

УДК 615.361.013.68.014.41:612.017.1:616.381-002

**В.И. Грищенко, И.А. Криворучко\*, К.А. Гольцев,  
О.Ю. Кожина\*, А.Н. Гольцев**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков  
\*Харьковский национальный медицинский университет*

### **КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ ПРИ РАЗВИТИИ ОСТРОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА**

В эксперименте на крысах показано, что комплексное применение криоконсервированной кордовой крови с антибиотиком во время релапаротомии при остром гнойном перитоните в большей степени, чем применение только антибиотика, корригирует состояние клеточного и гуморального звеньев иммунитета и моноцитарно-фагоцитарной системы, а также снижает воспаление и повышает выживаемость животных.  
**Ключевые слова:** криоконсервированная кордовая кровь, иммунитет, гнойный перитонит, релапаротомия.

Накопленный и обобщенный за многие годы опыт работы хирургических клиник мира подтверждает мультифакториальность разных форм послеоперационных осложнений [1–4]. Считается, что наряду с инфекцией, токсемией, нарушением метаболизма послеоперационные гнойные осложнения являются результатом стресс-индуцированного угнетения функции иммунной системы (ИС) организма [5–7]. В обеспечении гомеостаза организма важную роль играет взаимодействие нервной, иммунной и эндокринной систем [8, 9]. Это является основанием говорить о том, что нарушение статуса одной из составных этого треугольника, в данном случае ИС, приведет к разбалансировке остальных его компонентов.

Для лечения острого гнойного перитонита (ОГП) применяют различные лекарственные препараты [1–3, 6, 10], включая глюкокортикоиды [11], антибиотики [1–3, 12], физические методы — СВЧ [11, 13], хирургическое вмешательство [14], диализ [15], аппаратную лимфодиллюцию [16], которые, однако, не всегда дают позитивный эффект.

В связи с этим очевидна необходимость поиска новых подходов и применение препаратов, которые оказывали бы полифункциональный лечебный эффект [4, 17, 18]. В широком спектре препаратов клеточной и

тканевой терапии такого рода активностью обладают продукты фетоплацентарного комплекса [8], в частности криоконсервированная кордовая кровь [15, 19, 20, 21]. Ее применяют для лечения различных заболеваний [19, 20, 22], учитывая проявление таких эффектов, как противовоспалительный, рассасывающий и анальгезирующий, биостимулирующий и иммуностимулирующий и т. д. Лейкоконцентрат из кордовой крови человека, криоконсервированный в аутологичной плазме [15, 20, 21], содержит такие биологически активные вещества, как монокины, интерлейкины, интерфероны, ферменты, гормоны, микроэлементы, аминокислоты и витамины [15, 19, 22].

Цель работы — провести сравнительную оценку состояния ИС, частоту развития послеоперационных осложнений и выживаемость крыс с острым гнойным перитонитом (ОГП) после лечения антибиотиком либо в сочетании последнего с криоконсервированной кордовой кровью.

**Материал и методы.** Работа выполнена на крысах линии Вистар массой 160–180 г в возрасте 6 месяцев в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург, 1985) и принципами Национального конгресса Украины по биоэтике (Киев, 2001).

© В.И. Грищенко, И.А. Криворучко, К.А. Гольцев и др., 2011

ОГП моделировали путем перевязки и отсеечения червеобразного отростка с оставлением его в брюшной полости [14]. Оперировали крыс под общим тиопенталовым наркозом. Лейкоконтрат криоконсервированной кордовой крови из цельной кордовой крови человека получали путем пассивной седиментации эритроцитов в градиенте плотности с добавлением полиглюкина. Криоконсервирование лейкоконцентра проводили на программном замораживателе УОП-6 производства СКТВ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины без добавления традиционного криопротектора по двухэтапной программе, разработанной и запатентованной в Институте [21]. Размораживание осуществляли на водяной бане при температуре 40–41 °C [15].

Все крысы были разделены на четыре группы: 1-я — интактные крысы (контроль); 2-я — крысы с ОГП, которым через 24 часа проводили релапаротомию и санацию брюшной полости раствором фурацилина; 3-я — крысы с ОГП, которым через 24 часа проводили релапаротомию, санацию брюшной полости раствором фурацилина и внутримышечной инъекцией ампициллина в дозе 40 мг/кг массы тела; 4-я — крысы с ОГП, которым через 24 часа проводили релапаротомию, санацию брюшной полости раствором фурацилина и одновременно с инъекцией ампициллина внутривенно вводили криоконсервированную кордовую кровь в объеме 0,3 мл /  $(5-6) \cdot 10^6$  клеток.

Иммунный статус (ИС) у крыс оценивали по показателям клеточного (КЗИ) и гуморального (ГЗИ) звеньев иммунитета, а также состояния моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС). Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток (ИКК) селезенки определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16 и CD72 мембранным молекулам (BD, США) [23]. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) как показатели ГЗИ определяли в сыворотке крови по методу [24] и [25]. Адгезивную способность и фагоцитарную активность клеток перитонеальной полости (ПП) изучали методами [26, 27]. Оценку указанных показателей проводили через 1, 3, 5 суток после релапаротомии. Из эксперимента животных выводили путем декапитации [28]. Во 2-, 3- и 4-й группах

были дополнительно оставлены животные с ОГП для определения их выживаемости в течение 1, 3 и 5 суток.

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрическим методом Манна–Уитни [29].

**Результаты и их обсуждение.** Из данных детальной оценки причин развития перитонита очевидно, что практически все его формы, включая ОГП, являются заболеваниями всего организма, т. е. системными патологиями [5, 8, 9]. Бактериальная инфекция как триггерный фактор данной патологии индуцирует развитие интоксикации со всеми вытекающими из этого последствиями: нарушение водного, электролитного, углеводного и витаминного обменов. На этом фоне развиваются серьезные расстройства базовых систем обеспечения гомеостаза, т. е. нервной, иммунной и эндокринной [5, 9, 30].

Исходя из сказанного, становится очевидной необходимость применения для лечения ОГП препаратов с потенциалом системной регуляторной активности (коррекции) [7, 17–19]. На основании достаточного объема информации к ним вполне можно отнести и криоконсервированную кордовую кровь [6, 8, 19–21]. Именно она была апробирована в наших исследованиях как потенциальный корректор состояния иммунной системы организма при развитии ОГП.

При оценке интегрального показателя тяжести развития ОГП — гибель животных — показаны четкие его различия в разных группах (табл. 1). Во 2-й группе к 3-м суткам погибло около 50 % крыс, а к 5-м суткам — около 80 %. В 3-й группе интегральная выживаемость животных была в 1,8 раза выше, чем во 2-й группе. При дополнительном применении с антибиотиком лейкоконцентра кордовой крови (4-я группа) повышалась выживаемость животных на 25 % уже к 3-м суткам в сравнении с таковой у крыс 2-й группы. К 5-м суткам различия в выживаемости животных в группе нелеченных или леченных только антибиотиком по сравнению с показателем крыс 4-й группы становились еще более выраженными, что подчеркивало преимущество сочетанной терапии антибиотиком и криоконсервированной кордовой кровью. Необходимо отметить, что основная масса животных во 2-й и 3-й группах погибала к 3-м суткам (около 50 %), а с 3-х по 5-е — погибло 20 % животных. В 4-й же группе ги-

Таблиця 1. Вживаемость крыс при развитии ОГП и после лечения, %

| Группа животных                                 | Срок после релапаротомии, сутки |            |            |
|---|---------------------------------|------------|------------|
|   | 1-е                             | 3-и        | 5-е        |
| Гнойный перитонит                               | 100                             | 45,0±2,9   | 19,2±1,2   |
| Гнойный перитонит + антибиотик                  | 100                             | 55,0±3,6*  | 32,5±2,1*  |
| Гнойный перитонит + антибиотик + кордовая кровь | 100                             | 79,1±4,7*# | 58,3±3,7*# |

Примечание.  $p < 0,05$ ; различия достоверны при сравнении с показателем: \* 2-й группы; # 3-й группы в соответствующие сроки.

бель животных была равномерной, а именно: примерно по 20 % как к 3-м суткам, так и к 5-м, т. е. криоконсервированная кордовая кровь создавала «запас прочности» выживаемости уже к 3-м суткам, что подчеркивает ее способность быстро мобилизовать защитный потенциал организма.

Известно, что в патогенезе перитонита, включая и ОГП, активная роль принадлежит интоксикации [2, 3, 7, 17, 18], поэтому в брюшной полости нагноительные процессы быстро приводят к насыщению организма токсинами и прежде всего бактериального происхождения. Такое состояние, которое само по себе является мощным стрессорным фактором, может вызвать серьезные перестройки структурно-функциональных характеристик ИС [5, 11, 13]. Чрезмерная экспансия патогенной микрофлоры в этих условиях в большей степени характеризуется как иммуносупрессивный синдром. Представленные результаты показали, что в таком дисфункциональном состоянии пребывают все оцененные звенья иммуни-

тета, а именно: КЗИ, ГЗИ, а также клетки МФС [7, 20, 22].

При оценке состояния ГЗИ был отмечен факт наиболее выраженного повышения содержания ЦИК уже с первых суток после индукции ОГП (табл. 2). К 5-м суткам их содержание в крови увеличилось до величин, почти в 15 раз превышающих норму, — (282,0±11,2) и (20,8±1,2) ед. ( $p < 0,05$ ). Антитела являются одним из первых рубежей иммунного ответа на антиген в виде любых бактериальных инфекций. Вместе с тем, они являются основным компонентом формирующихся в этих условиях ЦИК. Поэтому вполне логичным является существенное снижение содержания на этом фоне уровня иммуноглобулинов, главного структурного компонента ЦИК (табл. 2). Важно, что снижение концентрации отмечено для всех классов иммуноглобулинов (IgA, IgG и IgM), что подчеркивает степень тяжести развивающейся патологии.

После терапии антибиотиком у животных 3-й группы отмечалась положительная

Таблиця 2. Показатели содержания ЦИК и иммуноглобулинов в крови крыс с ОГП и после лечения

| Группа  | Срок после релапаротомии, сутки | ЦИК, ед.    | IgA, мг/мл | IgM, мг/мл | IgG, мг/мл |
|---|---------------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| Контроль  |                                 | 20,8±1,2    | 4,2±0,2    | 1,6±1,0    | 16,0±0,3   |
| Гнойный перитонит                               | 1-е                             | 153,7±0,5*  | 0,70±0,09  | 0,68±0,08  | 6,0±0,5    |
|   | 3-и                             | 190,2±1,2*  | 0,58±0,06  | 0,48±0,04  | 6,0±0,2    |
|   | 5-е                             | 282,0±11,2* | 0,46±0,02  | 0,32±0,10  | 4,2±0,2    |
| Гнойный перитонит + антибиотик                  | 1-е                             | 49,2±0,2*#  | 1,5±0,1    | 0,76±0,04  | 9,6±0,4    |
|   | 3-и                             | 52,4±0,6*#  | 1,60±0,04  | 0,89±0,05  | 8,7±0,3    |
|   | 5-е                             | 52,0±0,5*#  | 1,74±0,20  | 0,8±0,1    | 8,9±0,7    |
| Гнойный перитонит + антибиотик + кордовая кровь | 1-е                             | 16,4±2,4#^  | 1,7±1,0    | 0,49±0,80  | 7,8±0,6    |
|   | 3-и                             | 18,0±0,4#^  | 1,9±0,1    | 0,99±0,20  | 9,7±0,1    |
|   | 5-е                             | 20,7±0,9#^  | 3,7±0,3    | 1,60±0,08  | 15,6±0,4   |

Примечание.  $p < 0,05$ ; различия достоверны при сравнении с показателем: \* контроля; # 2-й группы; ^ 3-й группы в соответствующие сроки.

динамика уровня ЦИК и Ig уже с 1-х суток. Однако и на 5-е сутки они еще значительно отличались от показателей контрольной группы. Так, уровень ЦИК превышал контрольные значения в 2,5 раза, а показатели Ig были в 1,5–2,5 раза ниже контроля. Применение криоконсервированной кордовой крови с антибиотиком обеспечивало снижение содержания ЦИК уже с 1-х суток. В дальнейшем концентрация ЦИК немного повышалась, но все равно оставалась в пределах нормы — (20,7±0,9) и (20,8±1,2) ед. Содержание Ig у крыс этой группы только к 5-м суткам достигало контроля. Данный факт свидетельствует о том, что криоконсервированная кордовая кровь уже с 1-х суток влияет на процессы формирования ЦИК и способна потенцировать функциональный статус системы выведения ЦИК с более поздней и пролонгированной реабилитацией функции клеток с антитело-продуцирующей функцией. Подтверждение данного тезиса находим в результатах оценки состояния МФС (табл. 3).

темных иммуновоспалительных процессах и несостоятельности клеток МФС реализовать потенциал их выведения в условиях гипертонсикации часто приводит к накоплению ЦИК в крови [30].

Представленные в табл. 3 данные доказывают факт такой несостоятельности и при развитии ОГП. Так, ФИ клеток ПП при ОГП был в 1,5 раза ниже, чем в контроле, уже на 1-е сутки после индукции патологии — 59,4±0,4 и 96,2±0,8 (p<0,05). К 5-м суткам эти различия еще в большей степени увеличивались — 39,0±0,2 и 96,2±0,8. Менее выражено изменялась поглотительная активность каждого фагоцита (ФЧ), хотя ИЗФ, т. е. переваривающая их активность, к 5-м суткам снижалась в 2 раза относительно контроля — 0,71±0,06 и 1,40±0,09 (p<0,05). Терапия антибиотиком давала также положительный эффект в отношении данных показателей. Так, уже через сутки на 10–15 % улучшались показатели ФИ. Подобная динамика была отмечена и для ФЧ и ИЗФ. Дополнительная санация с антибиотиком и введением криоконсер-

Таблица 3. Показатели фагоцитарной активности клеток ПП у крыс с ОГП и после лечения

| Группа  | Срок после релапаротомии, сутки | ФЧ                      | ФИ                       | ИЗФ                      |
|---|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Контроль  |                                 | 96,2±1,8                | 4,0±0,6                  | 1,40±0,09                |
| Гнойный перитонит                               | 1-е                             | 59,4±0,4*               | 4,0±0,5                  | 0,90±0,04*               |
|   | 3-и                             | 42,0±0,6*               | 3,6±0,4                  | 0,7±0,2*                 |
|   | 5-е                             | 39,0±0,2*               | 3,2±0,4                  | 0,71±0,06*               |
| Гнойный перитонит + антибиотик                  | 1-е                             | 69,3±0,3* <sup>#</sup>  | 4,5±0,5                  | 1,3±0,1 <sup>#</sup>     |
|   | 3-и                             | 72,4±0,8* <sup>#</sup>  | 4,2±0,2                  | 1,40±0,06 <sup>#</sup>   |
|   | 5-е                             | 71,5±0,5* <sup>#</sup>  | 4,2±0,2 <sup>#</sup>     | 1,30±0,06 <sup>#</sup>   |
| Гнойный перитонит + антибиотик + кордовая кровь | 1-е                             | 95,4±1,8* <sup>#^</sup> | 2,9±0,3* <sup>#^</sup>   | 0,95±0,05* <sup>#^</sup> |
|   | 3-и                             | 89,9±1,6* <sup>#^</sup> | 1,40±0,05* <sup>#^</sup> | 1,2±0,1 <sup>#</sup>     |
|   | 5-е                             | 92,6±2,6* <sup>#^</sup> | 4,0±0,5                  | 1,40±0,07 <sup>#</sup>   |

Примечания: 1. ФЧ — фагоцитарное число, % фагоцитирующих нейтрофилов — показатель фагоцитарной активности; ФИ — фагоцитарный индекс, среднее количество микробов в каждом из фагоцитировавших нейтрофилов; ИЗФ — индекс завершенности фагоцитоза.

2. p<0,05; различия достоверны при сравнении с показателем: \* контроля; <sup>#</sup> 2-й группы; <sup>^</sup> 3-й группы в соответствующие сроки.

Известно, что МФС реализует в организме важнейшую функцию выведения из организма «балластных» структур, накапливающихся как в условиях физиологии, так и при развитии патологии. Одной из функций клеток МФС является выведение формируемых ЦИК. Чрезмерное формирование иммунных комплексов в организме при сис-

вированной кордовой крови имела явное преимущество. Уже через сутки на уровне контроля был ФИ. Однако ФЧ и ИЗФ в этот срок были ниже, чем во 2-й группе. Данный факт может свидетельствовать о том, что криоконсервированная кордовая кровь реализует свой потенциал быстрого рекрутирования фагоцитов в ПП из других участков

организма, включая и костный мозг. Однако в этом случае привлекаются менее зрелые формы и, естественно, менее состоятельные в функциональном отношении. Тем не менее уже на 5-е сутки у крыс 4-й группы как количество, так и функциональная активность клеток ПП по этим показателям не отличались от контроля.

Таким образом, результаты оценки фагоцитарной активности клеток ПП (табл. 3) вполне могут быть экстраполированы на характеристики других клеток МФС у животных с ОГП как до, так и после лечения. Кроме того, они вполне согласуются с показателями уровня ЦИК, представленными в табл. 2, подтверждая факт участия клеток-фагоцитов в элиминации субстрата ГЗИ, имеющего существенную значимость в патогенезе развития ОГП.

Любого уровня иммуновоспалительные процессы реализуются при кооперативном взаимодействии субстратов всех звеньев ИС [30]. Межклеточные взаимодействия ИКК как между собой, так и с другими клетками в организме человека и животного, таких, например, как эпителий сосудов, эпителиальные клетки серозных поверхностей и т. д., реализуются при участии молекул адгезии (VCAM, ICAM, LFA, CD44 и др.). Степень экспрессии этих молекул, как и количество клеток, их экспрессирующих, определяется особенностями цитокинового профиля организма, который, в свою очередь, зависит от степени развития иммуновоспалительного процесса [30] и соподчинен влиянию проводимой терапии.

Таблица 4. Показатели адгезивной активности клеток ПП у крыс с ОГП и после лечения

| Группа  | Срок после релапаротомии, сутки | Количество клеток, $\times 10^6$ /мл | АКПП, %                       |
|---|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Контроль  |                                 | 14,4 $\pm$ 1,1                       | 56,8 $\pm$ 1,9                |
| Гнойный перитонит                               | 1-е                             | 24,8 $\pm$ 0,9*                      | 15,0 $\pm$ 1,2*               |
|   | 3-и                             | 12,6 $\pm$ 1,4                       | 16,4 $\pm$ 0,2*               |
|   | 5-е                             | 16,4 $\pm$ 0,6                       | 6,6 $\pm$ 0,6*                |
| Гнойный перитонит + антибиотик                  | 1-е                             | 12,0 $\pm$ 0,2* <sup>#</sup>         | 17,2 $\pm$ 2,4*               |
|   | 3-и                             | 13,2 $\pm$ 1,4                       | 26,4 $\pm$ 1,6* <sup>#</sup>  |
|   | 5-е                             | 6,5 $\pm$ 0,5* <sup>#</sup>          | 20,1 $\pm$ 2,0* <sup>#</sup>  |
| Гнойный перитонит + антибиотик + кордовая кровь | 1-е                             | 15,6 $\pm$ 0,8* <sup>#^</sup>        | 26,8 $\pm$ 2,0* <sup>#^</sup> |
|   | 3-и                             | 12,5 $\pm$ 1,5                       | 46,4 $\pm$ 6,8* <sup>#^</sup> |
|   | 5-е                             | 17,2 $\pm$ 1,2 <sup>^</sup>          | 83,6 $\pm$ 5,1* <sup>#^</sup> |

Примечания: 1. АКПП — адгезивные клетки ПП, % от общего их содержания в ПП.

2.  $p < 0,05$ ; различия достоверны при сравнении с показателем: \* контроля; # 2-й группы; ^ 3-й группы в соответствующие сроки.

Данные тезисы подтверждают полученные результаты (табл. 4).

Уже в ранние сроки развития патологии (1-е сутки) наблюдается двукратное увеличение количества клеток в ПП в сравнении с контролем. Вместе с тем среди них клеток с адгезивным потенциалом (АКПП) было почти в 4 раза меньше, чем в контроле. Хотя количество клеток в ПП и приближалось к контрольным значениям в дальнейшем, содержание среди них клеток, способных к адгезии, еще в большей степени снижалось на 5-е сутки. Данный факт может свидетельствовать о том, что по мере манифестации иммуновоспалительного процесса при развитии ОГП основная часть адгезивных ИКК сосредоточивается на брюшине для реализации своих функций.

Интересно, что при применении антибиотика (3-я группа) в ранние сроки (1-е и 3-и сутки) нормализовалось количество клеток в ПП, но уже к 5-м суткам оно резко снижалось. Что касается потенциала адгезии, то ни в один срок процент клеток с такой функцией даже не приближался к норме, хотя положительный эффект такой терапии прослеживался.

Комплексная терапия антибиотиком с криоконсервированной кордовой кровью давала значительно более выраженный положительный результат, чем в случае применения только антибиотика. Начиная с 3-х суток практически у всех крыс 4-й группы общее количество клеток в ПП соответствовало таковому в контроле. Количество АКПП на 1-е сутки у животных этой

группы также не достигало уровня контроля, хотя почти в 2 раза превышало показатели у животных 2-й группы. На 3-и сутки у крыс 4-й группы показатели не отличались от контроля, а на 5-е сутки — даже немного превышали его.

Известно, что функциональный потенциал клеток МФС существенным образом влияет на состояние КЗИ [30]. При оценке фенотипических характеристик основных популяций и субпопуляций КЗИ установлены существенные их различия у интактного контроля и при развитии ОГП. При этом важно, что за редким исключением ни один из выбранных показателей КЗИ после развития ОГП не оставался на уровне контроля. Исключение составили только  $\beta$ -лимфоциты ( $CD72^+$ -клетки), концентрация которых и при развитии ОГП оставалась в рамках дисперсии показателей контрольных животных. Важным моментом при данной патологии является закономерное изменение показателей Т-клеточного иммунитета по мере пролонгации срока. Действительно, концентрация общих Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ -клетки) уже через сутки после развития ОГП была в 2 раза ниже контроля. Как указывалось, развитие любых системных патологий, в том числе и ОГП, является для организма мощным стресс-индуцирующим фактором. Т-лимфоциты, как общая популяция, так и ее субпопуляции, экспрессируют на мембране значительное количество рецепторов к глюкокортикоидам, что обуславливает их гибель в апоптозе при повышенной концентрации этих гормонов в

организме. Механизм такой гибели Т-лимфоцитов реализуется как минимум через 40–48 часов после развития стресса [30]. Следовательно, отмеченное нами существенное снижение содержания Т-клеток в селезенке уже на 1-е сутки патологии имеет, видимо, другую причину. Не исключено, что это обусловлено миграцией Т-лимфоцитов из селезенки на начальных этапах развития ОГП в очаг воспаления, т. е. в ПП. Подтверждением этому могут быть представленные в табл. 4 данные о двукратном повышении концентрации клеток в ПП. В дальнейшем к этому может подключиться и гибель Т-клеток в апоптозе.

Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов, а именно: Т-хелперов ( $CD4^+$ -клеток) и Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов ( $CD8^+$ -клеток), являются составным компонентом общей фракции Т-клеточной системы. Поэтому не удивительно, что практически такая же динамика по мере развития ОГП наблюдается и для общих Т-лимфоцитов. Тем не менее очевидны различия степени изменения каждой из субпопуляций. Концентрация Т-хелперов снижалась примерно в 2 раза на 1-е сутки, а также с 3-х по 5-е сутки. С 1-х по 3-и сутки темп снижения содержания Т-хелперов был существенно ниже ( $8,7 \pm 0,4$  и  $6,8 \pm 0,3$ ; снижен в 1,3 раза). В то же время содержание Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов уже к 1-м суткам снижалось в 4 раза и на каждые следующие сутки определения примерно в 2 раза. Такого рода перераспределение субпопуляций с преимущественным

Таблица 5. Показатели клеточного звена иммунитета

| Группа  | Срок после релапаротомии, сутки | CD3                 | CD4                            |
|---|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Контроль  |                                 | $20,4 \pm 2,2$      | $16,7 \pm 0,9$                 |
| Гнойный перитонит                               | 1-е                             | $10,3 \pm 0,6^*$    | $18,7 \pm 0,4$                 |
|   | 3-и                             | $8,2 \pm 0,5^*$     | $6,8 \pm 0,3^*$                |
|   | 5-е                             | $4,10 \pm 0,18^*$   | $2,9 \pm 0,2^*$                |
| Гнойный перитонит + антибиотик                  | 1-е                             | $12,5 \pm 1,4^*$    | $10,10 \pm 0,85^*$             |
|   | 3-и                             | $13,9 \pm 1,1^{*#}$ | $8,9 \pm 0,4^{*#}$             |
|   | 5-е                             | $11,0 \pm 0,7^{*#}$ | $6,1 \pm 0,3^{*#}$             |
| Гнойный перитонит + антибиотик + кордовая кровь | 1-е                             | $14,1 \pm 1,2^{*#}$ | $13,15 \pm 1,10^{*#^{\wedge}}$ |
|   | 3-и                             | $16,2 \pm 1,2^{*#}$ | $12,0 \pm 0,9^{*#^{\wedge}}$   |
|   | 5-е                             | $13,2 \pm 1,4^{*#}$ | $9,8 \pm 0,5^{*#^{\wedge}}$    |

Примечания: 1. ИРИ — иммунорегуляторный индекс (отношение  $CD4^+$ - к  $CD8^+$ -клеткам) в соответствующие сроки.

содержанием Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов нашло свое отражение в резком увеличении ИРИ, который более чем в 2 раза превышал контроль на 1-е сутки и еще больше увеличивался на 3-и и 5-е сутки. Данный факт свидетельствует о выраженном дисрегуляторном состоянии при ОГП тех клеток, которые в значительной степени определяют уровень реализации иммуновоспалительной реакции. Именно клетки с супрессорной функцией обеспечивают ее реализацию в рамках «физиологического коридора». На фоне недостаточного их количества (и функции) этот процесс становится «неуправляемым», с теми признаками, которые отмечены нами в приведенных таблицах. К 5-м суткам процент CD8<sup>+</sup>-клеток снижался более чем в 20 раз, что подчеркивает жесткость разбалансировки состояния ИС.

В последнее время акцентируется внимание на клетках, реализующих эффекторную защитную функцию организма, в частности, на естественных киллерах (ЕК — CD16<sup>+</sup>-клетки). Представленные данные показали, что это была, пожалуй, единственная популяция ИКК в КЗИ, которая на ранних этапах развития ОГП существенно активизировалась по сравнению с контролем. Данный факт достаточно интересен и может свидетельствовать о компенсаторном всплеске защитного потенциала клеток-эффекторов при данной патологии. В дальнейшем на фоне существенной интоксикации при ОГП содержание этих клеток снижалось (табл. 5). На 5-е сутки ЕК было в 2,5 раза меньше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ).

*у крыс с развитием ОГП и после лечения*

| CD8                     | CD72                  | CD16                   | ИРИ                      |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| 8,8±1,5                 | 58,3±3,5              | 12,5±0,9               | 1,9±0,3                  |
| 2,20±0,12*              | 62,3±3,8              | 26,1±3,2*              | 4,1±0,2*                 |
| 1,00±0,08*              | 63,7±4,9              | 10,1±2,8               | 6,80±0,42*               |
| 0,40±0,03*              | 50,2±3,6              | 4,90±0,26*             | 7,2±0,6*                 |
| 3,65±0,70* <sup>#</sup> | 65,5±4,7              | 18,0±2,1* <sup>#</sup> | 2,9±0,4 <sup>#</sup>     |
| 3,9±0,2* <sup>#</sup>   | 65,3±3,9              | 13,7±0,9               | 2,3±0,3 <sup>#</sup>     |
| 1,4±0,2* <sup>#</sup>   | 63,8±3,8 <sup>#</sup> | 8,4±0,5* <sup>#</sup>  | 4,1±0,3* <sup>#</sup>    |
| 6,0±0,4* <sup>#^</sup>  | 60,0±4,7              | 14,7±1,6 <sup>#</sup>  | 2,2±0,4 <sup>#</sup>     |
| 10,1±1,2* <sup>#^</sup> | 61,3±3,9              | 10,2±0,7 <sup>#^</sup> | 1,20±0,09* <sup>#^</sup> |
| 6,7±0,4* <sup>#^</sup>  | 52,4±3,6 <sup>^</sup> | 8,8±4,1                | 1,50±0,07* <sup>#^</sup> |

2.  $p < 0,05$ ; различия достоверны при сравнении с показателем: \* контроля; # 2-й группы; ^ 3-й группы

Действительно, воспаление брюшины ведет к общей интоксикации организма и нарушению водного, электролитного, углеводного и витаминного обменов. Нарушаются белковый метаболизм и функция печени — накапливаются промежуточные продукты обмена. В такой ситуации ИС проявляет свою несостоятельность, что может быть следствием интегральной разбалансировки нейроиммунного вектора.

Общепринятым является факт, что при ОГП антибактериальная терапия хотя и имеет свои плюсы, но не считается положительной, поскольку использование любых антибиотиков широкого спектра действия сопровождается одновременно и иммуносупрессией [30]. Хотя данный тезис в некоторой степени является спорным, полученные нами данные все же подтверждают определенные его посыпки. Так, содержание общих Т-лимфоцитов в селезенке животных, леченных антибиотиком, хотя и было ниже контроля, но было стабильным во все сроки наблюдения. Концентрация регуляторных клеток также имела преимущество перед таковыми у нелеченных животных. Об этом свидетельствует и положительная динамика ИРИ. Более того, на 3-и сутки ИРИ достоверно не отличался от контроля ( $p < 0,5$ ). Так же изменялось и содержание ЕК. Следовательно, приведенная информация, действительно, говорит о необходимости оптимизации терапевтических подходов лечения ОГП помимо антибиотиков и средств, относящихся к корректорам состояний ИС.

В общем перечне тех препаратов, которые в настоящее время используются вместе с антибиотиком как улучшающие иммуно-реактивные свойства организма, упоминается достаточно широкий их перечень (иммуноглобулины, антистафилококковые гамма-глобулины, антистафилококковая плазма и т. д.). К сожалению, многие из них обладают монофункциональным потенциалом, корректируя какой-то субстрат ИС. Представленные результаты по оценке КЗИ, как, собственно, и по другим оцененным показателям, демонстрируют преимущество применения криоконсервированной кордовой крови. Именно оценивая корректирующую активность в отношении КЗИ в комплексной терапии с антибиотиком, становится очевидным преимущество криоконсервированной кордовой крови и в отношении общих Т-клеток и субпопуляции регуляторных элементов, т. е. Т-хелперов и Т-супрессоров. Даже при более низких концентрациях обеих субпопуляций в сравнении с контролем ИРИ у крыс 4-й группы в наибольшей степени приближался к контрольным величинам во все сроки определения. Аналогично можно охарактеризовать и изменение концентрации ЕК.

Таким образом, выполненное экспериментальное комплексное исследование продемонстрировало достаточно высокую эффективность криоконсервированной кордовой крови в лечении ОГП.

#### Выводы

1. Применение криоконсервированной кордовой крови путем внутривенного введения во время релапаротомии является эффективным способом патогенетического лечения острого гнойного перитонита в условиях эксперимента.

#### Список литературы

1. Ачох З. З. Комплексное лечение разлитого гнойного перитонита с использованием гипохлорида натрия и ронколейкина : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / З. З. Ачох. — Краснодар, 2005. — 22 с.
2. Ашрафов Р. А. Этиология и патогенез перитонита / Р. А. Ашрафов // Харківська хірургічна школа. — 2002. — № 1. — С. 106–110.
3. Гнойный перитонит. Патофизиология и лечение / [Бойко В. В., Криворучко И. А., Минухин В. В. и др.] ; под ред. А. Я. Цыганенко. — Харьков : Контраст, 2002. — 280 с.
4. Мельник В. М. Обґрунтування і результати патогенетичного лікування експериментального гострого гнійного поширеного перитоніту / В. М. Мельник, О. І. Пойда // Укр. журнал екстремальної медицини ім. Г. О. Можаяєва. — 2005. — Т. 6, № 4. — С. 56–60.
5. Безрук И. А. Внутрибольничная инфекция хирургического стационара, иммунологические предпосылки и иммунопрофилактика: вопросы диагностики, клиники, лечения и профилактики) : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / И. А. Безрук. — Алма-Ата, 1991. — 23 с.

2. Комплексная оценка гуморального и клеточного звеньев иммунитета, клеток моноцитарно-фагоцитарной системы, а также выживаемости животных продемонстрировала существенное преимущество применения криоконсервированной кордовой крови с антибиотиком над применением только антибиотика.

3. Криоконсервированная кордовая кровь осуществляет корректирующее влияние на основные патогенетически значимые звенья иммунорезистентности организма, корректируя антителогенез и нормализуя содержание иммуноглобулинов класса М, G и А, при этом повышая функциональный потенциал клеток моноцитарно-фагоцитарной системы. Такого рода изменения обуславливали существенное снижение и нормализацию содержания циркулирующих иммунных комплексов в крови, оказывая положительный эффект в целом на гуморальное звено иммунитета. В коррекции клеточного звена иммунитета наиболее значимым было восстановление функции регуляторных субпопуляций CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток, что сопровождалось нормализацией иммунорегуляторного индекса вплоть до 5-х суток наблюдения.

4. Коррекция состояния указанных звеньев иммунной системы под влиянием криоконсервированной кордовой крови в итоге манифестировалась признаками снижения степени выраженности воспалительного процесса в организме животных с острым гнойным перитонитом, а также повышением процента выживаемости животных в сравнении с показателями при использовании других видов терапии.

5. Полученные результаты экспериментальных исследований дают основание для клинического применения криоконсервированной кордовой крови при лечении острого гнойного перитонита.

6. *Евстифеева О. В.* Глюкокортикоидная регуляция иммунитета и ее роль в лечении перитонита : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / О. В. Евстифеева. — М., 1996. — 25 с.
7. Проблема абдоминального сепсиса в хирургии. Иммуные нарушения и их диагностика / С. А. Алексеев, Ю. М. Гаин, В. Г. Богдан, Ю. А. Соколов // БМЖ. — 2003. — № 2. — С. 1–11.
8. *Грищенко В. И.* Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / В. И. Грищенко, А. Н. Гольцев // Проблемы криобиологии. — 2002. — № 1. — С. 54–84.
9. *Шелестюк П. И.* Нарушения органного гомеостаза и их коррекция при экспериментальном перитоните / П. И. Шелестюк, А. М. Батраков, М. Т. Кулаев // Патологическая физиология и эксперим. хирургия. — 1994. — Вып. 3. — С. 43–46.
10. Применение препарата бакстимс при лечении экспериментального разлитого гнойного перитонита / Б. А. Саидханов, К. О. Махмудов, А. Р. Гутникова [и др.] // Клінічна хірургія. — 2001. — № 6. — С. 49–51.
11. *Иванова Ю. В.* Динамика некоторых показателей гомеостаза организма после СВЧ-облучения брюшной полости при экспериментальном гнойном перитоните / Ю. В. Иванова // Харківська хірургічна школа. — 2005. — № 3, вип. 18. — С. 57–60.
12. *Ярешко Н. А.* Антибиотикотерапия разлитого гнойного перитонита: методологические аспекты преподавания на кафедре общей хирургии / Н. А. Ярешко // С'їзд хірургів України : тези доповідей. — Тернопіль, 2002. — С. 337–339.
13. *Иванова Ю. В.* СВЧ-облучение брюшной полости в комплексе лечения гнойного перитонита в эксперименте / Ю. В. Иванова // Врачебная практика. — 2005. — № 6. — С. 25–27.
14. Хирургическая модель острого гнойного перитонита / Ф. Ф. Усиков, Е. В. Пастернак, Л. Д. Романова [и др.] // Хирургия. — 1984. — № 8. — С. 27–29.
15. Безотмывочный метод криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека для клинического применения : методические рекомендации / А. А. Цуцаева, В. И. Грищенко, О. С. Прокопюк [и др.]. — Харьков, 2000. — 22 с.
16. *Лінник А. О.* Апаратна лімфодилуція та стимуляція гуморального дренажу тканин у комплексному лікуванні запальних процесів черевної порожнини / А. О. Лінник // С'їзд хірургів України : тези доповідей. — Тернопіль, 2002. — С. 337.
17. *Lai K. N.* Peritoneal adipocytes and their role in inflammation during peritoneal dialysis / K. N. Lai, J. C. Leung // Mediators Inflamm. — 2010. — May 5. — Article 495416.
18. *Gotloib L.* The use of peritoneal mesothelium as a potential source of adult stem cells / L. Gotloib, L. C. Gotloib, V. Khrizman // J. Artif. Organs. — 2007. — V. 30, № 6. — P. 501–512.
19. Применение кордовой крови у больных с желудочными кровотечениями язвенного генеза / В. В. Бойко, В. И. Грищенко, А. А. Цуцаева, И. А. Криворучко // Вісник проблем біології і медицини. — 1999. — Вып. 3. — С. 14–18.
20. Заготовка, криоконсервирование и клиническое применение гемопоэтических клеток кордовой крови человека : методические рекомендации / [Цуцаева А. А., Грищенко В. И., Прокопюк О. С. и др.]. — Харьков, 2000. — 18 с.
21. Пат. № 31847А Украина, МПК А01№1/02. Способ криоконсервирования кроветворных клеток кордовой крови / Цуцаева А. А., Грищенко В. И., Прокопюк О. С. и др. — Заявл. 05.11.98, опубл. 15.12.2000, Бюл. № 7.
22. *Гольцев А. Н.* Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть I. Характеристики гемопоэтического потенциала / А. Н. Гольцев, Т. А. Калинин // Проблемы криобиологии. — 1998. — № 1. — С. 3–24.
23. Иммунологические методы / [под ред. Г. Фримеля]. — М. : Медицина, 1987. — С. 244–248, 254–268.
24. Скрининг-тест для оценки патогенных свойств иммунных комплексов / П. В. Стручков, Н. А. Константина, В. В. Лаврентьев [и др.] // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 410–413.
25. *Назаренко Г. И.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. — М. : Медицина, 2000. — 544 с.
26. Иммунология : практикум / [Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е.]. — К. : Вища школа, 1989. — 304 с.
27. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза / М. Т. Александров, А. И. Кудрявицкий, Е. Г. Румянцева [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 9. — С. 30–33.
28. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / [под ред. В. В. Миньшикова]. — М. : Медицина, 1987. — 365 с.
29. *Платонова А. Е.* Статистический анализ в биологии и медицине: задачи, терминология, компьютерные методы / А. Е. Платонова. — М. : Изд-во РАМН, 2000. — 52 с.
30. Клиническая иммунология и аллергология : в 3 т. / [под ред. Л. Йегера]; пер. с нем. — М. : Медицина, 1990. — Т. 1. — 1990. — 526 с.

***В.І. Грищенко, І.А. Криворучко, К.А. Гольцев, О.Ю. Кожина, А.М. Гольцев***  
**КОРЕКЦІЯ ІМУННИХ ПОРУШЕНЬ ШЛЯХОМ ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ ПРИ РОЗВИТКУ ГОСТРОГО ГНІЙНОГО ПЕРИТОНІТУ**

В експерименті на щурах показано, що комплексне застосування кріоконсервованої кордової крові разом з антибіотиком під час релапаротомії при гострому гнійному перитоніті більшою мірою, ніж застосування тільки антибіотика, коригує стан клітинної та гуморальної ланок імунітету і моноцитарно-фагоцитарної системи, а також знижує запалення і підвищує виживаність тварин.

**Ключові слова:** кріоконсервована кордова кров, імунітет, гнійний перитоніт, релапаротомія.

***V.I. Grischenko, I.A. Krivoruchko, K.A. Goltsev, O.Yu. Kozhina, A.N. Goltsev***  
**CORRECTION OF IMMUNE IMPAIRMENTS BY CRYOPRESERVED CORD BLOOD USE DURING DEVELOPMENT OF ACUTE PYOPERITONITIS**

In the experiments in rats there has been shown, that complex application of cryopreserved cord blood with antibiotic during relaparotomy at acute pyoperitonitis in greater extent than just application with antibiotic corrects the state of cell and humoral link of immunity and monocyte-phagocital sistem, as well as reduces the inflammation and increases the survival of animals.

**Key words:** cryopreserved cord blood, immunity, acute pyoperitonitis, relaparotomy.

*Поступила 22.03.11*