

В.Ф. Черненко <sup>1</sup>, В.Г. Лубянский <sup>1</sup>, А.П. Момот <sup>2</sup>, А.Н. Жариков <sup>1</sup>, А.Р. Алиев <sup>1</sup>,  
Н.Н. Звездкина <sup>3</sup>, Д.Н. Устинов <sup>4</sup>

## ВЛИЯНИЕ КРИОПРЕЦИПИТАТА ПЛАЗМЫ КРОВИ НА РОСТ МИКРОФЛОРЫ В СВЕТЕ НОВЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (Барнаул)

<sup>2</sup> Алтайский филиал ФБГУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Барнаул)

<sup>3</sup> КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (Барнаул)

<sup>4</sup> КГБУЗ «Городская больница № 1» (Барнаул)

Рассматривается необходимость использования в клинике криопреципитата (КП) как основы биоконструкта для создания внутритканевого барьера, предотвращающего распространение забрюшинных флегмон при панкреонекрозе. Проведено исследование влияния КП на рост микрофлоры с тремя видами культур (E. coli, Acinetobacter, E. faecalis). Инкубация баксред (51 серия) осуществлена в стандартных условиях в присутствии КП, антибиотиков и забрюшинной жировой клетчатки с визуальной оценкой *in vitro* и по изменению денситометрической плотности сред на аппарате MicroScan Turbidity Meter (Siemens). Как установлено, присутствие в баксреде КП в чистом виде, а также вместе с антибиотиком или жировой тканью не влияет на рост исследованной микрофлоры, а в сочетании с антибиотиком подавляет рост. С учетом индифферентности КП к микрофлоре, применение его в качестве лекарственного внутритканевого барьера на пути миграции забрюшинной флегмоны при панкреонекрозе не представляет опасности активации абдоминальной инфекции.

**Ключевые слова:** криопреципитат, модифицированный бактериологический метод диагностики, панкреонекроз

## EFFECT OF BLOOD PLASMA CRYOPRECIPITATE ON MICROFLORA GROWTH TAKING INTO CONSIDERATION POSSIBILITIES FOR ITS USE

V.F. Chernenko <sup>1</sup>, V.G. Lubyansky <sup>1</sup>, A.P. Momot <sup>2</sup>, A.N. Zharikov <sup>1</sup>, A.R. Aliev <sup>1</sup>, N.N.  
Zvezdkina <sup>3</sup>, D.N. Ustinov <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Altay State Medical University, Barnaul

<sup>2</sup> Altay Branch of Hematological Research Center, Barnaul

<sup>3</sup> Altay Regional Clinical Hospital, Barnaul

<sup>4</sup> City Hospital N 1, Barnaul

The necessity of use of cryoprecipitate (CP) in clinic as a basis of biocomposite for creation of interstitial barrier to prevent the spread of retroperitoneal abscesses in necrotizing pancreatitis. The research of the influence of CP on the growth of microorganisms with three types of cultures (E. coli, Acinetobacter, E. faecalis) was realized. Incubation of bacteriological environment (51 series) was carried out under standard conditions in the presence of CP, antibiotics and retroperitoneal adipose tissue with a visual assessment *in vitro* and by the change of the densitometric density of environments on the MicroScan Turbidity Meter (Siemens) unit. As it was stated, the presence of CP in pure form in bacteriological environment as well together with an antibiotic or adipose tissue does not affect the growth of investigated microflora and in combination with the antibiotic inhibits it suppresses growth. Taking into consideration the indifference of CP to microflora, its use as a drug interstitial barrier to the migration of retroperitoneal phlegmon in necrotizing pancreatitis the activation of abdominal infection is safe.

**Key words:** cryoprecipitate, modified method of bacteriological diagnosis, pancreatic necrosis

### ВВЕДЕНИЕ

Криопреципитат (КП) представляет собой смесь факторов свертывания крови, высокомолекулярных белков плазмы, выпадающих в осадок из свежзамороженной плазмы под воздействием низких температур. Главными его компонентами являются фибриноген, фактор VIII (фактор Виллебранда), фактор XIII, фибронектин, антитромбин III. Ранее считалось, что основными показаниями для его использования в России и в мире являлись кровотечения, связанные с гемофилией А и болезнью Виллебранда, а также тяжелые кровотечения при уремии или при экстракорпоральном кровообращении [4]. Однако в дальнейшем было выяснено, что фибронектин, входящий в состав КП и являющийся опсоническим гликопротеином, стимулирует работу С<sub>3</sub> фракции комплемента, ведет к образованию эстераз, участи-

ет в элиминации из крови ЦИК [12]. Проведенные исследования показали, что у больных в критических состояниях (сепсис, ожоговая болезнь, травмы) уровень циркулирующего фибронектина в результате потребления часто снижается [16]. Кроме того, с учетом низкой тромбогенности КП, по сравнению со свежзамороженной плазмой, была доказана высокая его эффективность применения при заместительной терапии у больных с инфекционно-токсическим ДВС-синдромом [5], у больных с послеоперационным перитонитом [7], в урологии при лечении карбункулов почки, протекающих с явлениями сепсиса [8]. Не исключена иммунокорректирующая роль КП, учитывая наличие в его составе всех классов иммуноглобулинов.

Фибриноген плазмы крови также находит применение при хирургических вмешательствах в качестве местных гемостатических средств: фибрин-

коллагеновые пластины «Тахокомб», различные фибриновые клеи («Тиссукол Кит», Бакстер АГ, Австрия) [1, 11, 13, 15]. Имеются сведения о местном использовании криопреципитата плазмы для заполнения ран и полостных образований в целях повышения репаративных процессов [2], лечения язвенной болезни [3], достижения гемостаза в хирургии острой травмы органов брюшной полости [10], регенерации печени [14], в пластической стоматологии. КП в данных условиях выполняет своеобразную роль «матрицы», заполняемой фибробластами и другими клетками, участвующими в процессах регенерации.

Таким образом, указанные широкие биологические свойства замороженного КП продолжают вызывать повышенный интерес специалистов в абдоминальной хирургии, в особенности при местном применении, в т. ч. у больных с панкреонекрозом (ПН) в роли возможного основного биоконструктивного компонента в формировании тканевого отграничительного фибринового барьера на пути распространения забрюшинных флегмон. С другой стороны, возникает требующий изучения вопрос о возможном риске инфицирования криопреципитата, содержащего адгезивные белки плазмы крови, что может служить материальной основой распространения абдоминальной инфекции.

В целом же важность постановки данного вопроса исходит из того, что одним из тяжелейших осложнений панкреонекроза является формирование распространённых парапанкреальных и забрюшинных ферментативных флегмон, ведущих в последующем к развитию сепсиса, полиорганной недостаточности и обуславливающих отягощающий прогноз заболевания и высокую летальность, достигающую 50–70 % и более [9]. Проведением интенсивной антибактериальной, антиферментной терапии, программированных и неотложных санаций и др. часто не удается предотвратить указанные осложнения, и поиск эффективных путей продолжается либо в использовании различных методов эндоскопического дренирования очагов инфекции, либо в расширении хирургических доступов вплоть до осуществления поперечных паракостальных лапаротомий. Поэтому для предотвращения распространения забрюшинных флегмон при ПН в клинике предложен способ создания внутритканевого барьера, состоящего из комплексной биоконструкции препаратов, основой которой является КП с добавлением в его состав раствора кальция и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты [6]. При введении биоконструкта в клетчаточное пространство по периметру поджелудочной железы происходит превращение его в желеобразную массу и своеобразный барьер, препятствующий распространению флегмоны, со временем подвергающийся рассасыванию. При этом оценка состояния микрофлоры в присутствии КП является важным с точки зрения установления его возможного влияния на активацию инфекции при инфильтрации композитом забрюшинной клетчатки.

**Цель исследования:** установление влияния криопреципитата на рост и размножение бактериальной культуры.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе бактериологической лаборатории (заведующая – Н.Н. Звёздкина) КГБУЗ «Краевая клиническая больница» были проведены 4 вида опытов для изучения влияния размороженного криопреципитата на рост бактериальных культур. Для этого использовались: стерильные пакеты (20 мл) нативного размороженного КП; бактериальные культуры трех видов *E. coli*, *Acinetobacter*, *E. faecalis* (наиболее часто встречающиеся у больных с панкреонекрозом); маркеры 4 видов антибиотиков: Цефтазидим, Цефепим, Меронем, Зивокс; стандартные питательные среды «Мясопептонный бульон» (МПБ), «Мясопептонный агар» (МПА), «агар Мюллера – Хинтона» (АМХ).

Клиническая часть работы была посвящена разработке технологии создания фибринового барьера в парапанкреатической клетчатке с использованием криопреципитата у 17 больных панкреонекрозом. У 14 больных был инфицированный панкреонекроз, а у 3 – стерильный. Мужчин было 16 (95 %), женщин – 1 (5 %). Средний возраст был равен  $42 \pm 5,0$  года. Длительность заболевания до госпитализации составила  $38,5 \pm 18,1$  часов. По данным ультразвукового исследования выявлялись диффузно-неоднородные изменения поджелудочной железы – у 7, нечеткость контуров поджелудочной железы – у 4, жидкость в сальниковой сумке – у 3, жидкость в свободной брюшной полости – у 5, расширение Вирсунгова протока – у 1. При поступлении у всех больных был высокий лейкоцитоз ( $16,0 \pm 1,3 \times 10^9$ /л и более) со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, повышение активности  $\alpha$ -амилазы крови ( $1312,2 \pm 304,8$  Ед./л) и диастазы мочи ( $8511,8 \pm 102,1$  Ед). Показатели С-реактивного белка варьировали от 91 до 221 мг/л, в среднем достигая  $177,3 \pm 17,6$  мг/л. Время до операции составило  $49,6 \pm 11,6$  часов (от 2 часов до 5 суток). Техника интраоперационного формирования искусственного фибринового барьера заключалась в инфильтрировании криопреципитатом забрюшинной клетчатки по границе распространения флегмоны, пункционно из нескольких точек – по нижнему краю поджелудочной железы, в корень брыжейки тонкой и поперечной ободочной кишок, параколярно справа и слева. Операцию завершали дренированием сальниковой сумки, забрюшинной клетчатки через контрапертурные абдоминальные доступы. У 3 больных со стерильным панкреонекрозом мы ограничились видеолапароскопической санацией и дренированием брюшной полости от ферментативного выпота и обкалыванием парапанкреатической забрюшинной клетчатки по нижнему краю поджелудочной железы.

Первая серия опытов включала посев на чашки Петри с мясопептонным агаром трех видов культур – *E. coli*, *Acinetobacter*, *E. faecalis* с концентрацией 500 и 5000 клеток в 1 мл в монокультуре и с добавлением на газон раствора криопреципитата. Оценка результатов проводилась через 24 часа после подраживания

культур в термостате при 37 °С. Как показали результаты, изменений в росте испытываемых бактериальных культур в присутствии КП не наблюдалось, что в качестве иллюстрации представлено на рисунках 1, 2.

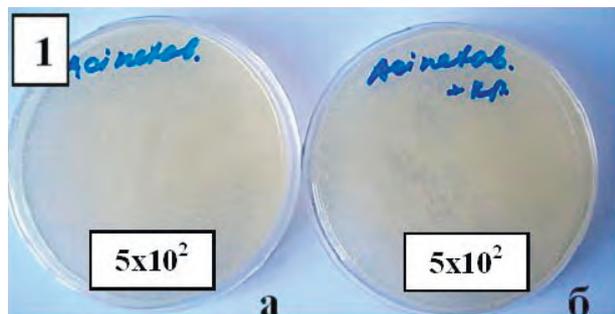


Рис. 1. Отсутствие изменений зон роста при визуальной оценке засева *Acinetobacter* (1–500 клеток): а – монокультура без КП; б – культура с добавлением КП.

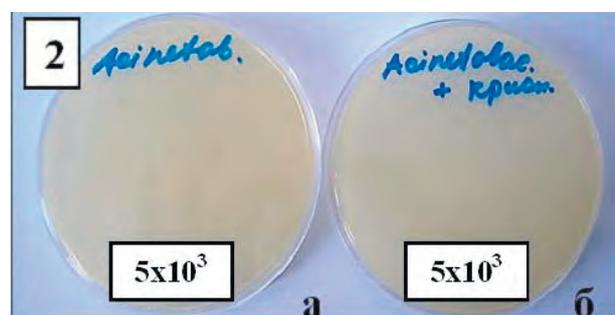


Рис. 2. Отсутствие изменений зон роста при визуальной оценке засева *Acinetobacter* (2–5000 клеток): а – монокультура без КП; б – культура с добавлением КП.

Таким образом, проведенные исследования позволили судить о том, что криопреципитат не является средой для стимуляции роста бактерий.

Вторая серия опытов заключалась в следующем: в пробирках выращено 3 вида суточных культур (*E. coli*, *Acinetobacter*, *E. faecalis*). Затем были приготовлены рабочие взвеси этих микроорганизмов, оптическая плотность каждой из которых была равна 0,5 по шкале МакФарланда, что составляет 500 тысяч клеток в 1 мл. В последующем путем десятикратных (уменьшили на 3 порядка) разведений каждой взвеси добились концентрации бактерий 500 клеток в 1 мл. В две среды объемом 2 мл (1 % МПБ и КП) было засеяно по 1 мл (500 клеток) каждой взвеси. В дальнейшем у всех трех культур была определена исходная оптическая плотность сред на денситометре MicroScan Turbidity Meter (Siemens). У взвеси *Acinetobacter* она составила в МПБ – 0,22, в КП – 0,69; у *E. faecalis* в МПБ – 0,22, в КП – 0,33 и у *E. coli* в МПБ – 0,21, в КП – 0,22. Спустя 24 часа на приборе повторно определили оптическую плотность этих сред, что представлено на рисунке 3, а результаты денситометрических исследований отражены в таблице 1.

Как видно, в приведенном опыте отмечено повышение оптической плотности бактериальной взвеси в 2,5–3 раза в МПБ, в то время как в криопреципитате изменений плотности среды не наблюдалось. Таким образом, отсутствие повышения оптической плотности криопреципитата спустя 24 часа у всех трех бактериальных культур

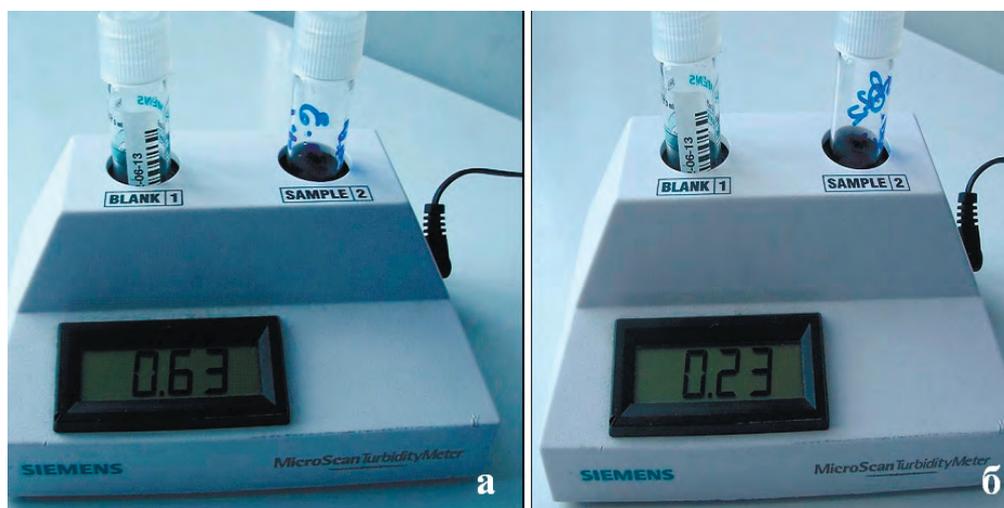


Рис. 3. Оптическая плотность среды *E. coli* спустя 24 часа: а – в МПБ; б – в криопреципитате.

Таблица 1

Динамика изменений оптической плотности сред микроорганизмов через 24 часа

Вид баккультуры	Плотность (МПБ)		Плотность (криопреципитат)	
	Начало исследования	Через 24 часа	Начало исследования	Через 24 часа
<i>Acinetobacter</i>	0,22	0,85	0,69	0,69
<i>E. faecalis</i>	0,22	0,54	0,32	0,32
<i>E. coli</i>	0,21	0,63	0,22	0,23

свидетельствует об отсутствии роста и размножения бактерий в этой среде.

Третья серия опытов включала: 1) количественный посев на чашки Петри с агаром Мюллера – Хинтона 2 видов культур: *E. coli*, *Acinetobacter* по отдельности в 3 разных количествах клеток (10000, 20000 и 50000 клеток); 2) исследование указанных бактериальных сред во взаимодействии только с антибиотиком и в сравнении изменения бактериальных сред с антибиотиком в присутствии криопреципитата. Были использованы 4 вида антибиотиков: Цефтазидим, Цефепим, Меронем, Зивокс. Визуальная и светометрическая оценка результатов осуществлялась после 12-часовой инкубации при температуре 37 °С. В серии контакта МПА, бактериальных культур и антибиотиков установлено выраженное замедление зон роста (рис. 3а, 4а). Вместе с тем, не отмечено влияния в изменениях зон роста бактерий в случаях контакта условно-патогенных бактерий *E. coli* (10000, 20000, 50000 клеток) при сочетанном воздействии КП и антибиотиков (рис. 4б, 5б).

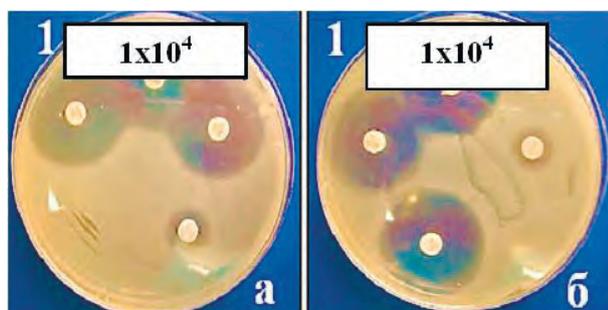


Рис. 4. Зоны роста бактерий *E. coli* – 10000 клеток: а – с присутствием антибиотиков; б – в сочетании КП и антибиотиков.

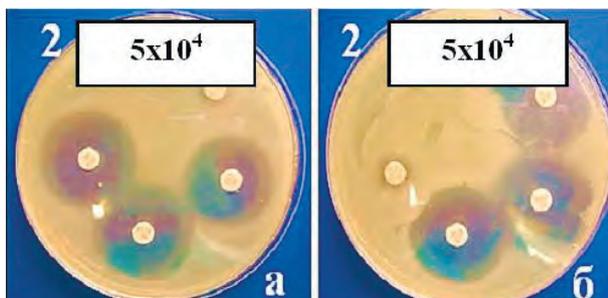


Рис. 5. Зоны роста бактерий *E. coli* – 50000 клеток: а – с присутствием антибиотиков; б – в сочетании КП и антибиотиков.

Такая же тенденция прослеживалась при контакте антибиотиков и КП с госпитальными (нозокомиальными) штаммами *Acinetobacter* (10000, 20000, 50000 клеток).

И, наконец, в четвертой серии опытов мы использовали 2 пробирочные среды – физиологический раствор и криопреципитат (рис. 6а), в которые была добавлена жировая ткань – забрюшинная клетчатка. В эти среды было внесено по 500 клеток *E. coli*. В дальнейшем проведено засеивание суточных культур обеих сред на кровяной агар. При оценке результатов степень обсемененности сред в

обоих случаях практически не отличалась, составляя примерно  $10^5$  (рис. 6б).



Рис. 6. Формирование 2 сред с забрюшинной клетчаткой: физиологический раствор и криопреципитат (а); степень обсемененности *E. coli*: КП и физиологический раствор (б).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целом в результате проведенных исследований было установлено, что при контакте КП микрофлорой не выявлено увеличения роста испытуемых бактерий. Возможно, это связано с присутствием среди адгезивных белков КП фибронектина, а также иммуноглобулинов, оказывающих блокирующее бактериостатическое действие. В клиническом исследовании течение послеоперационного периода протекало гладко у большинства оперированных больных панкреонекрозом, в лечении которых была использована технология отграничительного барьера в забрюшинной клетчатке. Летальных исходов не было. Послеоперационные осложнения возникли у 2 пациентов – поддиафрагмальный абсцесс слева (*Acinetobacter*,  $10^6$ ) и эвентрация, которые потребовали повторного оперативного вмешательства. Полиорганная недостаточность развилась в 1 случае, экссудативный плеврит – в 3. Плановые санации брюшной полости проведены у 5 пациентов. Проводилась санация сальниковой сумки, удаление некротических тканей. Распространения забрюшинной флегмоны за пределы сформированного фибринового барьера выявлено не было. В забрюшинной клетчатке по нижнему краю и кзади от поджелудочной железы (в месте введения криопреципитата) формировался инфильтрат, отграничивающий зону некроза и распространение воспалительного процесса в забрюшинной клетчатке. Толщина инфильтрата варьировала от 1 до 3 см. В этой связи дополнительного дренирования и расширения объема вмешательства не потребовалось. Компьютерная томография в послеоперационном периоде проводилась в сроки от 10 дней до 1 месяца. Распространения флегмоны в забрюшинном пространстве не зарегистрировано.

## ВЫВОДЫ

1. При внесении микроорганизмов в криопреципитатную среду роста микрофлоры, по сравнению с контролем, не наблюдается.
2. При инкубации бактериальной культуры в криопреципитате не происходит увеличения ее объема, что, вероятно, связано с бактериостатическим действием последнего.

3. Присутствие в микробной взвеси криопресипитата вместе с антибиотиком подавляет рост бактерий.

4. Степени роста инкубируемой микрофлоры (*E. coli* – 500 клеток) в физиологическом растворе и в КП с добавлением в них жировой клетчатки сопоставимы и свидетельствуют об отсутствии стимулирующего влияния жировой клетчатки на рост испытуемых бактерий.

5. Использование предлагаемого биокомпозита на основе криопресипитата для депонирования в парапанкреальной клетчатке у больных с панкреонекрозом в целях создания отграничительного барьера, препятствующего распространению забрюшинной флегмоны, не представляет угрозы активации микрофлоры в условиях инфицированной брюшной полости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахаладзе Г.Г. Применение препаратов фибринового клея в гепатопанкреато-билиарной хирургии // *Consilium medicum*. – 2002. – № 4 (6). – С. 320–322.

2. Бабенко А.А., Колесников С. А., Липшеев В.В. Профилактика и лечение раневых осложнений в абдоминальной хирургии // Матер. V научного форума «Хирургия 2004». – 2004. – С. 14.

3. Власов С.В., Кравченко А.И., Крейнс В.М. и др. Аппликации аутогенного криопресипитата в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // *Эфферентная терапия*. – 1998. – № 3. – С. 45–47.

4. Городецкий В.М., Галстян Г.М., Шулутко Е.М. Интенсивная терапия: национальное руководство: в 2 т. / Под ред. Б.Р. Гельфанда, А.И. Салтанова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Т. 1. – С. 142–145.

5. Елыкомов В.А. Совершенствование диагностики и контролируемой терапии ДВС синдрома на основе динамического исследования тромбинемии и применения криосупернатанта плазмы: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Барнаул, 1998. – 40 с.

6. Лубянский В.Г., Быков В.М., Яцын А.М. и др. Формирование тканевого отграничительного барьера в забрюшинной клетчатке при панкреонекрозе

// *Анналы хирургической гепатологии*. – 2012. – № 17 (4). – С. 99–106.

7. Лубянский В.Г., Момот А.П., Жариков А.Н. Трансфузионная гемокоррекция на этапах хирургического лечения больных с послеоперационным распространенным перитонитом // *Анналы хирургии*. – 2011. – № 6. – С. 50–56.

8. Неймарк А.И., Гаткин М.Я. Использование криопресипитата в комплексном лечении острого гнойного пиелонефрита // *Урология*. – 2005. – № 4. – С. 42–48.

9. Савельев В.С., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Панкреонекрозы. – М.: МИА, 2008. – 264 с.

10. Самохвалов И.М., Головкин К.П., Пичугин А.А. и др. Возможности применения метода временного внутриполостного гемостаза при ранениях и травмах живота // *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. – 2010. – № 4. – С. 32–38.

11. Северцев А.Н., Брехов Е.И., Миронов Н.П. и др. Использование в клинической практике некоторых фармакологических препаратов для достижения окончательного гемостаза при резекциях печени // *Клинический вестник «Кремлевская медицина»*. – 2000. – Вып. 2. – С. 22–26.

12. Техническое руководство американской ассоциации банков крови; пер. с англ. – Милан: Европейская школа Трансфузионной медицины, 2000. – С. 619–621.

13. Шуркалин Б.К., Горский В.А., Леоненко И.В. Проблема надежности кишечного шва // *Consilium medicum*. – 2004. – № 6 (6). – С. 17–25.

14. Черноусов А.Ф., Хоробрых Т.В., Карпова Р.В. и др. Регенерация цирротической печени кроликов при внутривенном введении криопресипитата // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2012. – № 9. – С. 384–386.

15. Banninger H., Hardegger T., Tobler A., Barth A. et al. Fibrin glue in surgery: frequent development of inhibitors of bovine thrombin and human factor V // *Br. J. Haematol.* – 1993. – Vol. 85. – P. 528–532.

16. Hogman C.F., Bagge L, Thoren L. The use of blood components in surgical transfusion therapy // *World J. Surg.* – 1987. – Vol. 11. – P. 2–13.

#### Сведения об авторах

**Черненко Виктор Федорович** – доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Лубянский Владимир Григорьевич** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Момот Андрей Павлович** – доктор медицинских наук, профессор, директор Алтайского филиала ФБГУ «Гематологический научный центр» Минздрава России

**Жариков Андрей Николаевич** – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры госпитальной хирургии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (656024, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1; тел.: 8 (3852) 68-95-74; e-mail: zhar67@mail.ru)

**Алиев Александр Руштиеви** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной хирургии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Звездкина Наталья Николаевна** – заведующая бактериологической лабораторией КГБУЗ «Краевая клиническая больница» Устинов Дмитрий Николаевич – врач – хирург хирургического отделения № 1 КГБУЗ «Городская больница № 1»