

Для решения вопроса о необходимости ревазуляризации нужен объективный контроль за состоянием низводимой петли. Для этих целей применяется визуальный контроль, измерение интрамурального давления в стенке кишки, определение степени насыщения кислородом стенки кишки.

Идея ревазуляризации сигмовидной кишки принадлежит М. А. Потахову (1966) и осуществлена профессором В. Н. Чернышёвым с соавт. (1979). Профессоры И. Н. Гришин и К. Н. Тарун пересадили нижнюю брыжеечную артерию в бок наружной подвздошной артерии в 1979 г. В первом случае приходится отключать внутреннюю подвздошную артерию, во втором — пересадка в бок может привести к тромбозу. Профессор А. Ф. Рылук предложил и осуществил пересадку нижней брыжеечной артерии на конечный отдел верхней брыжеечной артерии, но оказалось, что в 20 % случаев операция не выполнима из-за короткой сигмовидной кишки. Пересадка нижней брыжеечной артерии на общую подвздошную артерию осуществима всегда, длина низводимой петли достаточна даже при резекции половины сигмовидной кишки. Мы предложили и внедрили в клиническую практику метод низведения сигмовидной кишки с ревазуляризацией сигмовидной кишки за счет общей подвздошной артерии.

Операция ревазуляризации сигмовидной кишки за счет пересадки нижней брыжеечной артерии с площадкой аорты на общую подвздошную артерию является альтернативным методом ревазуляризации низведенной сигмовидной кишки, если последней угрожает ишемия.

Выводы

1. В нижней трети сигмовидной кишки анастомозы между сигмовидными артериями прерваны или резко сужены.

2. Кишку к некрозу приводит пересечение сигмовидных артерий ниже первой сигмовид-

ной артерии или ниже ветвей первой сигмовидной артерии. Это связано с перерывом и сужением анастомозов ниже этого уровня.

3. При низведении сигмовидной кишки рационально резецировать нижнюю ее треть из-за наличия прерванных и суженных анастомозов в нижней трети сигмовидной кишки.

4. Пересечение нижней брыжеечной артерии опасно при низведении сигмовидной кишки. В 24 % дуга Риолана истончена до 1–1,3 мм, что недостаточно для адекватного кровоснабжения формируемого трансплантата.

5. Для создания хорошо кровоснабжаемой и достаточной по длине низводимой петли сигмовидной кишки при ее низведении необходимо:

- резецировать нижнюю треть сигмовидной;
- низвести весь левый фланг толстой кишки с пересечением нижней брыжеечной артерии. Артерия забирается с площадкой аорты;
- выполнить ревазуляризацию левого фланга толстой кишки за счет пересадки нижней брыжеечной артерии с площадкой аорты на общую подвздошную артерию.

Дефект стенки аорты закрывают протезом.

6. Предложенный метод ревазуляризации позволит полностью устранить такое тяжелое осложнение при низведении сигмовидной кишки, как некроз низводимой петли.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Крот, В. С. Причины некрозов при операциях с низведением сигмовидной кишки / В. С. Крот, А. Ф. Рылук // Проблемы здоровья и экологии. — 2011. — № 2. — С. 55–60.
2. Дистальный край резекции в хирургии рака прямой кишки / Г. И. Воробьев [и др.] // Анналы хир. — 2001. — № 4. — С. 22–26.
3. Rectal cancer surgery in the elderly: a multivariate analysis of outcome risk factors / A. Bufalari [et al.] // J. Surg. Oncol. — 2006. — Vol. 93. — P. 173–180.
4. Prediction of Langenbecks Arch Surg / A. G. Heriot [et al.] // Postoperative mortality in elderly patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum. — 2007. — Vol. 49. — P. 816–824.
5. Fazio, V. W. Colonic «coloplasty»: novel technique to enhance low colorectal or coloanal anastomosis / V. W. Fazio, C. R. Mantyh, T. L. Hull // Dis. Colon. Rectum. — 2000. — Vol. 43. — P. 1448–145.

Поступила 21.09.2011

УДК 616.155.34-074

ОБРАЗОВАНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Н. В. Гусакова, И. А. Новикова

Гомельский государственный медицинский университет

В культуральных исследованиях *in vitro* оценивали способность нейтрофилов крови здоровых лиц к образованию экстрацеллюлярных сетей в ответ на индукцию *S. aureus* или его растворимыми продуктами. Выявлена наиболее высокая активность живой культуры *S. aureus* (минимальная эффективная концентрация 10^7 КОЕ/мл) относительно других индукторов и определены оптимальные режимы инкубации — 150 минут при 37 °С.

Ключевые слова: нейтрофильные экстрацеллюлярные сети, нейтрофилы.

FORMATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN PERIPHERAL BLOOD

N. V. Gusakova, I. A. Novikova

Gomel State Medical University

The cultural *in vitro* studies evaluated the ability of neutrophils to form extracellular traps in response to *S. aureus* induction or caused by its soluble factors in healthy individuals. The living culture of *S. aureus* (minimal

effective concentration 10^7 CFU/ml) was revealed to be the most active in comparison with the other inductors. The optimal mode of incubation was 150 minutes at a temperature of 37 °C.

Key words: neutrophil extracellular traps, neutrophils.

Введение

Нейтрофильные гранулоциты для реализации своего антимикробного потенциала используют широкий набор факторов бактерицидности, наиболее изученными из которых являются гидролитические ферменты гранул, активные продукты кислорода и азота [1, 2]. В 2004 году учеными Института инфекционной биологии им. Макса Планка (Берлин, Германия) описан еще один механизм осуществления антимикробной функции нейтрофилов — формирование нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (НЭС) [3, 4]. Этим термином определяют способность нейтрофилов в ответ на микробные (*S. aureus*, *E. coli*, *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *S. flexneri*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *B. anthracis*) и немикробные (тромбоцитарные TLR4, липополисахарид, форболмиристилацетат, ИЛ-8) стимулы формировать экстрацеллюлярные сетеподобные структуры, состоящие из ДНК и гидролитических ферментов (нейтрофильная эластаза, миелопероксидаза, протеиназа 3, катепсин G и др.) и обладающие бактерицидными свойствами [4, 5].

Процесс образования НЭС начинается с активации НАДФ — оксидазы, которая, в свою очередь, способствует выделению из азурофильных гранул и перемещению к ядру клетки нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы, приводящих к повреждению ядерных гистонов и деконденсации хроматина. В дальнейшем ядерная мембрана разрушается и клетка быстро выбрасывает высокоактивную смесь наружу, образуя своеобразную сеть, в которую в последующем попадают бактерии [6].

В исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что образование экстрацеллюлярных сетей в ответ на стимуляцию нейтрофилов начинает проявляться после 2-часовой инкубации [7]. Это дает основание предполагать, что в условиях организма формирование НЭС обеспечивает киллинг микробов в случае неэффективного фагоцитоза.

Преимуществами НЭС как механизма бактерицидности является создание дополнительного физического барьера, препятствующего распространению патогенов (особенно являющихся слишком крупными для фагоцитоза), а также минимальные повреждения окружающих тканей [3].

Для изучения способности нейтрофилов к образованию экстрацеллюлярных сетей, как правило, используется краткосрочное культивирование нейтрофилов, выделенных на гра-

диенте плотности, со стимулятором с последующей визуализацией образовавшихся структур путем микроскопии [4, 8]. Однако методологические подходы количественного определения НЭС для внедрения в клиническую практику в настоящее время не отработаны.

Цель работы

Разработка оптимальной клеточной модели для изучения способности нейтрофилов крови к формированию экстрацеллюлярных сетей.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили лейкоциты периферической венозной крови 27 практически здоровых лиц в возрасте 19–45 лет. Лейкоциты получали путем отстаивания гепаринизированной крови (10 Ед / мл) в течение 45 минут при 37 °C, отбирали нижний слой плазмы с лейкоцитарной пленкой, количество нейтрофилов в суспензии доводили до концентрации 5×10^6 клеток / мл путем разведения необходимым количеством 0,9 % раствором NaCl. Жизнеспособность клеток по тесту исключения трипанового синего составляла не менее 95 %.

Формирование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами оценивали методом люминесцентной микроскопии с использованием красителя акридинового оранжевого, избирательно окрашивающего нуклеиновые кислоты. Для индукции образования НЭС использовали живую либо инактивированную (нагревание до 60 °C в течение 1 часа) суточную культуру *S. aureus* (ATCC 25923) в различных концентрациях (10^4 – 10^9 КОЕ / мл), а в ряде исследований — растворимые продукты *S. aureus*. Выбор *S. aureus* в качестве стимулятора обусловлен универсальностью его применения в лабораторной практике для оценки различных проявлений функциональных свойств нейтрофилов (фагоцитоза, кислород-продуцирующей функции и др.) [9]. Количество микроорганизмов в суспензии контролировали по стандарту мутности по шкале McFarland. Для получения растворимых продуктов предварительно переносили одну полную стандартную бактериальную петлю суточной культуры *S. aureus* в 100 мл питательной среды RPMI-1640. Микробную взвесь инкубировали 24 часа при 37 °C, центрифугировали при 1000 g в течение 30 минут, надосадочную жидкость отбирали, пропускали через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и хранили до использования при — 20 °C.

Лейкоцитарную суспензию инкубировали с равным объемом стимулятора в течение 30–180 минут при 37 °C, затем центрифугировали

5 минут при 250 г, из осадка готовили мазки, высушивали, фиксировали 96° этиловым спиртом и окрашивали 0,04 % водным раствором акридинового оранжевого в течение 2 минут в темноте. Контролем служили клетки, инкубируемые в тех же условиях без стимулятора.

Учет проводили с помощью люминесцентного микроскопа ZEISS Axio Star plus HBO 50/AC (увеличение $\times 1000$, фильтр возбуждения — 490 нм, фильтр эмиссии — 520 нм). Ядра нейтрофилов флуоресцировали ярко-зеленым цветом, нейтрофильные ловушки были представлены тонкими свободнолежащими ярко-зелеными нитями, занимающими простран-

во, в 2–3 раза превосходящее диаметр неизменного нейтрофила. Учитывали четко дифференцируемые нейтрофильные экстрацеллюлярные сети, сосчитанные на 100 нейтрофилов.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрического W-критерия Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25 %; 75 %).

Результаты и обсуждение

Формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей в зависимости от времени культивирования и концентрации живого *S. aureus* представлено в таблице 1.

Таблица 1 — Количество НЭС (%) при стимуляции живой суспензией *S. aureus* (n = 27)

Время инкубации, мин	Концентрация <i>S. aureus</i> , КОЕ/мл						
	0 (контроль)	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
0	5 (5; 7)	4,5 (4; 6)	4 (4; 5)	4 (3; 5)	5 (4; 5)	4,5 (4; 5)	5 (4; 6)
30	5 (3; 6)	5 (3; 6)	5 (4; 6)	5 (4; 5)	5 (4; 5)	4,5 (4; 5)	5 (5; 6)
60	5 (5; 7)	4,5 (3; 6)	5 (3; 6)	5 (3; 6)	5 (4; 6)	4 (4; 5)	5 (5; 6)
90	4 (3; 5)	4,5 (4; 6)	4 (3; 5)	4 (4; 5)	5 (4; 5)	5 (4; 5)	4,5 (4; 5)
120	5 (5; 6)	4,5 (4; 6)	5 (4; 5)	5 (3; 6)	5 (4; 6)	5 (4; 5)	5 (4; 6)
150	5 (4; 7)	5 (3; 6)	5 (3; 6)	5 (4; 6)	14 (13; 17)*	15 (14; 18)*	15 (14; 17)*
180	5 (4; 6)	5 (4; 6)	5 (4; 6)	5 (4; 6)	15 (13; 18)*	15 (15; 18)*	16 (14; 18)*

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем, $p < 0,05$

Как видно из таблицы 1, в препаратах лейкоцитов крови здоровых лиц определяются в низком количестве экстрацеллюлярные сети (перцентильный размах 5–7). Культивирование нейтрофилов в условиях без добавления стимулятора в течение от 30 до 180 минут не приводило к увеличению их способности к образованию экстрацеллюлярных сетей. При внесении в культуру клеток суспензии живого *S. aureus* наблюдался значимый прирост количества НЭС, однако только на 150 минуте инкубации ($p < 0,05$ в сравнении с контролем). При этом минимальная эффективная концентрация живого *S. aureus* как стимулятора НЭС составила 10^7 КОЕ/мл ($p < 0,05$ относительно контроля). Повышение концентрации микробных тел до 10^9 КОЕ/мл, как и увеличение времени инкубации более 150 минут, не приводило к дальнейшему приросту количества НЭС.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, продемонстрировавших максимум образования экстрацеллюлярных сетей в культуре нейтрофилов периферической крови на 150 минуте инкубации [7]. Авторы предполагают, что это время необходимо для выхода из азурофильных гранул и перемещения к ядру клетки нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы, приводящих к повреждению ядерных гистонов и деконденсации хроматина.

Известно, что способность живых и инактивированных микробных частиц индуцировать функциональную активность нейтрофилов различается [10]. В значительной степени это объясняется инактивацией при нагревании термолабильных факторов патогенности *S. aureus* и более слабым стимулирующим эффектом на функциональную активность нейтрофилов сохраняющихся термостабильных компонентов (тейхоевые и липотейхоевые кислоты, энтеротоксины А, В, С, D, Е, экзотоксин TSST-1, эксфолиатин А) [2, 11, 12].

В наших исследованиях применение в качестве стимулятора взвеси инактивированного *S. aureus* оказывало значимый эффект на формирование НЭС в тех же концентрациях и временных интервалах, что и живые микроорганизмы, однако степень стимуляции была менее выраженной (таблица 2).

Удобным для лабораторной практики является использование в качестве стимулятора функциональных свойств нейтрофилов вместо микроорганизмов их растворимых продуктов. Показано, что секреторные продукты стафилококков представляют собой комплекс высокоактивных веществ, которые в экспериментах *in vitro* повышают экспрессию рецепторов к С3-компоненту комплемента на нейтрофилах, генерируют продукцию ими ФНО α и ИЛ-1 β , ИЛ-8, кислородных радикалов [2, 10].

В проведенных нами исследованиях, с использованием в качестве стимулятора растворимых продуктов *S. aureus*, обнаруживалось

значимое увеличение количества НЭС в сравнении с контролем ($p < 0,05$) на 150 минуте инкубации (таблица 3).

Таблица 2 — Количество НЭС (%) при стимуляции клеток инактивированным *S. aureus* (n = 27)

Время инкубации, мин	Концентрация <i>S. aureus</i> , КОЕ/мл				
	0 (контроль)	10^6	10^7	10^8	10^9
120	5 (5; 6)	4 (3; 6)	4,5 (3; 5)	4 (3; 5)	5 (5; 8)
150	5 (4; 7)	5 (4; 6)	6 (5; 7)*	7 (5; 8)*	6,5 (6; 8)*
180	5 (4; 6)	5 (5; 6)	6 (5; 7)*	6 (5; 7)*	7 (6; 9)*

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем, $p < 0,05$

Таблица 3 — Формирование нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей под влиянием растворимых продуктов *S. aureus* (n = 27)

Время инкубации, мин	0 (контроль)	Растворимые продукты <i>S. aureus</i>
120	5 (5; 6)	5 (4; 5)
150	5 (4; 7)	10 (9; 12)*
180	5 (4; 6)	9,5 (8; 12)*

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем, $p < 0,05$

При этом по выраженности эффекта растворимые продукты *S. aureus* занимали промежуточное положение между живой и инактивированной культурой микроорганизмов (рисунок 1). Максималь-

ный стимулирующий эффект на образование НЭС выявлен при использовании в качестве индуктора суспензии живых *S. aureus*, минимальный — в ответ на стимуляцию инактивированными микробами.

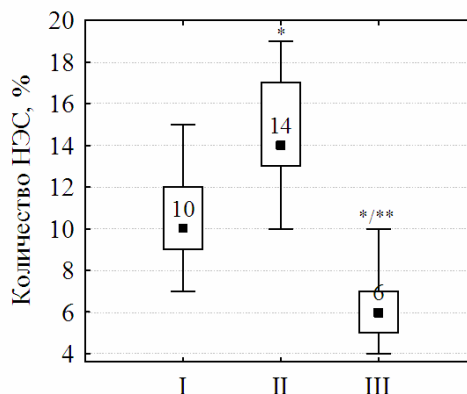


Рисунок 1 — Сравнительная характеристика способности нейтрофилов к формированию экстрацеллюлярных сетей в зависимости от стимулятора.

Данные представлены в виде (Me: 25 %; 75 %; Min – Max).

I — инкубация с растворимыми продуктами *S. aureus*; II — инкубация с живой взвесью *S. aureus*;

III — инкубация с инактивированной взвесью *S. aureus*.

Время инкубации — 150 мин; концентрация *S. aureus* — 10^7 КОЕ/мл.

* различие значимо в сравнении с аналогичным показателем I группы;

** различие значимо в сравнении с аналогичным показателем II группы

Проведенные исследования позволили установить возможность использования лейкоконцентрата для оценки способности нейтрофилов к образованию НЭС, что значительно снижает трудоемкость исследования и делает его более физиологичным. Определены оптимальные режимы культивирования клеток при стимуляции формирования НЭС *S. aureus* либо его растворимыми продуктами. Эти исследо-

вания могут послужить основой для изучения функциональной активности нейтрофилов при различных формах стафилококковой инфекции, что позволит оптимизировать подходы к мониторингу и прогнозу таких состояний.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Нестерова, И. В. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы / И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко, В. А. Роменская // Аллергология и иммунология. — 2008. — Т. 9, № 4. — С. 432–435.

2. Новикова, И. А. Показатели клеточного иммунитета и их изменение под влиянием растворимых продуктов *S. aureus* у больных гнойно-воспалительными заболеваниями / И. А. Новикова, Е. С. Головкин, В. П. Булавкин // Проблемы здоровья и экологии. — 2008. — № 1. — С. 53–58.
3. Zychlinsky, A. NETs: a new strategy for using old weapons / A. Zychlinsky // Trends in Immunology. — 2009. — Vol. 30, № 11. — P. 513–521.
4. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann // Science. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535.
5. Нестерова, И. В. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети: протекция и защита / И. В. Нестерова // Международный журнал по иммунореабилитации. — 2009. — Т. 11, № 1. — С. 25–26.
6. Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / A. Zychlinsky, K. D. Metzler // The Journal of Cell Biology. — 2010. — Vol. 25. — P. 1–15.
7. Fuchs, T. A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T. A. Fuchs // The Journal of Cell Biology. — 2007. — Vol. 176. — P. 231–241.
8. Долгушин, И. И. Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в антимикробной защите / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // Вестник РАМН. — 2010. — № 4. — С. 26–30.
9. Толоян, А. А. Клетки иммунной системы / А. А. Толоян, И. С. Фрейдлин. — СПб.: Наука, 2000. — 231 с.
10. Veldkamp, K. E. Modulation of neutrophil chemokine receptors by *S. aureus* supernate / K. E. Veldkamp, J. M. Heezius, J. Verhoef // Infection and Immunity. — 2000. — Vol. 68, № 10. — P. 5908–5913.
11. Афанасьева, Е. С. Оценка чувствительности CD2 рецепторов лимфоцитов к растворимым продуктам *S. aureus* / Е. С. Афанасьева // Сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы теоретической и практической медицины», посвященной 15-летию образования Гомельского государственного медицинского университета / Гомельский государственный медицинский университет. — Гомель, 2005. — Т. 1. — С. 12–15.
12. Пронин, А. В. Суперантигены — факторы патогенности или стимуляторы иммунитета / А. В. Пронин // Медицинская иммунология. — 2005. — Т. 7, № 5–6. — С. 453–460.

Поступила 30.09.2011

УДК 616-03:616-035.2

РАСПАД БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАТИВНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

И. В. Жильцов, Д. В. Моисеев, В. М. Семенов, С. К. Егоров

Витебский государственный медицинский университет

Настоящая работа посвящена актуальной проблеме исследования влияния факторов сыворотки крови человека на бета-лактамы. Показано, что гидролиз четырех антибиотиков бета-лактамного ряда (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) статистически значимо ускоряется, что обуславливает дополнительный распад 2,3 % азтреонама, 7,5 % бензилпенициллина, 10,8 % цефалексина и 11,9% имипенема к шестому часу инкубации при 37 °С. При этом вид кинетических кривых распада бензилпенициллина, цефалексина и имипенема под воздействием ЧСА типичен для ферментативных реакций первого порядка, а азтреонама — нулевого порядка. Повышение температуры инкубации с 37 до 39 °С приводит к ускорению катализируемого альбумином распада имипенема в среднем на 14 %, а цефалексина — на 15,7 %. Бета-лактамные антибиотики, не разрушающиеся под воздействием ЧСА, не разрушаются и цельной сывороткой крови. По отношению к бета-лактамным антибиотикам, разрушаемым ЧСА, нативная сыворотка крови может проявлять существенно более высокую (разница может превышать 30 %) бета-лактамазную активность, чем очищенные препараты альбумина любого происхождения в нормальной для человеческой крови концентрации. Таким образом, сыворотка крови может разрушать некоторые бета-лактамные препараты, широко используемые в практике здравоохранения.

Ключевые слова: бета-лактамные антибиотики, человеческий сывороточный альбумин, сыворотка крови, бета-лактамазная активность, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DECAY OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS UNDER THE IMPACT OF NATIVE BLOOD SERUM AND HUMAN SERUM ALBUMIN

I. V. Zhylytsov, D. V. Moiseyev, V. M. Semionov, S. K. Yegorov

Vitebsk State Medical University

The present work is dedicated to the important problem of the impact which the factors of human blood serum exert on beta-lactams. It has been shown that human serum albumin (HSA) accelerates hydrolysis of four beta-lactams (namely, benzylpenicillin (BP), cefalexin, aztreonam and imipenem). This acceleration becomes more statistically intensive and stipulates the additional decay of 7,5 per cent BP, 10,8 per cent cefalexin, 2,3 per cent aztreonam and 11,9 per cent imipenem by the sixth hour of incubation at a temperature of 37 °C. Meanwhile, the state of the kinetic curves of BP, cefalexin and imipenem after their decay caused by human blood serum is typical for the first-order enzymatic reactions, and aztreonam — for zero order. The increase of the incubation temperature from 37 to 39 °C leads to the fourteen-percent accelerated decay of albumin-catalyzed imipenem, and that of cefalexin — by 15,7 %. The beta-lactam antibiotics that are not destroyed by HSA cannot be degraded by the whole blood serum. If a beta-lactam antibiotic is capable of being hydrolyzed by HSA, native blood serum may show much higher beta-lactamase activity (above 30 % of additional decay for BP) than any purified HSA preparations of any origin in concentrations that are normal for human blood serum. Thus, human blood serum can destroy some beta-lactam antibiotics that are widely used in health care, which presents a definite clinical importance.

Key words: beta-lactam antibiotics, human serum albumin, native blood serum, beta-lactamase activity, HPLC.