015 года в 14:00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.15.03 при государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» по адресу: 220013, г. Минск, ул. Бровки, 3, корп. 3, телефон (8-017) 287 00 68, e-mail: rim – wlad@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Автореферат разослан 22 мая 2015 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций

В.В. Римашевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами

Работа выполнена в рамках комплексной научно-исследовательской работы в лаборатории гемо- и лимфосорбции УО «Белорусский Государственный медицинский университет» и НПЦ «ЛОТИОС» по теме: «Разработка селективного биоспецифического антилипополисахаридного гемосорбента и освоение его промышленного выпуска» (№ государственной регистрации 20014660 от 28.11.2001), срок выполнения – 2001-2005 гг.

Тема диссертационного исследования соответствует п.п.2.2, 3.7, 4.1 и 4.2 «Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг.» (постановление Совета Министров РБ от 19.04.2010 г. № 585).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: Изучить медико-биологические свойства и разработать метод лечения сепсиса с использованием нового отечественного антилипополисахаридного гемосорбента, обладающего свойством элиминации эндотоксина грамотригативных бактерий.

Задачи исследования:

1. Провести экспериментальные исследования по оценке гемосовместимости полимиксин-сшитого гемосорбента в условиях стендовой гемосорбции (IN VITRO):

- изучить динамику цитологических показателей;
- изучить динамику гемостазиологических показателей;

2. Исследовать сорбционную емкость разработанного гемосорбента в экспериментах на животных (IN VIVO).

3. Исследовать динамику показателей гемодинамического, гемостатического гомеостаза, при проведении гемосорбции у пациентов с сепсисом.

4. Оценить клиническую эффективность и эксплуатационные характеристики гемосорбента при проведении экстракорпоральной детоксикации, а также возможность его широкого клинического применения.

Научная новизна

1. Впервые установлены высокие показатели гемосовместимости отечественного анти-ЛПС гемосорбента на основе сшитого полимиксина показали его высокую гемосовместимость;

2. В экспериментах на животных доказано, что введение в сосудистое русло сублетальной дозы эндотоксина, предварительно проинкубированной с анти-ЛПС гемосорбентом не оказывает негативного влияния на показатели центральной гемодинамики и ряд параметров гомеостаза.

3. Впервые показана клиническая эффективность разработанного анти-ЛПС гемосорбента на основе сшитого полимиксина в группе пациентов с сепсисом, выражающаяся в уменьшении проявлений функционально-метаболических нарушений со стороны жизненно важных систем поддержания гомеостаза.

Положения, выносимые на защиту

1. Антилипополисахаридный гемосорбент на основе сшитого полимиксина обладает хорошей гемосовместимостью. При применении данного гемосорбента не происходит изменения цитологических и гемостазиологических показателей крови.

2. Разработанный на основе полимерного гидрогелевого полиакриламидного носителя с ковалентно иммобилизованным полимиксином В/колистином антилипополисахаридный гемосорбент, обладает удовлетворительной сорбционной емкостью в отношении эндотоксина *E. coli*, что проявляется купированием гемодинамических, цитологических и биохимических нарушений у экспериментальных животных.

3. Антилипополисахаридный гемосорбент на основе сшитого полимиксина обладает выраженной клинической эффективностью, способствуя стабилизации гемодинамической ситуации, уменьшению проявлений функционально-метаболических нарушений со стороны жизненно важных систем поддержания гомеостаза.

4. Применение анти-ЛПС гемосорбента у пациентов с септическим шоком различного генеза способствует сокращению сроков пребывания пациентов в отделениях интенсивной терапии и реанимации.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором и научными руководителями были определены цели, задачи, методы и объем исследования. Экспериментальная часть исследования выполнена в НПЦ «ЛОТИОС», УО «Белорусский Государственный медицинский университет», Проведены обследование 80 пациентов с сепсисом, проходившим лечение в ГУ «432 Главный военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил

Республики Беларусь» и УЗ «9-я Городская клиническая больница г. Минска» (вклад автора – 100%).

Сбор сведений о пациентах, обработка данных, анализ и формулировка выводов выполнена автором лично (вклад – 90%).

Впервые применена методика лечения сепсиса и септического шока с использованием нового отечественного антилипополисахаридного гемосорбента на основе сшитого полимиксина (вклад от 50 до 70%).

Результаты клинического раздела, изложенные в диссертации и отражены в публикациях, получены автором лично [1, 2, 3].

Исследование гемосовместимости, сорбционной емкости, и характера лечебного действия антилипополисахаридного гемосорбента у пациентов с сепсисом представлены в статьях и материалах конференций (вклад диссертанта – 60%) [1, 2, 3].

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований опубликованы на Восьмой Международной конференции «Актуальные аспекты экстракорпорального очищения крови в интенсивной терапии» (Москва, 2012); 4-я Международная научно-практическая конференция «Экстракорпоральная гемокоррекция в интенсивной терапии критических состояний» (Минск, 2013); Белорусско-польские дни хирургии (Каменюки, 2013); Выступление на Белорусской ассоциации хирургов г.Минска и Минской области (Минск, октябрь 2013); «Актуальные вопросы нефрологии, диализа, хирургических методов гемакоррекции и гемафереза» (Москва- Углич, 2014).

Результаты работы внедрены в учреждении здравоохранения Республики Беларусь (1 акт внедрения), и государственном учреждении вооруженных сил Республики Беларусь (1 акт внедрения).

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ. Из них: 3 – статьи в рецензируемых изданиях, включенных в перечень ВАК (общим объемом 1,1 авторский лист), 6 – материалы конференций и тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 90 страницах, содержит 11 таблиц на 13 страницах, 13 рисунков на 13 страницах, состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 главы собственных исследований, заключения, рекомендациям по практическому применению, списка используемой литературы, включающего 151 литературный

источник (англоязычные источники – 123, и русскоязычные – 28), 9 – публикаций по теме диссертации, 5 приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Общий анализ крови оценивали с помощью анализатора Coulter® A© Tdiff™ Analyzer (Beckman, США) реактивами фирмы P.Z. Cormay (Poland). Изучали гематокритное число MCV (mean corpuscular volume), концентрацию гемоглобина Hb (hemoglobin), среднее содержание гемоглобина в эритроците MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), количество эритроцитов и лейкоцитов.

Анализ лейкоцитарной формулы проводили микроскопическим методом с использованием иммерсионной системы и биномолекулярного микроскопа JE-NAVAL, а также гематологического счетчика.

Определение концентрации в сыворотке крови осуществляли:

- мочевины – стандартным кинетическим уреазным методом с использованием фотометров Easy Lyte («Medica», США);
- креатинина – кинетическим методом с использованием фотометров Easy Lyte («Medica», США);
- электролитного баланса, – ионоселективным методом с использованием радиометра Easy Lyte («Medica», США);
- общего белка – биуретовым методом с помощью фотометров Easy Lyte («Medica», США).
- альбумина – колориметрическим методом с помощью фотометров Easy Lyte («Medica», США).
- средних молекул – методом прямой спектрофотометрии с помощью фотометров Easy Lyte («Medica», США).

Изучение баланса в системе «протеиназы-ингибиторы протеиназ» производили по уровню протеолитической активности и содержанию компонентов анти-протеолитического потенциала плазмы экспериментальных животных методом комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α_1 -ингибитора протеиназ и α_2 -макроглобулина – по расщеплению синтетического субстрата Na-бензоил-L-аргинин-p-нитроанилида. Состояние вторичного гемостаза оценено на коагулологическом анализаторе ACL 7000 («Instrumentation Laboratory», США).

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с использованием программы статистических расчетов STATISTICA (версия 10.0). Достоверность различий между сравниваемыми выборками в динамике оценивалась при помощи критерия Стьюдента и теста Фридмана. Связь изучаемых параметров определяли медианным методом. Исследуемые данные пред-

ставлены в виде среднего арифметического \pm стандартного отклонения. Уровень значимости $p < 0,05$ позволял судить о достоверных данных.

Оценка гемосовместимости (IN VITRO)

Изучение влияния анти-ЛПС гемосорбента на показатели крови проведено в условиях модельной гемосорбции (*in vitro*) на крови 18 здоровых доноров. В процессе исследования использовали донорскую кровь, пропущенную через массообменный модуль, содержащий антибиотик полимиксин В. Оценивали влияние гемосорбции на цитологические, биохимические, гемостазиологические показатели.

Экспериментальная часть (IN VIVO)

В соответствии с целью и задачами исследования проведены экспериментальные исследования на 16 здоровых кроликах обоих полов породы «Шиншилла» массой 2,5-3,5 кг, распределенных на две равные серии: контрольную и опытную.

Животных содержали в условиях вивария под клинико-ветеринарным наблюдением. Операции выполняли с соблюдением правил асептики и антисептики. С целью моделирования септического шока, за 12 часов до опыта, животных лишали корма, оставляя им свободный доступ к воде. После проведения анестезии в асептических условиях обнажали правую или левую бедренную артерию, препарировали и катетеризировали ее интравенозной канюлей, которую соединяли с механическим манометром и регистрировали в течение 10 минут исходное АД, а затем в течение 3 минут вводили в ушную вену 30 мл 0,9% раствора NaCl для инъекций с липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* 0,5 мг/кг массы животного, который был предварительно проинкубирован с гемосорбентом в объемном соотношении 2:1 в течение 1 часа при температуре 37⁰С (опытная серия), или такой же раствор ЛПС, но без инкубации с сорбентом (контрольная серия). Мониторинг среднего артериального давления осуществляли на протяжении 2 часов после чего рану послойно ушивали. Перед проведением эксперимента всех животных взвешивали, тщательно осматривали на наличие видимой патологии и признаков болезни. Животные с выявленной патологией выбраковывали и в эксперимент не включали.

Взятие крови для исследований проводили в следующие временные интервалы: непосредственно после пункции бедренной артерии, через 5 минут и два часа после окончания введения раствора эндотоксина.

Исследовали изменение следующих гемодинамических параметров при моделировании септического шока:

1. артериальное давление систолическое – АД (max);
2. артериальное давление диастолическое – АД (min);
3. артериальное давление среднее – САД;
4. частота сердечных сокращений – ЧСС;

5. белковый обмен;
6. углеводный обмен;
7. протеолитическую активность сыворотки крови;

С целью выявления патологического изменения цитологических параметров осуществляли подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов и их популяционный состав, а также определяли содержание гемоглобина, гематокритное число и оценивали качественные изменения клеток крови кондуктометрическим методом.

Белковый обмен в плазме кроликов оценивали путем определения концентрации общего белка и альбумина колориметрическим, биуретовым методом; содержания мочевины и креатинина – уреазным методом; маркеров эндогенной интоксикации – среднемолекулярных пептидов – спектрофотометрическим методом.

Клиническая часть

В исследование были включены 80 пациентов: 44 мужчины и 36 женщин, в возрасте от 18 до 89 лет, с диагнозом сепсис. Все пациенты были разделены на две группы. В основную группу вошли 40 пациентов с сепсисом, которым проводили интенсивную терапию с применением анти-ЛПС гемосорбента. В основной группе мужчин было – 22 (58,1%), женщин – 18 (41,8%). Средний возраст пациентов составил $54,8 \pm 12,1$ года.

В группу сравнения вошли 40 пациентов с сепсисом, у которых комплекс лечебных мероприятий не включал применение анти-ЛПС гемосорбента.

Всем пациентам проводили терапию в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 200 и протоколом оказания медицинской помощи п. А-4.9 от 2004 года в отделении интенсивной терапии, включающих инфузию лекарственных средств, обеспечивающих, в том числе повышение периферического сосудистого тонуса и ударного объема. Объем перфузии крови за одну гемосорбцию (ГС) – 5400 ± 120 мл.

До начала комплексной терапии с применением биоспецифического анти-ЛПС гемосорбента, а также до- и после ГС определяли следующие показатели: частоту сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление (АД; систолическое, диастолическое, среднее), количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемограмму, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПТИ), международное нормализованное отношение (МНО). Одновременно с этим изучали уровень общего белка, альбумина, фибриногена, мочевины, креатинина, АЛТ, АСТ.

Перед началом манипуляции, пунктировали и катетеризировали одну из центральных вен двухпросветным катетером, вводили 5000 ЕД гепарина. Подключение экстракорпорального контура осуществляли с соблюдением правил асептики и антисептики.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характер влияния антилипополисахаридного гемосорбента на показатели крови доноров в условиях модельной гемосорбции (IN VITRO)

Пробы донорской крови для анализа брали до начала перфузии, затем – через 30, 60, 90 и 120 минут после начала сорбции. Пропущенную через полиакриламидный носитель без антибиотика кровь использовали в качестве контрольной серии. При проведении эксперимента осуществляли подсчет количества эритроцитов, тромбоцитов лейкоцитов, их популяционный состав, а также определяли содержание гемоглобина, гематокритное число и оценивали качественные изменения клеточного состава крови в процессе перфузии.

Абсолютное большинство расчетных показателей клеток крови ни в контрольной, ни в опытной сериях эксперимента не претерпевали существенных отклонений от своих исходных величин.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что в условиях модельной гемоперфузии анти-ЛПС гемосорбент не вызывает каких-либо существенных изменений в клеточном составе крови, что, наряду с аналогичным влиянием полиакриламидной гидрогелевой матрицы, позволяет сделать вывод об удовлетворительной гемосовместимости как самого носителя, так и готового изделия при их использовании в реальном режиме гемоперфузии.

Согласно полученным данным, при изучении агрегационных свойств тромбоцитов в исходном состоянии отмечалось два типа развития агрегационного процесса в ответ на действие индуктора аденозинфосфата (АДФ): нормо- и гиперагрегация. Нормальная агрегация тромбоцитов, которая выявлялась у 50% доноров, характеризовалась наличием обратимой (первичной) агрегации с последующей дезагрегацией в ответ на низкую дозу индуктора (0,5 мкмоль/л) и развитием необратимой (секреторной) двухфазной двухволновой агрегации тромбоцитов в ответ на высокую дозу АДФ (1,5 мкмоль/л). Гиперагрегация тромбоцитов (50% доноров) отличалась развитием необратимой двухфазной двухволновой или двухфазной одноволновой агрегации тромбоцитов в ответ как на высокую, так и на низкую дозы индуктора.

Агрегация у доноров, имеющих в исходном состоянии нормальную агрегацию, во все сроки исследования оставались без изменений. Эти же показатели агрегационной активности тромбоцитов у доноров с исходной гиперагрегацией достоверно снижались после 30 минут сорбции. К концу исследования (120 мин) активность тромбоцитов, индуцируемая высокой дозой АДФ, была приближена к исходному состоянию, а низкой дозой АДФ – оставалась достоверно сниженной. Время агрегации при использовании малых доз АДФ сохранялось неизменным, а при дозе 1,5 мкМ отмечалась тенденция к

уменьшению на протяжении всего периода исследования, однако статистически достоверных различий не регистрировались.

В опытной серии сохранялась общая направленность изменений агрегационных параметров тромбоцитов.

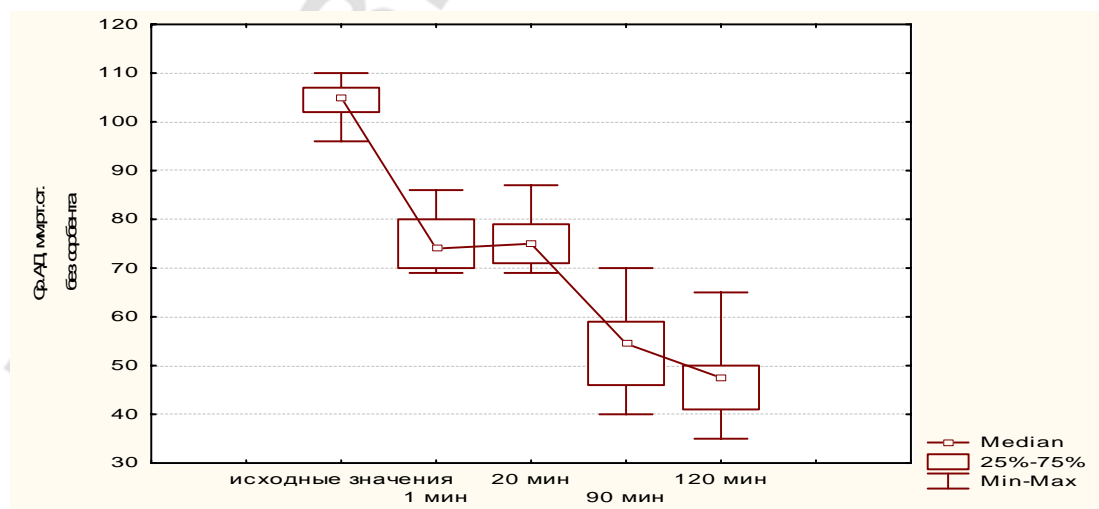
Анализ агрегатограмм эритроцитов не выявил существенных различий в их способности к агрегации как при прохождении крови через полиакриламидный гидрогель, так и анти-ЛПС гемосорбент, независимо от продолжительности перфузии.

Таким образом, данные, полученные при исследовании влияния ГС на первичный гемостаз, свидетельствуют, что процесс сорбции не влияет на агрегационные характеристики эритроцитов и тромбоцитов с исходно нормальной агрегацией, оказывая ингибирующее влияние на тромбоциты с исходно повышенной агрегационной активностью.

Характер клинико-лабораторных эффектов, регистрируемых при перфузии крови через анти-ЛПС гемосорбент у экспериментальных животных с моделируемым сепсисом

Согласно полученным данным, исходные величины среднего АД у кроликов, которым инфузия сублетальной дозы эндотоксина (ЭТ), растворенной в 0,9% растворе NaCl для инъекции, осуществлялась без обработки гемосорбентом, составили $102,3 \pm 5,54$ мм рт.ст. (рисунок 1), и, соответственно, $94,0 \pm 5,84$ мм рт.ст. – для кроликов, где эндотоксин обрабатывали гемосорбентом с полимиксином В/колистином (рисунок 2).

Введение в сосудистое русло физиологического раствора с сублетальной дозой эндотоксина приводило к развитию сепсиса с резким падением артериального давления до $75,5 \pm 8,62$ мм рт.ст.



* – различия достоверны при $P < 0,05$ по сравнению с исходным состоянием

Рисунок 1. – Динамика изменения среднего АД у кроликов без инкубации с гемосорбентом (медианный метод)

В течение 30 минут после этого среднее АД животных стабилизировалось на этом уровне, после чего отмечалось дальнейшее нарастание гипотонии и к концу эксперимента давление снижалось до $59,5 \pm 12,12$ мм рт.ст., в результате чего 4 животных погибло.

Введение раствора сублетальной дозы эндотоксина экспериментальным животным после его предварительной инкубации с анти-ЛПС гемосорбентом не оказывало существенного влияния на показатели центральной гемодинамики, что подтверждалось стабильностью значений среднего АД.

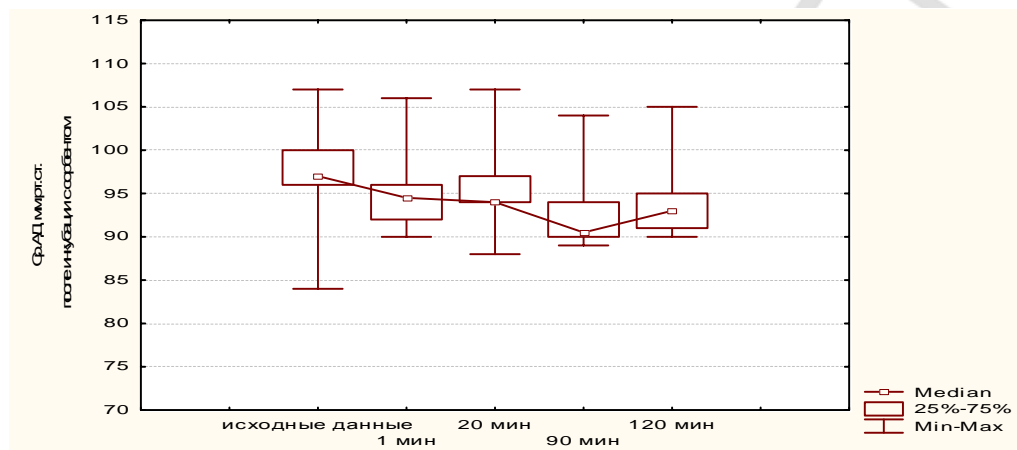


Рисунок 2. – Динамика изменения среднего АД у кроликов после инкубации с гемосорбентом (медианный метод)

В процессе исследования оценена динамика изменения клеточного состава периферической крови кроликов опытной и контрольной серии.

Животным первой серии вводили эндотоксин, а животным второй серии – эндотоксин, предварительно проинкубированный с анти-ЛПС гемосорбентом.

Количество лейкоцитов в обеих сериях статистически достоверно снижалось уже через 5 минут после введения раствора эндотоксина, причем такая тенденция сохранялась до окончания эксперимента (120 минут). Снижение данного показателя относительно изначальных величин в контрольной серии эксперимента было более выраженным, чем в опытной. Параллельно отмечено достоверное уменьшение количества моноцитов в обеих сериях. Схожая динамика наблюдалась и в отношении количества гранулоцитов.

Сразу после введения ЭТ наблюдалось резкое снижение числа тромбоцитов, что характерно для ранних стадий эндотоксикоза (причем снижение носило более выраженный характер в контрольной серии). В дальнейшем количество кровяных пластинок увеличивалось, но не достигало изначального уровня. Полученные результаты свидетельствовали о том, что на ранних стадиях эндотоксикоза не происходило достоверно значимых изменений со стороны показателей красной крови.

Иная картина наблюдалась в отношении показателей белой крови. В ходе эксперимента было установлено, что введение экспериментальным животным ЭТ с инкубацией с гемосорбентом и без нее вызывают лейкопению, лимфоцитоз, моноцитопению и гранулоцитопению.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности анти-ЛПС гемосорбента в связывании эндотоксина, что проявлялось в заметном снижении его воздействия на форменные элементы крови.

Как показали результаты исследования, содержание общего белка и альбумина через 5 минут после введения раствора ЭТ незначительно снижалось и продолжало оставаться на этом уровне через 2 часа эксперимента, как в экспериментальной, так и в опытной сериях. При этом величина регистрируемых изменений однозначно указывает на гемодилуцационный генез белковых фракций, обусловленный проводимой инфузией раствора эндотоксина. В ходе исследования зарегистрировано некоторое снижение содержания мочевины и значительное (более, чем в 2,5 раза) увеличение концентрации креатинина ($P < 0,05$). Таким образом, инкубация ЭТ с разработанным на основе иммобилизованного полимиксина В/колистина гемосорбентом, приводит к снижению концентрации ЭТ и, как следствие, уменьшению его системного нефротоксического действия, о чем свидетельствует сохранившаяся на уровне исходных значений концентрация креатинина в опытной серии.

В ходе проведенного исследования через 2 часа после инфузии раствора ЭТ было установлено некоторое увеличение активности аланин- и аспаргатаминотрансфераз (АЛТ и АСТ, соответственно) в обеих сериях эксперимента.

Наиболее выраженные изменения были зарегистрированы при исследовании концентрации глюкозы. Известно, что формирование состояния гиперметаболизма при сепсисе сопровождается повышенным потреблением энергии, происходит стимуляция глюконеогенеза, а гликолиз резко уменьшается, что приводит к гипергликемии, гиперлактатемии при резистентности к инсулину. С этой точки зрения, динамика изменения концентрации глюкозы в эксперименте может служить своеобразным критерием эффективности сорбции эндотоксина на анти-ЛПС гемосорбенте.

Уже через 5 минут после введения раствора ЭТ значение этого показателя в обеих сериях не отличались от исходных данных. Но через 2 часа уровень глюкозы в контрольной серии был достоверно повышен (почти в 2 раза), по сравнению с опытной серией, что носит статистически достоверный характер. Данное изменение указывает на то, что из раствора, предварительно проинкубированного с анти-ЛПС гемосорбентом, произошла элиминация ЭТ.

Повышение протеиназной активности плазмы крови регистрировалось уже через 5 минут после введения в кровоток кроликам раствора ЭТ, уровень трипси-

нопордбная активность плазмы крови повышался в 2 раза. В последующие интервалы наблюдения (2 часа и 1 сутки после введения раствора ЭТ) отмечалось достоверное повышение исследуемого показателя. При этом содержание α -антитрипсина (α -АТ), несколько возрастало: через 2 часа после введения раствора ЭТ и к концу эксперимента (к 1 суткам) – на 25% и 45%, соответственно.

В то же время, через 2 часа после введения ЭТ отмечалась некоторая тенденция к снижению содержания α -АТ и достоверное снижение содержания α 2 – макроглобулинов (α 2-МГ), основного ингибитора протеаз, ограничивающего выраженность протеолитических реакций.

В серии животных, которым вводили раствор ЭТ после инкубации с сорбентом, динамика изменения ТПА плазмы совпадала с таковой в контрольной серии, однако повышение этого показателя было менее выраженным во все сроки исследования.

Анализ результатов исследования показал, что при моделировании сепсиса у кроликов биоспецифическая гемосорбция на анти-ЛПС гемосорбенте приводит к снижению трипсиноподобной активности плазмы крови, обусловленное введением эндотоксина.

Характер лечебного действия анти-ЛПС гемосорбента у пациентов с сепсисом

Среди заболеваний, которые приводили к развитию сепсиса, в обеих группах исследования преобладали некротизирующий панкреатит – 71,0% и перитонит – 28,9%.

Несмотря на выполненные хирургические вмешательства по устранению, санации и дренированию гнойно-септических очагов, а также проводимую медикаментозную терапию, к началу применения биоспецифического анти-ЛПС гемосорбента (рисунок 3) состояние пациентов обеих групп оценивалось как крайне тяжелое (APACHE II – $16,3 \pm 1,4$ баллов, SOFA – $5,2 \pm 1,0$ баллов). В послеоперационном периоде у пациентов грубые функционально-метаболические нарушения продолжали быстро нарастать. Такой симптомокомплекс традиционно описывается как сепсис.

У всех пациентов отмечали бледность и влажность кожных покровов, акроцианоз. Большинство пациентов находилось в состоянии эйфории, неадекватно оценивало окружающую обстановку. У всех пациентов основной и контрольной групп регистрировалась выраженная гипотензия. В обеих группах наблюдали появления острого респираторного дистресс синдрома взрослых. У пациентов с разлитым гнойным перитонитом отмечены явления выраженного динамического илеуса, что сопровождалось обильным отделяемым по зонду застойного желудочного содержимого. Фактически у всех пациентов зарегистрирована коагулопатия, при которой АЧТВ составлял >60 с или МНО $>1,5$. Из крови

в 40% случаев выявлялся *Acinetobacter spp.*, в 60% случаев – *Pseudomonas aeruginosa*, у части пациентов отмечено сочетание нескольких видов микроорганизмов.



Рисунок 3. – Антилипополисахаридный гемосорбент «Липосорб» на основе сшитого полимиксина

Как показали проведенные исследования, выполнение перфузии крови через массообменный модуль с ковалентно пришитым анти-ЛПС гемосорбентом со скоростью 60 ± 10 мл/минут способствовало улучшению тканевой перфузии, что сопровождалось уменьшением выраженности цианоза кожных покровов у пациентов основной группы.

Наряду с этим, в постсорбционном периоде у пациентов основной группы уже после однократно проведенной ГС отмечено уменьшение частоты и выраженности озноба, у части прояснялось сознание, что сочеталось с заметным улучшением самочувствия. Существенным показателем положительного эффекта манипуляции стало повышение общего периферического сосудистого сопротивления, что приводило к достоверному повышению максимального и, что особенно важно, минимального артериального давления. Следует отметить, что в постсорбционном периоде практически у всех пациентов основной группы было отмечено повторное уменьшение минимального артериального давления на следующие сутки сорбции. Проведение повторных гемосорбций позволило перевести пациентов на вспомогательный режим вентиляции легких с последующим отлучением от ИВЛ.

Клинический эффект от ГС на антилипополисахаридном гемосорбенте проявлялся также в виде достоверного увеличения почасового диуреза.

В отдельных ситуациях уже во время проведения сеанса ГС прояснялось сознание, исчезала тахикардия, восстанавливался пассаж по кишечнику, что сочеталось с заметным улучшением самочувствия пациентов.

В других случаях положительная клиническая динамика была не столь явной. У пациентов группы сравнения показатели среднего артериального давления оставались в пределах – $60 \pm 2,1$ мм рт.ст и $40 \pm 6,5$. В процессе проведения интенсивной терапии, на пятые сутки исследования, было отмечено нарастание тахикардии – с 130 ± 13 уд/мин. до 150 ± 16 уд/мин., в среднем в группе. Также отмечалось сохранение температуры в пределах $38,4 \pm 1,0$ и $38,6 \pm 1,0$ t°C.

У пациентов, которым не проводилась комплексная терапия с применением анти-ЛПС гемосорбента прогрессировала дыхательная недостаточность, сатурация гемоглобина составляла 76%-85% в 99% случаев. Данная категория больных находилась на продленной искусственной вентиляции легких.

Отдельно следует отметить нарастание лейкоцитоза до $21,0 \pm 1,0$ 10^9 /л., снижение гемоглобина – с $110 \pm 10,0$ г/л до $70 \pm 3,2$ г/л., и тромбоцитов – с $200 \pm 2,1$ 10^9 /л до $110 \pm 2,1$ 10^9 /л., уменьшение почасового диуреза (вплоть до анурии), что свидетельствовало о прогрессировании полиорганной недостаточности. У части пациентов полиорганная недостаточность прогрессировала, что привело к их гибели несмотря на проводимую интенсивную терапию.

Двухкратное включение в комплексную терапию сепсиса гемосорбции приводило к стабилизации функционально-метаболических отклонений у 9 пациентов основной группы (20,9%), что позволило исключить искусственную вентиляцию легких, и, в конечном итоге, перевести пациентов в хирургическое отделение на 5 сутки после заболевания. У 30 пациентов основной группы (69,7%), несмотря на снижение дозы лекарственных средств, обеспечивающих повышение периферического сосудистого тонуса, грубые нарушения гемодинамики сохранялись, так как полностью не представлялось возможность санировать гнойные очаги, что потребовало многократного применения гемосорбции (6-8 процедур). У 4 пациентов (9,3%) комплексная терапия по предложенной схеме не дала заметного эффекта, и они умерли при явлениях нарастания полиорганной недостаточности.

В результате исследования было установлено, что наиболее выраженным клинический эффект был у молодых пациентов (до 45 лет) в тех случаях, когда в процессе операции удавалось достичь радикального устранения источника перитонита, а также адекватной санации брюшной полости и интраинтестинального пространства. При этом наблюдалось стойкое снижение эндогенной интоксикации без тенденции к повторному ее углублению в постсорбционном периоде.

Согласно полученным данным, сравнительное изучение биохимических параметров до и после гемосорбции на разработанном анти-ЛПС гемосорбенте не

выявило достоверных изменений со стороны белковых фракций крови. Тем не менее, в постсорбционном периоде отмечено недостоверное повышение уровня альбумина за счет снижения протеолитической активности, и такое же снижение уровней фибриногена и мочевины плазмы крови в результате блокирования каскадных реакций. Следует так же отметить значительное снижение при этом концентрации креатинина плазмы крови, что указывало на эффективность проводимой терапии. Кроме того, происходило снижение уровня сывороточного калия, а также активности трансаминаз. Уровень МНО увеличился в 1,5 раза, что свидетельствовало о повышении свертываемости крови по сравнению с исходными данными, уровень АЧТВ претерпевал незначительные изменения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработанный гемосорбент обладает хорошей гемосовместимостью.

В процессе его использования не происходит достоверного уменьшения количества форменных элементов крови (эритроциты – $3,74 \pm 0,19 \times 10^{12}/\text{л}$; лейкоциты – $4,5 \pm 0,32 \times 10^9/\text{л}$; тромбоциты – $182 \pm 12,3 \times 10^9/\text{л}$; лимфоциты – $26,7 \pm 2,0\%$; моноциты – $5,8 \pm 0,6\%$; гранулоциты – $67,5 \pm 2,29\%$), гемоглобина ($126 \pm 4,6$ г/л) и уровня гематокрита ($35,6 \pm 1,2\%$). Его применение не оказывает негативного влияния на показатели свертывающей системы крови (активное частичное тромбопластиновое время с $31,1 \pm 1,72$; фибриноген г/л $2,9 \pm 0,38$; протромбиновое время с $10,3 \pm 0,44$), что важно для медицинского изделия, область применения которого предполагает наличие изначальных существенных отклонений клеточного, гемостазиологического и агрегационного гомеостаза организма [1].

2. Разработанный гемосорбент обладает выраженным сорбционным потенциалом к токсину грамотрицательной микрофлоры. Введение животным сублещальной дозы эндотоксина после инкубации его с гемосорбентом не оказывает влияния на показатели центральной гемодинамики, что свидетельствует об эффективном извлечении такового из крови [2].

3. Включение в комплексную терапию пациентов с септическим шоком различного генеза антилипополисахаридного гемосорбента на основе сшитого полимиксина приводит в 70,6 % случаев к стабилизации гемодинамической ситуации, при этом в основной группе пациентов отмечено повышение артериального давления с $109 \pm 1,0/66 \pm 1,3$ до $120 \pm 1,3/70 \pm 0,4$. Наряду с этим выявлено снижение частоты сердечных сокращений с $104,8 \pm 12,1$ до $85,2 \pm 6,4$. В постсорбционном периоде установлено уменьшение выраженности функционально-метаболических нарушений со стороны жизненно важных систем поддержания гомеостаза, о чем свидетельствовало увеличение почасового диуреза с 25 ± 10 мл/ч до 45 ± 10 мл/ч, увеличение международного нормализованного отношения с 1,4 до 2,33, снижение фибриногена с 4,92 до 4,25 [3].

4. Применение анти-ЛПС гемосорбента способствует сокращению срока пребывания пациентов в отделениях интенсивной терапии (с 21 ± 2 до 10 ± 4 суток) [3].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Гемосорбция на анти-ЛПС гемосорбенте может являться компонентом комплексной терапии всех пациентов с различными формами и стадиями хирургического сепсиса

Перед перфузией массообменный модуль промывать пятикратным объемом стерильного раствора NaCl-0,9% для инъекций «на слив». Рекомендуемое направление потока – сверху вниз. Раствор из колонки подлежит сливу путем замещения его кровью. Подключение экстракорпорального контура осуществлять с соблюдением правил асептики и антисептики. Перед гемосорбцией производить внешний осмотр массообменного модуля: соответствие показателей этикетки настоящей инструкции, целостности модуля.

Показания к применению:

1. Сепсис.
2. Разлитой гнойный перитонит.
3. Некротизирующий панкреатит.
4. Гипотония, обусловленная бактеремическим шоком.

Противопоказания к применению:

1. Абсолютные:
 - агональное состояние пациента.
 - продолжающееся кровотечение.
2. Относительные:
 - наличие потенциальных источников кровотечения (эрозивный гастрит, не зарубцевавшаяся язва и.т.д.).
 - гипотония, вызванная гиповолемией, является временным противопоказанием, и после восполнения ОЦК и компенсацией сердечной деятельности проведение гемосорбции является безопасным.

Клинико-лабораторная оценка эффективности:

- Общее состояние пациента.
- Показатели гемодинамики.
- Общий анализ крови (эритроциты, лейкоциты, формула крови).
- Показатели белкового метаболизма.
- Протеолитическая активность плазмы крови до и после манипуляции [3].

Список публикаций соискателя ученой степени

Статьи

1. Антилипополисахаридный гемосорбент на основе сшитого полимиксина. Сообщение № 1. Исследование гемосовместимости в модельных опытах / В. Н. Гапанович, В. В. Кирковский, Д. С. Третьяк, В. П. Голубович, О. Н. Куцук, А. В. Старостин, Н. И. Мельнова, С. В. Андреев // Воен. медицина. – 2012. – № 3. – С. 98–102.
2. Антилипополисахаридный гемосорбент на основе сшитого полимиксина. Сообщение № 2. Исследование сорбционной эффективности гемосорбента в экспериментах *in vivo* / В. Н. Гапанович, В. В. Кирковский, Д. С. Третьяк, В. П. Голубович, О. Н. Куцук, А. В. Старостин, Н. И. Мельнова, С. В. Андреев // Воен. медицина. – 2013. – № 2. – С. 92–96.
3. Антилипополисахаридный гемосорбент на основе сшитого полимиксина. Сообщение №3. Характер лечебного действия антилипополисахаридного гемосорбента «ЛИПОСОРБ» у пациентов с инфекционно-токсическим шоком различного генеза / В. В. Кирковский, В. Н. Гапанович, Д. С. Третьяк, А. В. Старостин, А. И. Добриянец, С. В. Андреев, Н. И. Мельнова // Воен. медицина. – 2013. – № 3. – С. 97–100.

Материалы конференций и тезисы докладов

4. Полимиксин-пришитый гемосорбент в коррекции нарушения функции почек при септическом шоке / В. В. Кирковский, А. В. Старостин, Г. Н. Бычко, Г. А. Лобачева, Д. С. Третьяк // Актуальные аспекты экстракорпорального очищения крови в интенсивной терапии : тез. восьмой междунар. конф., Москва, 31 мая–1 июня 2012 г. / НЦССХ им. Бакулева. – Москва, 2012. – С. 73.
5. Кирковский, В. В. Сорбционные методы коррекции гомеостаза / В. В. Кирковский, Г. А. Лобачева, Д. С. Третьяк // VEDA A VZNIK : materiály XI mezinárodní vědecko – praktická konference. – Praga, 2012/2013. – S. 77.
6. Гапанович, В. Н. Исследование гемосовместимости и сорбционной емкости полимиксин-сшитого антилипополисахаридного гемосорбента в стендовых опытах / В. Н. Гапанович, Д. С. Третьяк, В. В. Кирковский, А. В. Старостин // Экстракорпоральная гемокоррекция в интенсивной терапии критических состояний : тез. докл. 6-й междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23 мая 2013 г. – Минск, 2013. – С. 38–40.
7. Характер лечебного действия полимиксин пришитого гемосорбента в лечении септического шока различного генеза / В. В. Кирковский, Д. С. Третьяк, А. В. Старостин, А. И. Добриянец, В. Н. Гапанович, Г. А. Лобачева // Экстракорпоральная гемокоррекция в интенсивной терапии критических

состояний : тез. докл. 6-й междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23 мая 2013 г. – Минск, 2013. – С. 69–71.

8. Исследование гемосовместимости и сорбционной емкости полимиксин-сшитого антилипополисахаридного гемосорбента в стендовых опытах / Д. С. Третьяк, В. Н. Гапанович, В. В. Кирковский, А. В. Старостин // Белорусско-польские дни хирургии : сб. материалов VI Междунар. науч.-практ. симп., Гродно, 31 мая 2013 г. / редкол.: П. В. Гарелик [и др.]. – Гродно, 2013. – С. 36–38.

9. Опыт сочетанного применения антипротеиназного и полимиксинового гемосорбентов в комплексном лечении пациентов с деструктивным панкреатитом и абдоминальным сепсисом / В. В. Кирковский, Д. С. Третьяк, А. В. Старостин, Г. Н. Бычко, Ф. Н. Казанцев, Г. Н. Лобачева // Актуальные вопросы нефрологии, диализа, хирургических методов гемокоррекции и гемафереза : тез. междунар. конф. – М. ; Углич, 2014. – С. 45–46.

РЭЗІЮМЭ

Траццяк Дзмітрый Станіслававіч

Медыка-біялагічныя ўласцівасці і клінічная эфектыўнасць
антыліпапалісахарыднага гемасарбента у інтэнсіўнай тэрапіі сепсісу
(эксперыментальна-клінічнае даследванне)

Ключавыя словы: сепсіс, паліміксін, анты- ЛПС гемасарбент, перфузія, эндатаксіны, інкубацыя, сепсіс, гемасорбцыя, антыліпапалісахарыдны гемасарбент на аснове пашытага паліміксіну.

Мэта даследавання: даследаваць медыка-біялагічныя ўласцівасці і распрацаваць метады лячэння сепсісу і септычнага шоку з выкарыстаннем новага айчыннага антыліпапалісахарыднага гемасарбента, які валодае ўласцівасцю элімінацыі эндатаксіна грамнегатывіўных бактэрый.

Метады даследавання і выкарыстаная апаратура: перфузія донарскай крыві праз масаабменны модуль ў эксперыменце (IN VITRO), інкубацыя крыві лабараторных жывёл з гемасарбентам ў эксперыменце (IN VIVO), гемасорбцыя з ужываннем анты-ЛПС гемасарбента ў пацыентаў з септычным шокам рознага генэзу.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: ўключэнне ў комплексную тэрапію пацыентаў з сепсісам гемасорбцыі на анты-ЛПС гемасарбенте, з улікам асаблівасці плыні паталагічнага працэсу, з'яўляецца бяспечнай і эфектыўнай медыцынскай тэхналогіяй і прыводзіць да памяншэння выяўленасці функцыянальна-метабалічных парушэнняў з боку жыццёва важных сістэм падтрымання гомеастазу.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: гемасорбцыя на анты-ЛПС гемасарбенте з'яўляецца абавязковым кампанентам комплекснай тэрапіі ўсіх пацыентаў з рознымі формамі і стадыямі хірургічнага сепсісу. Дадзены метады можа прымяняцца ў комплексе з іншымі метадамі дапаможнай карэкцыі гомеастазу арганізма.

Вобласць ужывання: анестэзіялогія - рэаніматалогія, хірургія.

РЕЗЮМЕ

Третьяк Дмитрий Станиславович

Медико-биологические свойства и клиническая эффективность антилиполисахаридного гемосорбента в интенсивной терапии сепсиса
(экспериментально-клиническое исследование)

Ключевые слова: сепсис, полимиксин, анти- ЛПС гемосорбент, перфузия, эндотоксин, инкубация, сепсис, гемосорбция, антилиполисахаридный гемосорбент на основе сшитого полимиксина.

Методы исследования и использованная аппаратура: перфузия донорской крови через массообменный модуль в эксперименте (IN VITRO), инкубация крови лабораторных животных с гемосорбентом в эксперименте (IN VIVO), гемосорбция с применением анти-ЛПС гемосорбента у пациентов с септическим шоком различного генеза.

Полученные результаты и их новизна: включение в комплексную терапию пациентов с инфекционно-токсическим шоком различного генеза гемосорбции на анти-ЛПС гемосорбенте, с учетом особенностей течения патологического процесса, является безопасной и эффективной медицинской технологией и приводит к уменьшению выраженности функционально-метаболических нарушений со стороны жизненно важных систем поддержания гомеостаза.

Рекомендации по использованию: гемосорбция на анти-ЛПС гемосорбенте является обязательным компонентом комплексной терапии всех пациентов с различными формами и стадиями хирургического сепсиса.

Данный метод может применяться в комплексе с другими методами вспомогательной коррекции гомеостаза организма.

Область применения: анестезиология – реаниматология, хирургия.

SUMMARY

Tretiak Dmitry Stanislavovich

Medico-biological properties and clinical efficacy of antilipopolsaccharide hemosorbent in intensive therapy of sepsis (experimental and clinical study)

Key words: sepsis, polymyxin, anti - LPS hemosorbent, perfusion, endotoxin, incubation, sepsis, hemosorption, antilipopolsaccharide hemosorbent based on crosslinked polymyxin B.

Aim of study: to explore the biomedical properties and to develop a method of treatment of sepsis and septic shock using the new domestic antilipopolsaccharide hemosorbent, having the property of elimination of endotoxin gram-negative bacteria.

Methods of the study and equipment used: perfusion of blood through mass transfer module in the experiment (IN VITRO), incubation of the blood of laboratory animals with hemosorbent in the experiment (IN VIVO) methods with using of anti-LPS hemosorbent in patients with septic shock of various origins.

The obtained results and their novelty: the inclusion in the complex therapy of patients with infectious-toxic shock various origins of hemosorption on anti-LPS the hemosorbent, taking into account features of the pathologic process is safe and effective medical technology and reduces the expression of functional metabolic disorders of the vital systems to maintain homeostasis.

Recommendations for use: hemosorption on anti-LPS the hemosorbent is a required component of complex therapy of all patients with various forms and stages of surgical sepsis.

This method can be used in combination with other methods of assisted correction of homeostasis of the organism.

Scope: anesthesiology and critical care, surgery.