

МІКРОБІОЛОГІЯ

© Мішина М. М.

УДК 579. 862. 1:615. 37:615. 33:612. 017:616-002. 3-092. 9

Мішина М. М.

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ Й ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ІМУНО-ЦИТОКІНОВИЙ БАЛАНС ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГНІЙНО-СЕПТИЧНОМУ ПРОЦЕСІ, СПРИЧИНЕНОМУ *S. AUREUS*

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

Робота виконана у межах НДР Харківського національного медичного університету з держбюджетним фінансуванням: «Вплив фізико-біологічних факторів на комунікативні властивості мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних процесів», № державної реєстрації 0112U001822.

Вступ. Гнійно-запальні ускладнення продовжують залишатися однією з найбільш актуальних загальноклінічних та хірургічних проблем, що визначається збільшенням кількості хворих, високою летальністю і значними економічними втратами. Серед етіологічних чинників септичних процесів фахівцями встановлено провідну роль *S. aureus*. Стафілококовий сепсис в даний час представляє серйозну загрозу як через частоту виникнення, так і через надзвичайно важкого перебігу, що зумовлено факторами патогенності стафілококу [1, 2].

Наведені дані свідчать про безперечну роль порушення імунного статусу хворих у патогенезі стафілококової інфекції, яка посилюється токсичним впливом клітинних і позаклітинних продуктів, утворених самим збудником [3]. Тому необхідно з патогенетичної позиції підходити до профілактики та лікування гнійно-запальних процесів, спричинених *S. aureus*, і практично з цієї метою завжди обґрунтовано призначати препарати, дія яких спрямована на імункорекцію захисної відповіді організму [6]. У зв'язку з цим проблема профілактики і лікування гнійно-запальних процесів, спричинених *S. aureus*, є актуальною.

Метою даного дослідження є визначення імунно-цитокінового стану при експериментальному гнійно-септичному процесі, спричиненому *S. aureus* та при застосуванні імунотулятора поліоксидонію, цитокінокоректору ронколейкіну й протимікробних препаратів гатіфлоксацину та цефепіму.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 80 мишах інбредної лінії C57Bl/6JSto [5] відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей» [7]. Імунні клітини диференціювалися за допомогою моноклональних антитіл фірми Serotec до різних типів клітин.

Статистична обробка даних проведена за допомогою комп'ютерних програм [4].

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті проведеного дослідження встановлено, що зміни клітинних чинників імунітету у інфікованих *S. aureus* тварин відповідають процесам, характерним для гнійно-запальних процесів стафілококової етіології в цілому: виражений дефіцит абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, клітин з фенотипами CD3⁺, CD4⁺ та підвищення кількості лімфоцитів з супресорною (CD8⁺) й кілерною (CD16⁺) активністю та як наслідок – знижене значення показника індексу імунорегуляції (CD4⁺/CD8⁺), який є важливим показником гармонійної функції імунної системи (табл. 1). Аналіз особливостей цитокінової регуляції при септичному процесі, обумовленому *S. aureus* дозволило об'єднати зміни клітинної, фагоцитарної й гуморальної ланок імунної системи в єдиний взаємопов'язаний механізм.

При порівняльному аналізі імунологічних параметрів клітинних, гуморальних факторів імунітету, фагоцитарної ланки імунної системи і цитокінового профілю при гнійно-запальних процесах, обумовлених *S. aureus*, вивченні їх участі та значення внеску кожного в розвитку патологічного процесу були виявлені певні особливості імунопатогенезу в експерименті, а саме: при вивченні гуморальної імунної відповіді виявлені статистично значущі зміни, які характеризувалися

Таблиця 1

Динаміка показників Т-клітинного імунітету при гнійно-запальному процесі, спричиненому *S. aureus*

№	Показник	інтактні	інфіковані
1	Лімфоцити, %	31,5±1,9	16,2±1,0*
2	CD3 ⁺ , %	67,5±2,9	28,8±1,0*
3	CD4 ⁺ , %	39,1±1,89	20,4±1,11*
4	CD8 ⁺ , %	28,8±1,75	45,2±2,9*
5	CD16 ⁺ , %	12,9±1,1	39,2±2,1*
6	CD25 ⁺ , %	13,4±1,3	4,5±0,27*
7	CD95 ⁺ , %	5,7±1,6	28,9±1,9*
8	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,36±0,17	0,45±0,04*

Примітка: * p < 0,05 порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 2

Характер і динаміка змін показників В-клітинного імунітету

№	Показник	інтактні	інфіковані
1	В-лімфоцити, %	26,7 ± 1,9	5,61 ± 0,34*
2	CD19 ⁺ , %	8,61 ± 0,45	1,81 ± 0,09*
3	CD22 ⁺ , %	18,8 ± 0,7	8,26 ± 0,12*
4	IgA, г/л	3,8 ± 0,56	2,82 ± 0,11*
5	IgM, г/л	1,9 ± 0,12	2,16 ± 0,09
6	IgG, г/л	13,6 ± 1,1	3,3 ± 0,17*

Примітка: * p < 0,05 порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 3

Фагоцитарна активність поліморфноядерних лейкоцитів

№	Показник	інтактні	інфіковані
1	ФАЛ	73,1 ± 3,1	41,3 ± 2,9*
2	ПЗФ	72,2 ± 3,0	28,7 ± 1,3*
3	ФЧ	4,9 ± 0,12	1,89 ± 0,13*
4	ФІ	60,7 ± 2,8	31,3 ± 1,9*

Примітка: * p < 0,05 порівняно з інтактними тваринами.

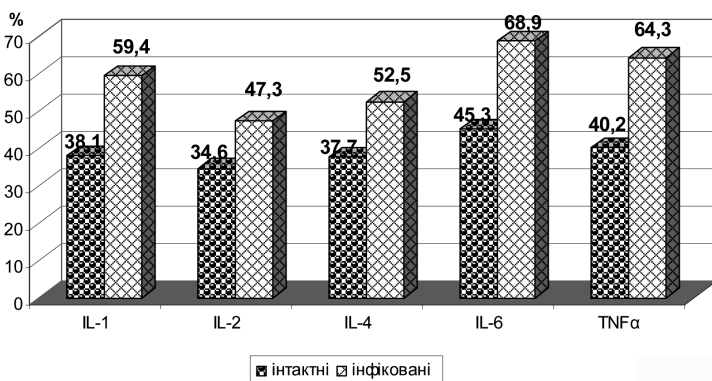


Рис. 1. Показники цитокінового балансу до застосування

пригніченням абсолютної кількості В-лімфоцитів з фенотипами CD19⁺ й CD22⁺ (табл. 2).

Взаємозв'язок зазначених явищ підкреслює встановлена максимально знижена фагоцитарна активність лейкоцитів (табл. 3). Відповідно, не викликає сумніву, що пригнічення фагоцитарної ланки і дисбаланс рівня імуноглобулінів у сироватці впливають на характер виявлених порушень системи комплементу, але вирішальне значення надає пригнічення процесів антитіло утворення. Цитотоксична дія *S. aureus* на лімфоцити призводить до лімфопенії і може свідчити про пригнічення та функціональну неповноцінність клітинної імунної відповіді в цілому.

Крім того, були вивчені процеси апоптозу шляхом визначення специфічного поверхневого рецептора CD95⁺. У інфікованій групі тварин виражений дисбаланс клітинної ланки імунної системи, при якій рівень Т-лімфоцитів, що містить на поверхні своєї мембрани рецептори CD95⁺, значно перевищує

значення інтактних, що свідчить про активацію запрограмованої загибелі лімфоцитів. Відповідно, посилення апоптозу призводить до подальших глибоких змін і прогресування вже наявного дефіциту Т-лімфоцитів, а також дисбалансу всіх ланок імунної системи у інфікованих тварин. У той же час в інфікованих тварин виявлено зниження експресії маркера CD25⁺ на поверхні Т-клітин, що є α-ланцюгом рецептора для IL-2. Таким чином, процеси активації апоптозу при вираженому Т-клітинному дефіциті є важливим патогенетичним аспектом при гнійно-запальному процесі, обумовленому *S. aureus*.

Про високу активність запальної реакції свідчить підвищення продукції IL-1β і TNFα. Відмічено підвищення значень IL-4 у сироватці крові, що є непрямою ознакою активної участі гуморальної імунної відповіді у патогенезі септичного процесу, обумовленого *S. aureus*.

Дисбаланс цитокінового статусу підтримує гостре імунозалежне запалення, а також пов'язані з ним порушення процесів апоптозу та обумовлює розвиток інтерлейкін-залежного вторинного імунodefіцитного стану (рис. 1).

Патологічні стани, що обумовлені або супроводжуються вторинною імунною недостатністю, вимагають адекватної імунокорекції. При незбалансованій компенсаторній протизапальній відповіді показано застосування препаратів із прозапальною активністю цитокінів (IL-2: ронколейкін), що поряд з посиленням неспецифічних механізмів протиінфекційного захисту ефективно стимулюють розвиток специфічної імунної відповіді й активують репаративні процеси в ушкоджених тканинах.

Графік середніх й дов. інтервалів (95,00%)

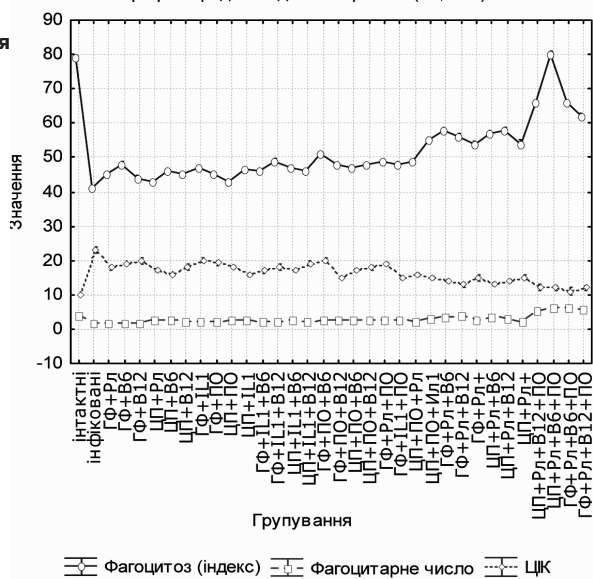


Рис. 2. Стан фагоцитарної ланки при комбінованій терапії.

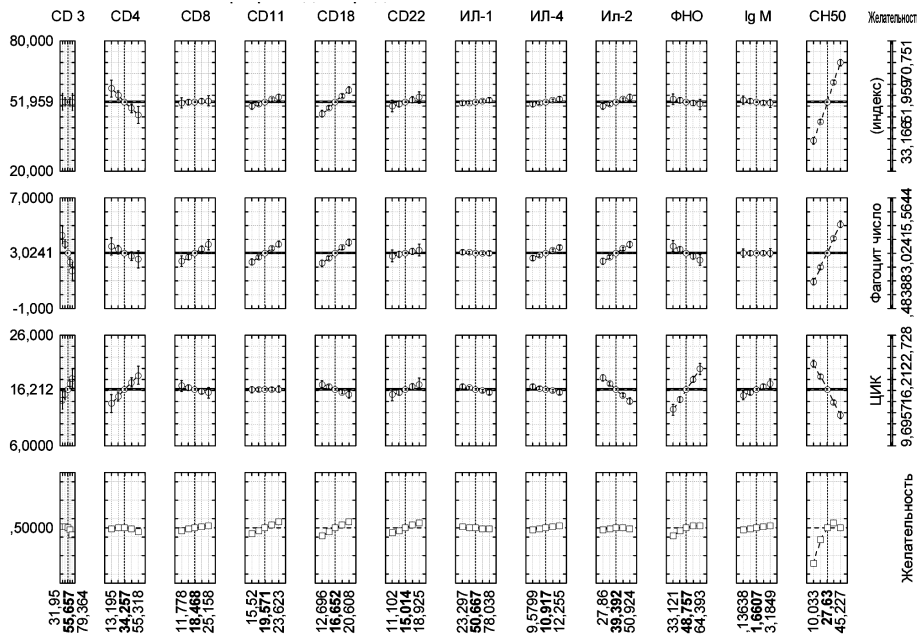


Рис. 3. Імунний та цитокіновий стан при застосуванні комбінованої терапії септичного процесу, обумовленого *S. aureus*.

З метою неспецифічної терапії для нормалізації клітинного метаболізму, ослаблення токсичних проявів клінічних ізолятів, підвищення ефективності антибактеріальних препаратів, а також в якості антиоксидантів до протимікробної й імунорегуючої терапії було підключено вітаміни В₆. Вибір антибактеріальних препаратів (цефепім й гатіфлоксацин) був обумовлений їх фармакокінетикою й антибіотикочутливістю збудників гнійно-запальних процесів до даних препаратів. Перевагою цих препаратів є активність у відношенні *S. aureus* і висока ефективність проти більшості збудників інфекційних захворювань. При лікуванні інфікованих тварин комбінацією препаратів показники цитокінового статусу нормалізуються. Це свідчить про те, що препарати призводять до вираженого терапевтичного ефекту і

нормалізуються (рис. 3). Це свідчить про те, що препарати призводять до вираженого терапевтичного ефекту і цілком відновлюють імунні процеси в організмі.

Висновок. Таким чином, в результаті проведених досліджень доведено, що дана терапія надає позитивний ефект на імунну систему, що підтверджується зниженням рівня ЦИК та відновленням фагоцитарної активності й міграційної здатності нейтрофілів.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку є визначення метаболічного стану, а саме: антиоксидантної системи й перекисного окислення ліпідів при гнійно-септичному процесі, спричиненому *S. aureus* з корекцією та розробкою схем комплексної терапії.

Література

1. Бондаренко А. Л. Актуальные вопросы этиопатогенеза и лечения сепсиса / Бондаренко А. Л.: зб. тр. науч. -практ. конф. «Сепсис. Проблеми діагностики, терапії та профілактики». – Харків, 2006. – С. 49 – 50.
2. Козлов В. К Сепсис: иммунные дисфункции в патогенезе сепсиса. Возможности диагностики / В. К. Козлов // Український журнал екстремальної медицини імені Г. О. Можаяєва. – 2005. – Т. 6, № 1. – С. 19 – 25.
3. Кузнецов А. А. Дискуссионные аспекты проблемы сепсиса // Тр. науч. -практ. конф. «Сепсис. Проблеми діагностики, терапії та профілактики». – Харків, 2006. – С. 19-22.
4. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях / В. П. Осипов, Е. М. Лукьянова, Ю. Г. Антипкин [и др.]. – К.: Планета людей, 2002. – 200 с.
5. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии: Практическое руководство / Г. Н. Першин. – М.: Медицина, 1971. – 539 с.
6. Черных Е. Р. Цитокин-зависимые механизмы Т-клеточных дисфункций при хирургическом сепсисе / Е. Р. Черных, Е. В. Курганова, В. В. Сенюков [и др.] // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 45 – 49.
7. European Study on Community-Acquired Pneumonia Committee. Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections // European Respiratory Journal. – 2006. – № 11. – P. 986 – 991.

УДК 579. 862. 1:615. 37:615. 33:612. 017:616-002. 3-092. 9

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ Й ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ІМУНО-ЦИТОКІНОВИЙ БАЛАНС ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГНІЙНО-СЕПТИЧНОМУ ПРОЦЕСІ, СПРИЧИНЕНОМУ *S. AUREUS*

Мішина М. М.

Резюме. Результати дослідження імунно-цитокінового статусу при гнійно-септичному процесі, спричиненому *S. aureus*, дозволили встановити виражений дефіцит абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів,

клітин з фенотипами CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, активацію цитокинового каскаду, що свідчить про високу активність запальної реакції. Застосована комплексна терапія цілком відновлює імунні процеси в організмі.

Ключові слова: гнійно-септичний процес, *S. aureus*, імунні клітини.

УДК 579.862.1:615.37:615.33:612.017:616-002.3-092.9

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ И ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИММУНО-ЦИТОКИНОВЫЙ БАЛАНС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ, ВЫЗВАННОМ *S. AUREUS*

Мишина М. М.

Резюме. Результаты исследования иммуно-цитокинового статуса при гнойно-септическом процессе, вызванном *S. aureus*, позволили установить выраженный дефицит абсолютного количества лейкоцитов, лимфоцитов, клеток с фенотипами CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, активацию цитокинового каскада свидетельствует о высокой активности воспалительной реакции. Примененная комплексная терапия полностью восстанавливает иммунные процессы в организме.

Ключевые слова: гнойно-септический процесс, *S. aureus*, иммунные клетки.

UDC 579.862.1:615.37:615.33:612.017:616-002.3-092.9

Influence of Immunomodulators and Antimicrobial Agents on Immune Cytokine Balance in Experimental Purulent-Septic Process Caused by *S. aureus*

Mishina M. M.

Abstract. Introduction. Pyoinflammatory complications are still considered to be one of the most topical general clinical and surgical issues which is characterized by increase of patients in the number, high mortality rate and significant economic expenses. Sepsis constitutes currently a serious threat due to frequency as well as extremely severe course caused by pathogenicity factors of *S. aureus*.

*The goal of the research is determination of immune cytokine state in experimental purulent-septic process caused by *S. aureus* in case of use of Polyoxidonium, Roncoleukin and Gatifloxacin.*

The object and methods of the research. Experimental research which has been carried out on 30 mice of inbred lines C57Bl/6JSto in accordance with the principles of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. The immune cells were differentiated by means of monoclonal antibodies to different types of the cells of Serotec Company.

The results of the research and its consideration. In consequence of the research apparent deficit of absolute number of leukocytes, lymphocytes, cells with CD3⁺, CD4⁺ phenotypes and increase of lymphocytes with suppressive (CD8⁺), killer (CD16⁺) activity; as well as reduced indicator value of immunoregulation index with simultaneous increase of CD95⁺ cells indicating activation of programmed death of lymphocytes have been established. Subsequently, enhancement of apoptosis results in further deep changes and progression of T-lymphocytes deficit and imbalance of all parts of the immune system in the infected animals. At the same time decrease of expression of CD25⁺ marker on the surface of T-cells, which is α -chain of the receptor for IL-2, was detected in the infected animals. Therefore processes of activation of apoptosis in apparent T-cell deficit is an important pathogenic aspect in purulent-septic process caused by *S. aureus*. High activity of inflammatory response is proved by increase of production of IL-1 β and TNF α . Increase of IL-4 level in the blood serum, which is considered to be an indirect sign of active involvement of humoral immune response into pathogenesis of septic process caused by *S. aureus*, has been observed. Imbalance of cytokine status tends to maintain acute immune-dependent inflammation and concomitant disorders of processes of apoptosis and to lead to development of interleukin-dependent secondary immunodeficient state.

Pathological states, which result from or are accompanied by secondary immune insufficiency, need adequate immunocorrection. In treatment of the infected animals by means of combination of medications the indices of cytokine status are normalized. It shows that the medications lead to evident therapeutic effect and completely restore immune processes in the body. As the key chain of immune defense is the phagocytic one, which is responsible for providing of reactions at early stages of purulent-septic processes, correction of this immunity chain is required. Through analysis of the indices of non-specific resistance, the tendency to increase of phagocytic, absorptive and migration function of neutrophils in the patients who undergo combined antimicrobial treatment by means of Polyoxidonium, Roncoleukin and Gatifloxacin and vitamins B₆ has been established.

Consequently the results of the research show that this therapy provides positive effect for the immune system which is proved by decrease of IgM and IgG concentration as well as CIC level, phagocytic activity and migration ability of neutrophils.

Future research perspective in this direction is determination of metabolic state viz. antioxidant system and peroxidation of lipids in purulent-septic process caused by *S. aureus* with correction and elaboration of schemes of combination therapy.

Keywords: purulent – septic process, *S. aureus*, immune cages.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Статья надійшла 12. 06. 2014 р.