

В.Н. Гапанович<sup>2</sup>, В.В. Курковский<sup>1</sup>, Д.С. Третьяк<sup>4</sup>, В.П. Голубович<sup>3</sup>, С.С. Андреев<sup>2</sup>,  
Н.И. Мельнова<sup>2</sup>, И.Н. Жук<sup>2</sup>

**АНТИЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ ГЕМОСОРБЕНТ НА ОСНОВЕ  
СШИТОГО ПОЛИМИКСИНА** *Сообщение 2.*  
**ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ГЕМОСОРБЕНТА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»<sup>1</sup>, РНПЦ ТцГ/ УП «ЛОТИОС»<sup>2</sup>,  
ИБОХ НАН Беларуси<sup>3</sup>, УЗ «432 Главный военный клинический медицинский центр»<sup>4</sup>

---

*Настоящее сообщение посвящено исследованию сорбционной емкости полимиксин шитого гемосорбента в экспериментах in vivo.*

**Ключевые слова:** полимиксин В/ колистин, сорбция, анти- ЛПС гемосорбент, эндотоксин.

**V.N. Gapanovich, V.V. Kirkovsky, D.S. Tretiak, V.P. Golubovich, S.S. Andreev, N.I. Melnova, I.N. Zhuk**

**ANTILIPOLISAKHARIDNY HAEMOSORBENT ON THE BASIS OF SEWED POLYMYKSIN**

*This present report is devote to the investigation of the sorbtion capacity of the haemosorbent in experiments in vivo*

**Key words:** polymyxin B/ kolystin, sorbtion, anti- LPS haemosorbent, endotoxin.

---

Одной из важнейших характеристик вновь создаваемых сорбционных массообменных устройств является их удельная сорбционная емкость по отношению к определенному ряду соединений, подлежащих удалению из жидкостных сред организма в процессе проводимой гемосорбции. Разработанный нами гидрогелевый антилипополисахаридный (анти-ЛПС) гемосорбент предназначен для элиминации из организма эндотоксинов микробного происхождения в режиме экстракорпоральной гемоперфузии [1 – 3]. Селективность его действия обусловлена иммобилизацией на гидрогелевой матрице в качестве лиганда антибиотика семейства полимиксина В/колистина, ко-

торый избирательно связывает активную компоненту макромолекулы бактериального эндотоксина – липид А. Это обстоятельство предопределило выбор бактериальных эндотоксинов (ЭТ) в качестве индуктора экспериментального септического шока для оценки специфических целевых (эндотоксинсвязывающих) свойств разработанного гемосорбента.

**Цель исследования.** Изучение сорбционной эффективности гемосорбента, разработанного на основе полимерного гидрогелевого полиакриламидного носителя с ковалентно иммобилизованным полимиксином В/колистина.

**Материалы и методы.** Объектом исследования

являлись массообменный модуль, содержащий полиакриламидный гидрогель с ковалентно сшитым полимиксином В/колистином, кровь и плазма экспериментальных животных с септическим шоком.

Определение сорбционной активности анти-ЛПС гемосорбента определяли биологическим методом по его способности предупреждать развитие септического шока, характеризующегося резким снижением АД и возможной смертью животных при введении раствора сублетальной дозы ЛПС грамотрицательных бактерий.

Эксперименты выполнены на 16 здоровых кроликах породы «Шиншилла» массой 2,5-3,5 кг, рандомизировано распределенных на две равные серии: контрольную и опытную. За 12 часов до опыта животных лишали корма, оставляя им свободный доступ к воде. После их введения в наркоз (1% раствор тиопентала натрия, 50 мг/кг; 2% раствор реланиума, 20 мг/кг) 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 ЛПС *E. coli* O157:h7 (ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь) в дозе 0,5 мг/кг массы животного, который был предварительно проинкубирован с гемосорбентом в объемном соотношении 2:1 в течение 1 часа при температуре 37 °С (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.

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.

При исследовании цитологических параметров осуществляли подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов и их популяционный состав, а также определяли содержание гемоглобина, гематокритное число и оценивали качественные изменения клеток крови.

При исследовании белкового обмена в плазме кроликов определяли концентрацию общего белка, альбумина, содержание мочевины, креатинина и маркеров эндогенной интоксикации – среднемолекулярных пептидов [1, 4].

Концентрацию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , и  $\text{Cl}^-$  в плазме крови измеряли ион-селективными электродами на специализированном анализаторе Easy Lyte («MEDICA», США).

Для изучения динамики изменений протеолитической активности и ингибиторного потенциала в плазме крови кроликов определяли активность трипсиноподобных протеиназ и содержания их ингибиторов:  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 2-макроглобулина [3].

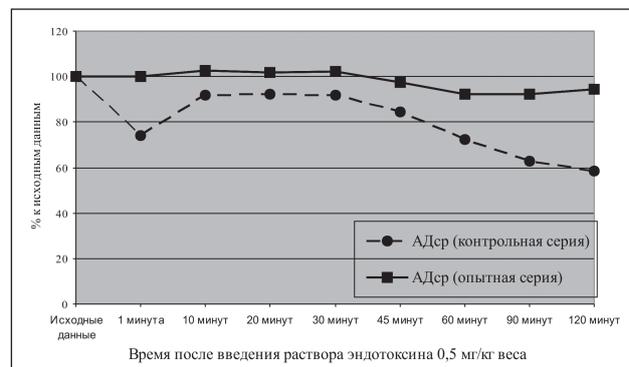
**Результаты исследования.** Изначальные величины среднего АД у кроликов, которым инфузия сублетальной дозы ЭТ, растворенной в 0,9% растворе NaCl для инъекций (10 мл/кг массы тела), осуществлялась без

обработки гемосорбентом, составили  $102,3 \pm 5,54$  мм рт.ст., и, соответственно,  $94,0 \pm 5,84$  мм рт.ст. – для кроликов, где эндотоксин обрабатывали гемосорбентом с сшитым полимиксином В/колистином.

Введение в сосудистое русло физиологического раствора с сублетальной дозой эндотоксина приводило к развитию септического шока с резким падением артериального давления до  $75,5 \pm 8,62$  мм рт.ст. ( $P < 0,05$ ). В течение 30 минут после этого среднее АД животных стабилизировалось на данном уровне, после чего отмечено дальнейшее нарастание гипотонии и к концу эксперимента оно снижалось до  $59,5 \pm 12,12$  мм рт.ст., что составило 58% от исходных величин.

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, свидетельствуя об эффективной элиминации эндотоксина из раствора разработанным гемосорбентом, и, как следствие – отсутствием развития характерной для эндотоксинового шока гипотензивной реакции, как это имело место у кроликов контрольной серии (рис.1).

Рисунок 1. Динамика изменения среднего АД у кроликов при введении сублетальной дозы эндотоксина.



В регистрируемые временные интервалы исследования в обеих сериях не происходило достоверно значимых изменений количества эритроцитов, содержания гемоглобина и уровня гематокрита, хотя по ходу эксперимента значения данных показателей имели тенденцию к снижению. Средний объем эритроцита и среднее содержание гемоглобина в эритроците практически не изменялось, а коэффициент анизоцитоза эритроцитов увеличивался ( $P > 0,05$ ).

Количество лейкоцитов в обеих сериях статистически достоверно снижалось уже через 5 минут после введения раствора эндотоксина, и эта направленность сохранялась до окончания эксперимента (120 минут). Однако снижение данного показателя относительно исходных величин в контрольной серии эксперимента (32,8% и 20,5%) было более выраженным, чем в опытной (37,9% и 30,4%). Параллельно отмечалось достоверное уменьшение количества моноцитов: на 79,8% и 67,0% – в контрольной серии, и, соответствен-

но, на 44,4% и 29,2% – в опытной. Схожая динамика наблюдалась и в отношении количества гранулоцитов.

Изменение количества лимфоцитов носило противоположный характер: к 5 минуте эксперимента как в контрольной, так и в опытной сериях оно увеличивалось до 182,5% и 142,9%, соответственно, с последующим снижением данного показателя спустя 2 часа после инфузии раствора с эндотоксином до 171,1% и 138,0%. Отмеченные сдвиги носили статистически достоверный характер по сравнению с исходными.

Интересная динамика отмечена нами в отношении количества тромбоцитов. Сразу после введения ЭТ наблюдалось резкое снижение их содержания, что характерно для ранних стадий эндотоксикоза, причем более выраженное в контрольной серии (до 27,1% от исходных данных). В дальнейшем количество кровяных пластинок увеличивалось, но не достигало изначального уровня. При анализе тромбоцитарного индекса – анизоцитоза тромбоцитов, было установлено, что начиная с 5 минуты эксперимента, незначительно возрастает гетерогенность популяции кровяных пластинок.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что на ранних стадиях эндотоксикоза (такowymi являются временные точки проводимого эксперимента) не происходит достоверно значимых изменений со стороны показателей красной крови, что также подтверждается литературными данными [7,8]. Иная картина наблюдалась в отношении белой крови. В ходе эксперимента было установлено, что введение экспериментальным животным ЭТ с и без инкубации с гемосорбентом вызывают лейкопению и лимфоцитоз, моноцитопению и гранулоцитопению. Однако следует отметить, что эти изменения были более выраженными в случае введения кроликам раствора эндотоксина без предварительной инкубации с гемосорбентом. Полученный результат свидетельствовал об эффективности анти-ЛПС гемосорбента в связывании эндотоксинов, что проявляется в заметном снижении их 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 таковым спустя 2 часа эксперимента, причем без принципиальных различий между опытной и экспериментальной серией. При этом величина регистрируемых изменений (8-12% от изначального уровня) однозначно указывает на гемодилуцационный генез, обусловленный проводимой инфузией.

В ходе исследования зарегистрировано некоторое повышение содержания мочевины и значительное (более, чем в 2,5 раза) увеличение концентрации креатинина. Известно, что гиперкреатинемия является одним из основных диагностических критериев сепсиса [8]. В связи с этим значения этого показателя в опытной серии, практически не отличающиеся от исходных, могут служить критерием эффективности разработанного анти-ЛПС гемосорбента в плане сорбционной активности по отношению к эндотоксину.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что инкубация эндотоксина 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 аланин- и аспартатаминотрансферазной (АЛТ и АСТ, соответственно) активности в обеих сериях животных, причем для активности АЛТ это изменение было более выражено и носило достоверный характер ( $P < 0.05$ ) по сравнению с исходными данными.

Наиболее выраженные изменения нами были зарегистрированы для концентрации глюкозы. Известно, что формирование состояния гиперметаболизма при сепсисе сопровождается повышенным потреблением энергии [7]. Происходит стимуляция глюконеогенеза, а гликолиз резко уменьшается [7], что приводит к гипергликемии, гиперлактатемии при резистентности к инсулину. С этой точки зрения, динамика изменения концентрации глюкозы в эксперименте может служить своеобразным критерием

Таблица 1. Динамика изменения белкового обмена при моделировании эндотоксического шока на кроликах.

Условия эксперимента	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, ммоль/л	Средние молекулы, г/л
Контрольная серия					
Исходные значения	65,85±0,97	38,77±1,03	5,06±0,24	74,26±1,01	0,81±0,03
Через 5 мин после инфузии	61,70±0,90*	37,89±1,11	4,73±0,23	103,27±0,96*	0,69±0,02*
Через 2 часа после инфузии	62,80±1,62	36,14±0,97	6,08±0,31	199,53±2,72*	0,71±0,04
Опытная серия					
Исходные значения	69,76±1,12	38,35±0,84	6,57±0,49	90,88±2,19	0,81±0,03
Через 5 мин после инфузии	63,01±1,35*	35,40±1,04	6,34±0,57	104,02±3,35*	0,71±0,03
Через 2 часа после инфузии	59,88±1,72*	33,55±1,09*	4,96±0,47	100,91±5,21**	0,63±0,01*

Примечание: \* и \*\* – достоверность различий по отношению к исходным значениям и значениям, полученным в контрольной серии с введением эндотоксина, соответственно, при уровне значимости ( $P < 0,05$ )

Таблица 2. Динамика изменения активности аминотрансфераз и содержания глюкозы в плазме крови кроликов при моделировании эндотоксического шока.

Условия эксперимента	АЛТ, У/л	АСТ, У/л	Глюкоза, ммоль/л
Контрольная серия			
Исходные значения	39,0±2,64	24,3±2,66	10,55±0,802
Через 5 минут после инфузии	40,3±2,73	35,3±2,03	9,83±0,401
Через 2 часа после инфузии	58,3±3,43*	27,7±4,18	29,08±1,371*
Опытная серия			
Исходные значения	50,2±0,86	34,3±1,45	8,22±0,350
Через 5 минут после инфузии	47,3±1,45	34,3±1,45	8,65±0,456
Через 2 часа после инфузии	62,5±2,40*	40,0±3,89	15,04±0,512*,**

Примечание: \* и \*\* – достоверность различий по отношению к исходным значениям и значениям, полученным в контрольной серии с введением эндотоксина, соответственно, при уровне значимости (P<0,05)

эффективности сорбции эндотоксина на анти-ЛПС гемосорбенте (табл. 2). Через 5 минут после введения раствора ЭТ значение этого показателя в обеих сериях практически не отличалось от исходных данных. Но уже через 2 часа гипергликемия в контрольной серии была достоверно выраженной (почти в 2 раза), чем в опытной. Отмеченный факт однозначно указывает на то, что в растворе, предварительно проинкубированном с анти-ЛПС гемосорбентом, концентрация ЭТ была ниже.

Известно, что одним из основных звеньев в патогенезе развития эндогенной интоксикации при сепсисе является поступление в жидкостные среды организма высокоактивных протеолитических ферментов на фоне подавления ингибиторного потенциала [1,7]. Степень трипсиноподобной активности плазмы (ТПА) наиболее точно отражает уровень протеолиза.

В ходе проведенных исследований в контрольной серии животных повышение протеиназной активности плазмы крови регистрировалось уже через 5 минут после введения в кровоток кроликам раствора эндотоксина, уровень ТПА плазмы повышался в 2 раза. В последующие интервалы наблюдения (2 часа и 1 сутки после введения раствора ЭТ) отмечалось достоверное повышение исследуемого показателя до 92,7±1,5 ммоль/с-л и 244,7±18,8 ммоль/с-л, соответственно, что уже в 4 раза превышало их исходный уровень. При этом содержание α1- антитрипсина (α1-АТ) несколько возрастало: через 5 мин 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 α1-АТ и достоверное снижение содержания α2 – макроглобулинов (α2 -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 у кроликов контрольной серии, однако повышение данного показателя было менее выраженным во все сроки исследования. Что касается ингибиторного потенциала, то положительные эффекты предварительной инкубации рас-

твора ЭТ с разработанным анти-ЛПС гемосорбентом прослеживались не только по величине, но и в их динамике. Так, тенденция к увеличению содержания в плазме крови α1-АТ регистрировалась только через 5 минут после введения ЭТ, предварительно обработанного сорбентом, а к 2-м часам отмечалось восстановление исследуемого показателя, причем изменения носили характер статистически достоверной зависимости. Содержание α2-МГ во все сроки исследования практически не изменялось, оставаясь в пределах изначальных величин.

Таким образом, разработанный на основе полимерного гидрогелевого полиакриламидного носителя с ковалентно иммобилизованным полимиксином В/колистином антилиполисахаридный гемосорбент обладает удовлетворительной сорбционной емкостью относительно эндотоксина E.coli, что проявляется в купировании развития проявлений эндотоксического шока и выраженных гемодинамических нарушений после введения животным тест – дозы эндотоксина, предварительно обработанного гемосорбентом. Отмеченная биоспецифичность гемосорбента позволяет предполагать его потенциально высокие возможности для целевого клинического применения в ситуациях, сопровождающихся развитием эндотоксического шока.

### Литература

1. Аполлонин, А.В. Эндотоксинсвязывающие системы крови / А.В. Аполлонин, в. Г. Лиходед, М.Ю. Яковлев // Журнал микробиологии. 1990. №11. С.100-106.
2. Ватазин, А.В. Селективная адсорбция эндотоксина грамотрицательных бактерий при хирургическом сепсисе // М., И.В. Балабанов 2011. С.16-49.
3. Введенский, Д.В. Клиническая эффективность биоспецифического гемосорбента «Липосорб» / Д.В. Введенский, В.В. Кирковский, В.П. Голубович, В.Н. Гапанович, А.В. Старостин, Д.А. Макаревич // Вестник Российской академии медицинских наук. 2009. № 10. С. 40-43.
4. Лопаткин, Н.А., Лопухин Ю. М. Эфферентные методы в медицине. М: Медицина, 1989. С. 352
5. Садчиков, Д.В. Влияние вида токсина на характер нарушений центральной гемодинамики при септическом шоке / Д.В. Садчиков // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1985. № 6. С. 19-23.
6. Яковлев, М.Ю. Кишечный липополисахарид: системная эндотоксинемия – эндотоксическая агрессия – SIRS – полиорганная недостаточность как звенья одной цепи / М.Ю. Яковлев // Бюлл. ВЦ РАН. 2005. №1. С. 15-18.

☆ **Оригинальные научные публикации**  *Новые технологии в медицине*

7. Яковлев, М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М.Ю. Яковлев // Физиология человека. 2003. № 4. С. 154-164.

8. Яковлев, М. Ю. Эндотоксининдуцированные повреждения эндотелия / М.Ю. Яковлев, Н.К. Пермяков, В.Г. Лиходед и соавт. // Архив патологии. 1996. №2. С. 41-46.

9. Kanesaka, S., Sasaki J., Kusume et.all: Effekt of direck hemoperfusion using Polymyxin B immobilized fiber on inflammatory mediators in patients with M.Kodama, T.Tani. Treatment of sepsis

by plasma endotoxin removal: hemoperfusion using a Polymixin-B immobilized column. «Journal of endotoxin research 1997» 4(4), 293-300.

10. Rachoïn, J.S., Foster D., Dellinger R.P. Endotoxin removal: how far from evidence? From EUPHAS to EUPHRATES // Contrib. Nephrol. 2010/ Vol/ 167/ P/ 111-118.

11. Tsukasa, Nakamura, Takaharu Matsuda Polymixin B-immobilized fiber Hemoperfusion in patient with sepsis: « Dialysis and Transplantation 2007».

*Поступила 4.12.2012 г.*