

ХИТОЗАНОВАЯ ЭНТЕРОСОРБЦИЯ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ИНФИЛЬТРАТЕ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

Большаков И.Н.

*Красноярская государственная медицинская академия
Красноярск, Россия*

Общеизвестно, что острый аппендицит является самым распространенным заболеванием в группе хирургических болезней органов брюшной полости. Летальность больных с острым аппендицитом и ряд осложнений, связанных с ним, не снизились и остаются на одном уровне. Основная масса пациентов имеет осложненные формы аппендицита – разлитой перитонит, аппендикулярный инфильтрат, аппендикулярный абсцесс. Среди больных острым аппендицитом удельный вес больных с аппендикулярным инфильтратом и аппендикулярным абсцессом составляет от 0,3% до 19,2% случаев. Исходя из этого обстоятельства, проблема воспалительного инфильтрата остается актуальной. Бактериальный фактор является основополагающим в развитии аппендикулярного инфильтрата. Бактериологические исследования показали, что при деструктивных формах острого аппендицита микрофлора выходит за пределы червеобразного отростка, «инициирует» экссудативный реактивный процесс соседних органов брюшной полости: петли толстой и тонкой кишки, сальник и другие органы, провоцирует процесс инфильтрации плазмы крови и клеток с образованием на их поверхности фибрина и последующим формированием воспалительного конгломерата. Большой удельный вес среди инфильтратов брюшной полости приходится на энтерогенные инфильтраты не аппендикулярного происхождения. Без сомнения, не купированный в силу тех или иных причин воспалительный процесс в брюшной полости в раннем послеоперационном периоде может приводить к слипчивому процессу, формируя элементы спаечной непроходимости. Классические методы лечения аппендикулярного инфильтрата, принятые большинством хирургов, далеко не обеспечивают связывания средне- и высокомолекулярных токсических продуктов из просвета кишечной трубки и лимфовенозного коллектора и направлены в целом на улучшение местных обменных процессов в области воспалительного конгломерата.

Цель работы – разработать в эксперименте метод лечения воспалительных инфильтратов брюшной полости энтеросорбцией продуктами деацетилизованного хитина.

Основные задачи:

1. Оценить патоморфологические изменения экспериментального илеоцекального инфильтрата при кишечном пассаже хитозаном и его производным глутаминовой кислоты.
2. Установить эффективность работы хитозановых энтеросорбентов при извлечении микробных токсинов грамположительной микрофлоры.

На сегодняшний день возрос интерес клиницистов к методам удаления токсических продуктов из просвета желудочно-кишечного тракта при деструктивных процессах брюшной полости путем санации просвета кишечника сорбционными материалами. Активно применяемая энтеросорбция всеми возможными полимерными материалами в группе больных с деструктивными процессами брюшной полости позволила улучшить клинические результаты лечения. Свойство устанавливать прочные связи дает возможность хитозану связывать не только низкомолекулярные соединения, но и высокомолекулярные токсины, вплоть до бактериальных клеток, придавая некоторую селективность. Селективность предопределена в отношении патогенных представителей грамположительной и грамотрицательной бактериальной флоры кишки. Блокирование роста микрофлоры объясняется свойством хитозана агглютинировать микробные тела, подавлять их рост. Микробная клетка содержит на своей мембране специфические N-ацетилглюкозаминовые рецепторы и от их числа у каждого вида микроба имеется различная способность связываться с аминокислотной группой хитозана. Кроме того, в клеточную стенку грамотрицательных

микроорганизмов включен липополисахарид (ЛПС). Взаимодействие хитозанового полимера с ЛПС приводит к склеиванию микробных тел, к изменению суммарного заряда их биологической мембраны, солюбилизации липидного бислоя. Изменение заряда капсулы и мембраны микробной клетки обеспечивает повышенную проницаемость для большинства низко- и высокомолекулярных компонентов внутрь клетки, увеличивает поступление многих антибиотиков. Кроме этого, растворимость в органических кислотах предполагает формирование жидких, гелеобразных продуктов хитозана. Наличие текучести у полимера способствует равномерному и большому распределению его на поверхности эпителиальной выстилки слизистой оболочки кишки, увеличивая сорбционную емкость продукта. Известно, что хитозан способен активировать клетки адгезии перитонеального экссудата. Активация затрагивает макрофаги и фибробласты. Активируется большинство функций макрофагов, включая синтез цитокинов (интерфероны, интерлейкин-1, колониестимулирующий фактор). Отмечены антиокислительные свойства, ингибирование многих протеолитических ферментов, а также благотворное влияние на процессы секреции и регенерации слизистой оболочки кишки. Последнее свойство связано с наличием мукоадгезивного эффекта, обеспечивающего изменение трансклеточного и межклеточного обменов веществ, включая транспортировку низко- и высокомолекулярных субстанций. Особо отмечено применение продуктов хитина и хитозана в экспериментальной и клинической хирургии при деструктивных состояниях отделов желудочно-кишечного тракта. Применение низко- и высокомолекулярных продуктов дезацетилизованного хитина позволило в эксперименте жирового панкреонекроза у крыс устранять экссудативную воспалительную реакцию в полости брюшины, стабилизировать ферментативный спектр периферической крови, уменьшать интоксикацию (Патент РФ № 2196587). Энтеральное применение хитозана при острой и хронической почечной недостаточности включает желудочно-кишечный тракт в качестве заместительного органа в элиминацию уремических токсинов и метаболическую коррекцию (Патент РФ № 2201755). Показано, что водорастворимые формы полимера способны снижать уровень бактериального ЛПС и других токсических продуктов в системе воротной вены и периферической крови, удлинняя при этом выживаемость животных в эксперименте. В клинических условиях в послеоперационном периоде у больных с синдромом кишечной недостаточности использование гелевой формы высокомолекулярного хитозана, вводимого через назоинтестинальный зонд, обеспечивало максимальный сорбционный эффект и детоксикацию, нормализацию работы кишечника во всех его отделах, улучшение состояния послеоперационного периода. Замечено, что свойства хитозана реализуются и за пределами кишечной стенки в полости брюшины при энтеральном введении сорбента. При наличии выпота реактивного характера (острая почечная недостаточность, острый деструктивный панкреатит) продукты хитозана способствуют его полной или частичной ликвидации. Способность устранять экссудативную реакцию и извлекать продукты за пределами кишечной стенки показана в эксперименте на примере изолированного жизнеспособного участка тонкой кишки, который помещался в контейнер с насыщенными растворами общей и связанной фракций билирубина. Оказалось, что билирубин способен быстро транслироваться через все слои кишечной стенки, возможно, минуя кровоток, в просвет кишечной трубки к заряженному полимеру. Такой эффект возможен, если учитывать результаты научных исследований с использованием меченых ингредиентов, где имеет место разобщение межклеточных контактов и создание ультрапористой структуры собственных тканей. Кишка рассматривается в этом случае, как полупроницаемая мембрана. Конечный эффект активного дренирования всех слоев кишечной стенки, вовлеченных в патологический процесс, заключается в устранении застойной инфильтрации и активации собственных резорбтивных механизмов. Примененные в настоящей работе продукты хитозана со средне- и высокомолекулярной массой имели положительный заряд за счет большого содержания свободных аминогрупп (NH_2), были рассчитаны на обеспечение эффекта мукоадгезии к эпителиальной выстилке кишечника. Кроме этого, такие формы

хитозана могут иметь гелевую форму, что позволяет им хорошо перемещаться по просвету кишечной трубки. Глутамат хитозана способен обволакивать эпителиальную выстилку поверхностно активной пленкой, увеличивая площадь контакта с токсическими веществами и сорбционную емкость полимера. Повышенный мукоадгезивный эффект может обеспечить разобщение апикальных концов клеток эпителия слизистой оболочки, создать ультрапористую структуру всех слоев кишечной стенки с перемещением в сторону сорбента как низко-, так и высокомолекулярных компонентов из зоны воспаления, дренирование всех слоев кишки, включая и полость брюшины. Использование производного слабой органической кислоты может быть рассчитано на дополнительное протонирование ионами водорода (H^+) аминогрупп, что приводит к значительному росту суммарного положительного заряда. Высокий положительный заряд полимера – одно из ключевых условий высокой биодоступности токсичных веществ к полимеру.

Результаты исследований. Экспериментальная часть работы была выполнена на популяции крыс Wistar, у которой моделировался неосложненный аппендикулярный инфильтрат (Патент РФ № 2204866). На 6-е сутки развития заболевания через желудочный зонд производился энтеральный пассаж гелевой формы хитозана с ММ 200 кД и степенью деацетилирования 0,75 (или коллоидной формы полимера с ММ 120 кД и степенью деацетилирования 0,95) в объеме 1,5 мл 3 раза в день в течение 12 дней (Приоритет по заявке на изобретение от 30.01.2003 г. № 2003102555/14). В контрольных группах животных при тех же условиях энтерально вводились физиологический раствор и полифепан. На 12-е сутки развития воспалительного процесса макроскопическая картина илеоцекального инфильтрата у животных, получавших физраствор, мало чем отличалась от групп животных с шестидневным и девятидневным развитием воспалительного процесса. В объемном отношении инфильтрат оставался таким же, в брюшной полости - значительное количество воспалительного серозно-фибринозного выпота. Анализ микроскопической картины участков стенки тонкой и слепой кишки показал, что отмечаются обширные очаги некроза слизистой оболочки с явлениями микробизма. Диффузная лейкоцитарная инфильтрация затрагивала подслизистый и мышечный слои. Серозная оболочка утолщена, полнокровна с периваскулярными лейкоцитарными инфильтратами, что указывало на активный воспалительный процесс на висцеральной брюшине. На серозной оболочке - фибринозно-гнойный экссудат. Последнее обстоятельство наглядно указывало на воспалительную экссудативную реакцию за пределами кишки. К 18-ым суткам развития воспалительного процесса в этой группе животных инфильтрат плотный, занимающий 20-25% объема брюшной полости, с наличием массивных фибринозных межкишечных наложений. Десерозирование покрова кишечных петель происходит при попытке их механического разобщения. О наличии продолжающегося воспалительного процесса в брюшной полости указывало присутствие воспалительного выпота. Микроскопические изменения тонкой и слепой кишки выявляли выраженный отек подслизистого слоя. В слизистой оболочке отмечались очаги некроза и лейкоцитарная инфильтрация, полнокровие. Наличие лишь очаговых участков некроза, как следствие стихания воспалительного процесса, позволяло считать, что происходит поэтапное восстановление слизистой оболочки. В мышечном слое - очаговые лимфо-лейкоцитарные инфильтраты. В серозной оболочке имели место расширенные полнокровные сосуды, принимавшие участие в резорбции токсических продуктов из полости брюшины. Снижение воспалительной реакции со стороны серозной оболочки подтверждалось наличием мелкоочаговых лейкоцитарных инфильтратов. Кроме того, на этот промежуток времени отмечалось разрастание грануляционной ткани на серозной оболочке и других участках слепой кишки, сохранение фибринозных наложений. Характерно прорастание фибриновых прослоек в грануляционную ткань с последующей ее васкуляризацией. Процесс, затрагивающий ткани воспалительного инфильтрата, приобретал торпидное хроническое течение без признаков генерализации и диффузного распространения.

На 25-ые сутки от начала моделирования заболевания макроскопическая картина выявила присутствие в брюшной полости участка плотного инфильтрата, уменьшенного в объеме до 20%. Свободный выпот в брюшной полости отсутствовал, что указывало на купирование экссудативной воспалительной реакции. В срезах фрагментов тонкой и толстой (слепой) кишки слизистая оболочка и собственная мышечная пластинка слизистой оболочки полностью восстановлены. Оставалась лейкоцитарная клеточная инфильтрация в подслизистом и мышечном слоях. На серозной оболочке - серозно-фибринозный выпот, грануляционная ткань, сохранены полнокровные сосуды с периваскулярными инфильтратами.

Энтеросорбция гелевой формой глутамата хитозана или коллоидной формой хитозана приводила к ликвидации воспалительного экссудата в полости брюшины. Патологические изменения на 9-е сутки (3 дня энтеросорбции) преимущественно затрагивали мышечную и серозную оболочки толстой и тонкой кишки. В слепой кишке отмечались одиночные очаги некроза слизистой оболочки, мышечная пластинка коллагенизирована. В подслизистом слое сохранялись отек, полнокровие с периваскулярными очаговыми лимфолейкоцитарными инфильтратами. В мышечном слое - очаги гнойного воспаления с формированием микроабсцессов, картина организации и отграничения воспалительного процесса в тканях, спустя короткий промежуток времени в сравнении с контрольными группами. Серозная оболочка утолщена, полнокровна за счет воспалительных явлений, присутствовал серозно-гнойный экссудат, фибрин. Изменения в интимно спаянной тонкой кишке носили такие же изменения, что и в слепой кишке. Слизистая оболочка тонкой кишки сохранена, в железах преобладали бокаловидные клетки, за 3 дня хитозановой диеты удалось восстановить слизистую оболочку. Собственная мышечная пластинка слизистой оболочки коллагенизирована. Подслизистый слой полнокровный, отечный, с периваскулярными лимфолейкоцитарными инфильтратами, в мышечном слое единичные очаговые периваскулярные лейкоцитарные инфильтраты с появлением плазматических клеток и гистиоцитов, что указывало на снижение высоты воспалительных явлений. На серозной оболочке - следы серозно-гнойного экссудата.

К 12 суткам развития (через 6 дней энтеросорбции) отмечались очаги регенерации слизистой оболочки слепой кишки с большим количеством бокаловидных клеток и с гиперсекрецией слизи. Собственная мышечная пластинка утолщена, отека. В подслизистом слое - отек, парез сосудов, лейкоцитарная инфильтрация. В мышечном слое - снижение числа клеток воспалительной инфильтрации, разрастание грануляционной ткани, в серозной оболочке - микроабсцессы. В слизистой оболочке тонкой кишки - очаги регенерации, утолщение собственной мышечной пластинки, на серозном покрове - фибрин. Таким образом, полимер при трансляции через зону воспалительного конгломерата обеспечивал дренажную функцию всех слоев, создавал ориентированный поток высоко- и низкомолекулярных соединений из зоны воспаления. Вероятно, такой же механизм имеет место при устранении экссудативной воспалительной реакции в полости брюшины.

Макроскопическое исследование препаратов на 18 сутки от момента моделирования выявило, что гелевая форма глутамата хитозана способна устранять массивный воспалительный кишечный конгломерат с наличием единичных участков спаянных петель. Слепая кишка доступна к осмотру при разъединении участков рыхло спаянных петель тонкой кишки. Воспалительного выпота и других изменений со стороны висцеральной и париетальной брюшины не выявлено. На 25 сутки воспалительного процесса перевязанный сегмент слепой кишки полностью доступен для осмотра, сохраняются единичные участки спаянных петель за счет разрастания грануляционной ткани, заместившей более ранние наложения фибрина. Включения в диету глутамата хитозана позволяло сократить сроки резорбции воспалительного конгломерата на 10-12 дней. Механизмы такого действия сорбента подробно объясняет микроскопическая картина. Двенадцатидневная энтеросорбция хитозаном вносило ряд положительных моментов в структуру тканей, входящих в инфильтрат. На серозном покрове как тонкой, так и слепой кишки все слои восстановлены, в

подслизистом слое – единичные очаговые лимфогистиоцитарные инфильтраты. В толще серозной оболочки - созревающая грануляционная ткань, уменьшение количества клеток воспалительного инфильтрата. Серозная оболочка бедна сосудами и клетками, что свидетельствовало об отсутствии экссудации в полость брюшины. Стенка слепой кишки не спаяна с соседними петлями кишечника, наслоений фибрина нет. На серозной оболочке – активная макрофагальная реакция. Появление колоний макрофагов приводило к разрыхлению и разобщению воспалительного конгломерата. После лечения к 25 суткам воспроизведения модели слои тонкой и слепой кишки восстановлены, полностью дифференцируются. На серозной оболочке слепой кишки - созревающая грануляционная ткань, единичные макрофаги. В силу стихания воспалительного процесса в брюшной полости и прекращения резорбции фибриновой матрицы, макрофаги покидают эту область.

Анализ модифицированной реакции связывания комплемента (мРСК) наглядно указал на факт персистенции бактериальных стафилококковых антигенов в периферической крови опытных и контрольных серий животных во все периоды наблюдения. Невысокие титры антигена в крови 1:16 – 1:8 указывали на умеренный уровень интоксикации, что характерно для неосложненных осумкованных процессов в брюшной полости. Результаты исследований наглядно показали различие титров бактериальных антигенов в системе воротной вены и периферического кровотока опытных и контрольных групп животных. Функция печени в качестве детоксиканта в прослеженном методе лечения была второстепенной. Тенденции к каскадному падению уровня продуктов микробной жизнедеятельности в периферической крови животных на всем протяжении воспалительного процесса не наблюдалось, что вносило предположение о малом поступлении их из зоны воспаления. Кроме того, попавшие в кровоток антигены, обходя печеночный барьер, оседали на клетках крови и тропных к ним тканях, длительно персистировали в организме. Основная антигенная трансляция осуществлялась из просвета перевязанного сегмента слепой кишки (ядра) и незначительное количество - из брюшного экссудата и пораженных тканей. Насыщение кишки физиологическим раствором хлористого натрия не влияло на падение титров продуктов микробной жизнедеятельности в системе периферического и портального кровотока до периода 18 суток развития инфильтрата. В этой группе животных присутствие антигена в портальном кровотоке было продолжительным и соответствовало титру 1:16 – 1:8 с последующим снижением на 18-е сутки до титра 1:4. Срок, при котором определялись только следы антигенов в мРСК, составлял 25 суток развития воспалительного процесса. По сравнению с титром антигенов в портальном кровотоке титры антигенов в периферической крови уменьшались в 2 раза до уровня 1:8 с длительным персистированием на таком же уровне в течение 8 суток. Полная элиминация наступала к 20-м суткам. Степень контаминации периферической крови и центрального кровотока совпадали за счет перераспределения и уравнивания. Эффект глутамата хитозана за трехдневный курс лечения отразился в основном на уровне портального коллектора. Санация энтеросорбентом приводила к падению титров антигенов в портальном кровотоке в 4 раза и составляла 1:8 – 1:4. Кроме того, перераспределение токсинов отразилось и на уровне периферического кровотока. Вероятно, что функция глутамата хитозана распространялась и за пределы слизистой оболочки тонкой кишки и могла основываться на мукоадгезивном дренирующем эффекте при изменении межклеточного потенциала, осуществлении межклеточного и трансклеточного ориентированного транспорта заряженных субстанций. Терапевтические возможности глутамата хитозана, как сорбента, особо ярко проявлялись за шестидневный курс энтеросорбции. Ощутима разница в снижении титров антигенов портального и периферического кровотока на этот промежуток времени. В портальном кровотоке снижение составило до титра 1:4 – 1:2, на периферии - до титра 1:2, тогда как в группе крыс, получавших полифепановый энтеросорбент, концентрация антигенов была в 2 раза выше. Двенадцатидневная санация кишечника глутаматом хитозана приводила к полному выведению антигенов золотистого стафилококка на всех уровнях кровотока.