



В.В. Минухин, О.Ю. Косилова, В.Л. Ткаченко

УРОВЕНЬ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ КАК КРИТЕРИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ЭШЕРИХИОЗНОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА

Харьковский национальный медицинский университет

Ключевые слова: перитонит, С-реактивный белок, серомукоиды, *E. coli*, гатифлоксацин, амикацин, коли-протейный бактериофаг.

Перитонит, как и другие воспалительные заболевания различного генеза, сопровождается повышением уровня острофазных белков. Анализ острофазных показателей (С-реактивный белок, серомукоид) сыворотки крови экспериментальных животных подтвердил наличие у них воспалительного процесса. Перитонит, вызванный *E. coli*, сопровождается выраженным острофазным ответом. Определение С-реактивного белка и серомукоида в динамике позволило судить об эффективности предлагаемых схем антибактериальной терапии.

Рівень білків гострої фази як критерій ефективності антибактеріальної терапії ешеріхіозного експериментального перитоніту

В.В. Минухин, О.Ю. Косилова, В.Л. Ткаченко

Перитоніт, як і інші запальні захворювання різного генезу, супроводжується підвищенням рівня гострофазових білків. Аналіз гострофазових показників (С-реактивний білок, сіромукоїд) сироватки крові експериментальних тварин підтвердив наявність у них запального процесу. Перитоніт, викликаний *E. coli*, супроводжується вираженою гострофазною відповіддю. Визначення С-реактивного білка і сіромукоїда в динаміці дозволило зробити висновок про ефективність запропонованих схем антибактеріальної терапії.

Ключові слова: перитоніт, С-реактивний білок, сіромукоїди, *E. coli*, гатифлоксацин, амикацин, коли-протейний бактериофаг.

Level of the proteins of the acute phase as criterions of the antibacterial therapy effectiveness in the *E.coli* associated experimental peritonitis

V.V. Minukhin, O.Y. Kosilova, V.L. Tkachenko

Peritonitis, as well as other inflammatory diseases of different genesis, is accompanied by the increase of the acute phase proteins level. Determination of C-reactive protein and seromucoids in a dynamics allowed to judge about efficiency of the proposed schemes of the antibacterial therapy.

Key words: peritonitis, C-reactive protein, seromucoid, *E.coli*, Gatifloxacine, Amikacin, bacteriophage.

С-реактивный белок (СРБ) – белок острой фазы, открытый первым. Он продуцируется в ответ на повреждение тканей, инфекцию или воспаление [1]. При нормальных условиях СРБ продуцируется в незначительных количествах (<1 мг/л). Однако при наличии стимулов в виде воспаления секреция СРБ резко увеличивается и может достигать пиковых значений 350–400 мг/л. В клинической практике измерения сывороточного уровня СРБ используются для диагностики и мониторинга целого ряда заболеваний, а также для оценки эффективности лечения [2,3]. Перитонит, как и другие воспалительные заболевания различного генеза, сопровождается повышением уровня острофазных белков. Например, у больных с местными формами аппендикулярного перитонита уровень СРБ был увеличен более чем в 200 раз, при распространенном перитоните – более чем 600 раз [4].

Еще одним острофазным показателем является серомукоид (орозомукоид, α -1 кислый гликопротеин). Серомукоид повышается при воспалительных процессах бактериальной и вирусной природы, в частности, его уровень повышен при аппендикулярном перитоните [5]. Уровень α -1 кислого гликопротеина повышается в несколько раз в течение острой фазы воспаления, что позволяет считать его одним из главных членов семейства острофазных белков, а измерение его концентрации в крови использовать в качестве диагностических и прогностических параметров [6]. В отличие от СРБ, имеющего короткое время полужизни в

крови, орозомукоид имеет довольно продолжительный период полужизни, составляющий около 5 дней, что позволяет считать его удачным индикатором эффективности лечения при воспалительных заболеваниях различного генеза, в частности, при перитоните, вызванном *E. coli*.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение уровня серомукоидов и СРБ в сыворотке крови экспериментальных животных для оценки степени выраженности воспалительного процесса при перитоните, вызванном *E. coli*, а также оценки эффективности различных схем антибактериальной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С-реактивный белок определяли полуколичественно иммунотурбодиметрическим методом с помощью набора реактивов фирмы «Філісіт-Діагностика» (г. Днепропетровск, Украина) в соответствии с инструкцией к набору. Определение основано на выявлении в сыворотке крови животного СРБ, взаимодействующего анти-СРБ-антителами, которые связаны с частичками латекса, с последующей преципитацией комплекса «антиген-антитело». Материалом для исследования служила свежая сыворотка крови. Забор крови на СРБ осуществляли из хвостовой вены без антикоагулянта на первые и пятые сутки с момента начала лечения. При анализе результатов исследования положительной считали пробу, в которой концентрация СРБ превышала 15 мг/л, в сыворотке крови лабораторных животных со слабopоложительной пробой уровень СРБ колебался в диапазоне 6–15

мг/л. При концентрации СРБ в исследуемых образцах менее 6 мг/л пробу считали отрицательной.

Серомукоиды определяли иммунотурбодиметрически с помощью набора реактивов фирмы «Філісіт-Діагностика» (г. Днепрпетровск, Украина) в соответствии с инструкцией к набору. Метод основан на добавлении к сыворотке крови раствора хлорной кислоты, что приводит к выпадению в осадок некоторых белков. При этом серомукоиды остаются в растворе, из которого осаждаются фосфорно-вольфрамовой кислотой. По степени помутнения реакционного раствора делают выводы о содержании серомукоидов в сыворотке крови. Диапазон помутнения – от 0 ед. S-H до 15 ед. S-H. (по Shank и Hoagland). Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови на СРБ осуществляли из хвостовой вены без антикоагулянта на третьи и пятые сутки с момента начала лечения.

Таблица 1

Содержание серомукоидов в сыворотке крови

Группы животных	Сутки наблюдения	
	3 сутки	5 сутки
Контрольная группа	4,3	4,3
Животные с перитонитом	4,4	4,4
1 группа (амикацин)	4,1	4,2
2 группа (гатифлоксацин)	4,0	4,0
3 группа (амикацин, гатифлоксацин)	4,4	3,9
4 группа (амикацин, бактериофаг)	4,3	5,0
5 группа (гатифлоксацин, бактериофаг)	3,8	4,0
6 группа (амикацин, бактериофаг, гатифлоксацин)	3,4	3,8

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень серомукоида в крови животных с перитонитом определяли на третьи и пятые сутки после начала терапии (табл. 1). У нелеченных животных с перитонитом, вызванным *E. coli*, уровень серомукоида незначительно превышает показатель контрольной группы, что свидетельствует о развитии воспаления. Снижение содержания серомукоида в крови животных под воздействием антибактериальной терапии указывает на эффективность лечения. Наибольшая эффективность характерна для комбинированной терапии амикацином, бактериофагами и гатифлоксацином, на что указывает достоверное снижение исследуемого показателя. Менее выраженная положительная динамика затихания воспалительного процесса при перитоните характерна для животных пятой группы, получавших в качестве антибакте-

риальной терапии гатифлоксацин и бактериофаг. У данных животных наблюдается менее радикальное снижение уровня серомукоида в крови, по сравнению с показателем мышей шестой группы. Незначительное затухание воспалительного процесса характерно для животных первой и второй групп, которые подвергались монотерапии амикацином и гатифлоксацином соответственно.

Эффект комбинации амикацина и гатифлоксацина на выраженность воспалительного процесса не заметен на третьи сутки после начала лечения, но отмечен на пятые сутки, о чем свидетельствует снижение уровня серомукоида до 3,9 S/H. Повышение уровня серомукоида до 5,0 S/H у животных 4 группы указывает на дальнейший прогресс заболевания и, как следствие, неэффективность комбинации амикацина и бактериофага для лечения перитонита, вызванного кишечной палочкой.

В результате исследований установлено (табл. 2), что у 70% животных с перитонитом реакция на СРБ положительная, у 30% – слабоположительная. В контрольной группе всего 20% животных имеют положительную или слабоположительную реакцию. Данные результаты подтверждают наличие воспалительного процесса у мышей с перитонитом, вызванным *E. coli*.

Оценку концентрации СРБ в сыворотке крови мышей с перитонитом, которые подвергались лечению по различным схемам, проводили в динамике. Уровень данного острофазного показателя определялся на третьи и пятые сутки после начала соответствующей терапии. Содержание СРБ, отражающее степень выраженности воспалительного процесса, позволяет судить об эффективности проводимой терапии. Снижение уровня СРБ указывает на правильный выбор метода терапии перитонита.

Исходя из изученного содержания СРБ в сыворотке крови экспериментальных животных с перитонитом, которые подвергались различным видам лечения, установлено, что у животных пятой и шестой групп на 5 сутки практически нормализуется содержание СРБ, что свидетельствует о снижении воспалительного процесса и эффективности проведенной терапии. При этом гатифлоксацин в комбинации с бактериофагом оказался предпочтительнее комбинации гатифлоксацина с амикацином и бактериофагом, поскольку уже на третьи сутки приема приводил к нормализации уровня СРБ (80% животных с отрицательной реакцией, 20% – со слабоположительной). На пятые сутки показатели СРБ в обеих группах идентичны и практически соответствовали контролю.

Таблица 2

Содержание СРБ в сыворотке крови

Группы животных	Сутки наблюдения, реакция					
	3 сутки			5 сутки		
	+	+/-	-	+	+/-	-
Контрольная группа	10%	10%	80%	10%	10%	80%
Животные с перитонитом	70%	30%	-	-	-	-
1 группа (амикацин)	-	50%	50%	-	80%	20%
2 группа (гатифлоксацин)	-	20%	80%	-	80%	20%
3 группа (амикацин, гатифлоксацин)	-	50%	50%	-	50%	50%
4 группа (амикацин, бактериофаг)	-	50%	50%	80%	20%	-
5 группа (гатифлоксацин, бактериофаг)	-	20%	80%	-	20%	80%
6 группа (амикацин, бактериофаг, гатифлоксацин)	-	50%	50%	-	20%	80%

Примечание: «+» – положительная реакция; «+/-» – слабоположительная реакция; «-» – отрицательная реакция.



Монотерапия амикацином (1 группа) и гатифлоксацином (2 группа) не сопровождалась нормализацией СРБ. На пятые сутки после начала лечения у 80% животных как первой, так и второй групп определяли слабоположительную реакцию на СРБ. Лишь у 20% животных анализ на СРБ дал отрицательные результаты.

Комплексная антибактериальная терапия амикацином и гатифлоксацином (3 группа) оказалась более эффективной по сравнению с лечением одним из этих препаратов, на что указывает повышение количества животных с отрицательной реакцией на СРБ до 50% уже на третьи сутки терапии, которое не изменилось и на пятые сутки лечения.

В 4 группе (комбинация амикацина с бактериофагом) на пятые сутки 80% мышей имели положительную реакцию на СРБ, а анализ 20% животных оказался слабоположительным, что превышает показатели животных с перитонитом, вызванным *E. coli*, не получавшим никакого лечения. Такая динамика изменений содержания СРБ указывает на дальнейшее прогрессирование перитонита и абсолютную неэффективность данной схемы лечения заболевания.

Анализ острофазных показателей (СРБ, серомукоид) сыворотки крови экспериментальных животных подтвердил наличие у них воспалительного процесса. Перитонит, вызванный *E. coli*, сопровождается выраженным острофазным ответом. Определение СРБ и серомукоида в динамике позволило судить об эффективности предлагаемых схем антибактериальной терапии.

Из всех использованных схем лечения наиболее малоэффективной оказалась комбинация амикацина и бактериофага. У животных 4 группы, которых лечили данными препаратами, отмечено повышение как СРБ, так и серомукоида, при этом на пятые сутки лечения значение исследуемых биохимических показателей превышали аналогичные показатели у животных с перитонитом, которые не получали лечения. Повышение СРБ и серомукоида свидетельствует о прогрессировании воспаления и неэффективности схемы «амикацин и бактериофаг».

У животных первой и второй групп, получавших только амикацин или гатифлоксацин соответственно, отмечено незначительное снижение серомукоида, уровень СРБ снижается, однако не достигает значений контрольной группы, что свидетельствует о частичной эффективности использования данных препаратов в форме монотерапии.

Эффект применения комбинации амикацина и гатифлоксацина более выражен, чем использование данных препаратов по отдельности. При этом эффект проявляется лишь на пятые сутки лечения. У экспериментальных животных этой группы уровень серомукоида снижается лишь на 5 сутки лечения и не отличается от показателя нелеченных животных на третьи сутки, а проба на СРБ отрицательна у 50% животных на 5 сутки, что свидетельствует о менее выраженном воспалении у животных, леченных амикацином с гатифлоксацином, по сравнению с использованием только одного из этих препаратов. Однако нормализации СРБ у животных третьей группы не наблюдается.

Наибольшей эффективностью характеризовалось лече-

ние, которое получали животные пятой (гатифлоксацин и бактериофаг) и шестой (гатифлоксацин, амикацин и бактериофаг) групп. Комбинация гатифлоксацина с бактериофагом приводит к значительному снижению СРБ (80% животных) уже на третьи сутки лечения. Подобная динамика сохраняется и на пятые сутки. Уровень серомукоида также снижается. Содержание СРБ в крови экспериментальных животных пятой группы сопоставимо с уровнем СРБ у животных шестой группы. Однако комбинация амикацина, гатифлоксацина и бактериофага не приводит к нормализации СРБ уже на третьи сутки. Сопоставимый с контрольной группой уровень СРБ наблюдается лишь на пятые сутки лечения. На третий день лечения отмечено максимальное снижение уровня серомукоида.

В целом применение комбинации антибактериальных препаратов оказывает более выраженный эффект на острофазные показатели и, соответственно, на выраженность воспалительного процесса, чем использование монотерапии.

ВЫВОДЫ

Повышение исследуемых острофазовых показателей по сравнению с контрольной группой подтверждает наличие воспалительного процесса у животных экспериментальной группы.

Лечение перитонита, вызванного кишечной палочкой, комбинацией гатифлоксацина с бактериофагом, а также гатифлоксацина с амикацином и бактериофагом, обладают наибольшей эффективностью и максимальным противовоспалительным действием, что позволяет рекомендовать данные схемы для лечения перитонита эшерихиозной этиологии.

Комбинация амикацина и бактериофага не является эффективной для лечения перитонита, вызванного *E. coli*.

Применение амикацина или гатифлоксацина в виде монотерапии показало свою недостаточную эффективность по сравнению с комбинированной антибактериальной терапией.

Эффективность применения комбинации амикацина и гатифлоксацина для лечения перитонита, вызванного кишечной палочкой, превышает эффективность каждого из этих препаратов в отдельности, тем не менее уступает схемам «гатифлоксацин и бактериофаг» и «гатифлоксацин, бактериофаг и амикацин».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C-reactive protein: a critical update / Mark B. Pepys and Gideon M. Hirschfield // *J Clin Invest.* – 2003. – №111 (12). – P. 1805–1812.
2. Tall A.R. C-reactive protein reassessed / A.R. Tall // *N Engl J Med.* – 2004. – №350 (14). – P. 1387–1397.
3. Ballou S.P. C-reactive protein and the acute phase response / S.P. Ballou, I. Kushner // *Adv. Intern. Med.* – 1992. – Vol. 37. – P. 313–336.
4. Чупров М.П. Роль глобулинов и пептидов крови в гемореологических нарушениях у больных аппендикулярным перитонитом [прилож. (ч. II)] / П.И. Чупров, В.А. Зурнаджянц, А.А. Жидовинов, М.П. Чупров // *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* – 2009. – №1 (25). – С. 733.
5. Чупров М.П. Изучение серомукоида сыворотки крови у больных перитонитом / М.П. Чупров, П.И. Чупров, Т.И. Чупрова, С.К. Керопьян // *Актуальные проблемы педиатрии: Труды Астраханской гос. мед. академии.* – 2006. – Т. 34 (XLIX). – С. 275–278.
6. Thierry Fournier. Alpha-1-acid glycoprotein *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* / Fournier Thierry, Medjoubi-N Najet, Porquet Dominique // *Protein Structure and Molecular Enzymology.* – 2000. – Vol. 1482. – P. 157–171.

Сведения об авторах:

Минухин В.В., д. мед. н, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ХНМУ.

Косилова О.Ю., аспирант каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ХНМУ.

Ткаченко В.Л., к. мед. н., доцент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ХНМУ.

Поступила в редакцию 22.04.2013 г.