

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОМОРФОЛОГІЧНОГО СТАНУ ПРИ ГНІЙНО-СЕПТИЧНОМУ ПРОЦЕСІ, СПРИЧИНЕНОМУ *S. AUREUS* ТА ПІД ВПЛИВОМ КОМПЛЕКСНОЇ ТЕРАПІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням: «Вплив фізико-біологічних факторів на комунікативні властивості мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних процесів», № державної реєстрації 0112U001822.

Вступ. Гнійно-запальні процеси займають провідне місце серед ускладнень й відносяться до числа найбільш актуальних проблем медичної практики та характеризуються тяжкими наслідками зі змінами в імунному статусі хворих [2]. У теперішній час приділяється велика увага патогенезу порушень імунної відповіді та її корекції при гнійно-запальних процесах [4]. У доступній літературі є тільки окремі повідомлення про імунорфологічні особливості організму при септичних станах і методах корекції, відсутні характеристики імунної відповіді в іммунокомпетентних органах при застосуванні різних схем імункорекції, стану імунного статусу в органах [8, 9]. Тому вивчення імунорфологічних особливостей при гнійно-запальних процесах і обґрунтування підходів до імункорекції є актуальним і сприяє підвищенню ефективності комплексної терапії.

Тому **метою** даного **дослідження** було вивчення особливостей клітинного імунітету в тканинах до та після комбінованої терапії, що включає імунomodulatory поліоксидоній (ПО), цитокінокоректор ронколейкін (РЛ), протимікробний препарат гатіфлоксацин (ГФ).

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 80 мишах інбредної лінії C57Bl/6JSto 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» [10]. У роботі було використано мінімально допустиму для статистичної обробки і отримання достовірних результатів загальноприйнятую кількість тварин у групі, а також мінімально достатня для досягнення мети й рішення задач дослідження кількість експериментальних груп [5]: 1 група – інтактні миші (негативний контроль); 2 група – інфіковані миші без лікування (позитивний контроль); 3 група – інфіковані

тварини з проведенням терапії гатіфлоксацином й поліоксидонієм; 4 група – інфіковані миші з проведенням терапії гатіфлоксацином з ронколейкіном; 5 – інфіковані миші з проведенням терапії гатіфлоксацином, поліоксидонієм та ронколейкіном. Розрахунок доз препаратів проведено за формулою Риболовлева [6].

Імунорфологічне дослідження було проведено на парафінових зрізах непрямим методом Кунса за методикою Brosnan. Імунні клітини диференціювалися за допомогою моноклональних антитіл фірми Serotec до різних типів клітин. Відносні об'єми загальних клонів імунних клітин було визначено за допомогою сітки Г. Г. Автанділова в люмінісцентному мікроскопі. Кількість клітин-продуцентів цитокінів підраховано у полі зору $\times 400$ [1, 3]. Для статистичної обробки результатів використано програму «Statistica» для персонального комп'ютера [7].

Результати досліджень та їх обговорення. При імунорфологічному дослідженні було виявлено, що у внутрішніх органах інфікованих лабораторних тварин виявляються клітини – продуценти цитокінів, причому їх вміст збільшений порівняно з групою інтактних тварин. Ступінь виразності макрофагальної реакції, реакції плазматизації, а також відносного обсягу клітин-продуцентів цитокінів вірогідно вище таких у контрольній групі інтактних тварин. Кількість плазмобластів і клітин-продуцентів інтерлейкінів IL-1 β , IL-6, TNF- α підвищена.

При лікуванні тварин протимікробним препаратом гатіфлоксацином й імунomodulatory поліоксидонієм з цитокінокоректором ронколейкіном в мікроскопічній картині серця виявляються значні зміни порівняно з терапією тільки протимікробним препаратом й імунomodulatory або протимікробним препаратом та цитокінокоректором. Відносний обсяг запальної інфільтрації достовірно знижений порівняно з групою інфікованих тварин. В її складі виявляються всі клони імунних клітин. Серед елементів запальної інфільтрації зменшується достовірно відносний обсяг макрофагів (**табл. 1**), плазмобластів і клітин-продуцентів прозапальних цитокінів.

Таблиця 1

Відносні обсяги основних клонів імунних клітин в запальному інфільтраті стромі міокарду експериментальних тварин (у перерахунку на 100 клітин в полі зору x 400)

Відносні обсяги (%)	Дослідні групи тварин				
	1 група	2 група	3 група	4 група	5 група
CD3, CD4, CD8, CD45RA	35,0±1,6	55,0±1,0	49,5±1,7	47,0±1,7	33,0±1,3*
ED1-макрофаги	6,5±1,6	12,0±1,9*	10,5±1,7	8,0±1,0*	6,0±1,1*
Плазмобласти з IgM й IgG	6,0±0,8	13,0±1,3*	12,5±1,5	10,0±1,0*	8,0±0,4*
Клітини-продуценти IL-1β, IL-6, TNF	8,0±0,9	36,0±1,5	30,0±1,5	29,0±1,6*	11,0±0,3*

Примітка: $p < 0,05$ порівняно з інфікованою групою. Пояснення: поверхневі рецептори до ED1 та IL-1β, IL-6, TNF мають сполучнотканинні клітини, ендотеліоцити, моноцити крові. У зв'язку з чим, незважаючи на відсутність запальних інфільтратів в стромі цих органів при комбінованому лікуванні відзначалася експресія вищевказаних рецепторів.

Таблиця 2

Відносний об'єм лімфо-плазмоцитарно-макрофагальної інфільтрації в стромі органів експериментальних тварин (%)

Відносний об'єм лімфо-плазмоцитарно-макрофагальної інфільтрації	Дослідні групи тварин				
	1 група	2 група	3 група	4 група	5 група
міокард	3,0±1,6	4,8±0,5	3,6±0,4	3,2±0,4	2,0±0,3*
печінка	2,5±1,5	5,2±0,9	4,1±0,6	3,4±0,7	2,4±0,4*
нирки	3,4±0,8	4,9±0,6	3,8±0,5	3,3±0,6	2,2±0,5*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з інфікованою групою.

Таблиця 3

Відносні обсяги основних клонів імунних клітин в запальному інфільтраті стромі нирок експериментальних тварин (у перерахунку на 100 клітин в полі зору x 400)

Відносні обсяги (%)	Дослідні групи тварин				
	1 група	2 група	3 група	4 група	5 група
CD3, CD4, CD8, CD45RA	38,0±1,4	54,0±8,0	47,0±9,5	43,0±6,5	37,0±1,9*
ED1-макрофаги	6,5±1,6	12,0±2,9	10,0±2,1	9,5±1,3	8,5±0,7*
Плазмобласти з IgM й IgG	7,4±0,8	13,0±2,9	11,0±2,9	10,0±3,0	8,0±0,9*
Клітини-продуценти IL-1β, IL-6, TNF	8,0±0,9	34,0±7,0	20,0±5,5	18,0±5,9	10,0±0,7*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з інфікованою групою.

В стромі органів експериментальних тварин, що отримували комплексну терапію визначено, що відносний обсяг основних клонів імунних клітин у запальному інфільтраті достовірно зменшений (табл. 2). У її складі переважали лімфоцити (CD3, CD4,

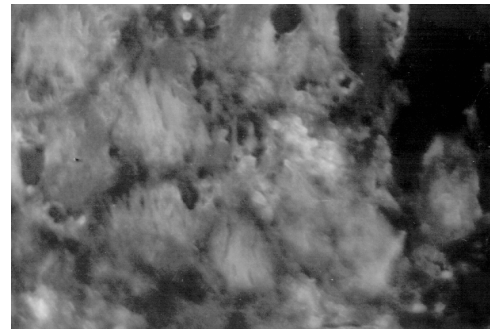


Рис. Осередкове скупчення CD3 лімфоцитів в інтерстиції міокарду тварин дослідної групи. Непрямий метод Кунса з МКА до CD3. x200.

CD8, CD45RA: рис.), відзначалися плазмочити з імуноглобулінами M, G, макрофаги (ED1), а також клітини-продуценти IL-1, IL-6, TNF.

При цьому, порівняно з групою тварин, яким застосовано терапію гатіфлоксацином з поліоксидонієм, відносний обсяг макрофагів, плазмобластів і клітин-продуцентів IL-1, IL-6, TNF достовірно зменшений. Ендотеліоцити виявляють помірної інтенсивності світіння після обробки препаратів МКА до ендотеліну. Інтенсивність цього світіння достовірно нижче такої в групі інфікованих тварин.

У нирках, як у міокарді та печінці, значно зменшується виразність запального інтерстиціального процесу, який на відміну від попередніх груп носить обмежений дрібновогнищевий характер або відсутній. У зв'язку з чим, достовірно зменшився відносний обсяг запального інфільтрату (табл. 3). Характер клітинної інфільтрації відповідає описаній в печінці та міокарді.

Ступінь імунофлуоресценції ендотеліоцитів експресуючих рецептори до ендотеліну достовірно знижена порівняно з інфікованою групою тварин.

Висновок. Таким чином, при використанні комплексного застосування антибактеріальних препаратів з імуномодулятором поліоксидонієм та цитокінокоректором ронколейкіном імуноморфологічна картина характеризується значним зниженням ступеня виразності запально-проліферативних процесів в стромі, судинах й призводить до відновлення характеру місцевих імунних реакцій з адекватним співвідношенням основних її ланок.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку є визначення особливостей імуноморфологічного стану при локалізованому гнійно-некротичному процесі та розробкою схем комплексної терапії.

Література

16. Автандилов Г. Г. Основы патологоанатомической практики [Текст] / Г. Г. Автандилов. – Изд. 2-е. – М. : [РМАПО], 1998. – 543с., [1] с. : ил. – ISBN 5 – 7249 – 0286.
17. Козлов В. К. Иммунопатогенез сепсиса. Алгоритмы диагностики по параметрам иммунной дисфункции / В. К. Козлов // ОНСПВ. – 2008. – № 4. [Электронный ресурс: <http://urgent.com.ua/article/219.html>].
18. Лилли Р. Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия [пер. с англ.] / Р. Д. Лили – М. : Мир, 1969. – 624 с.
19. Останин А. А. Цитокиноterapia Ронколейкином® в комплексном лечении и профилактике хирургических инфекций: пособие для врачей / А. А. Останин, Е. Р. Черных. – Санкт-Петербург : Альтер Эго, 2009. – 56 с.
20. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии / Г. Н. Першин. – М. : Медицина, 1971. – 539 с.
21. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Тр. науч. практ. конф. «Доклады АН СССР». – Москва, 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513 – 1516.
22. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
23. Юсан Н. В. Иммунологические критерии прогнозирования исхода заболевания при абдоминальном сепсисе : автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14. 03. 09 «Клиническая иммунология, аллергология» / Н. В. Юсан. – Владивосток, 2011. – 24 с.
24. Яковлев С. В. Современный взгляд на антибактериальную терапию интраабдоминальных инфекций / С. В. Яковлев // Consilium Medicum. – 2002. – Т. 4, № 6. URL: <http://www.consilium-medicum.com/medicum/article/12222>.
25. 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. 33:616-002. 3-092. 9:612. 01. 1

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОМОРФОЛОГІЧНОГО СТАНУ ПРИ ГНІЙНО-СЕПТИЧНОМУ ПРОЦЕСІ, СПРИЧИНЕНОМУ *S. AUREUS* ТА ПІД ВПЛИВОМ КОМПЛЕКСНОЇ ТЕРАПІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Мишина М. М.

Резюме. Експериментально досліджено імуноморфологічний стан тканин при гнійно-запальному процесі, спричиненому *S. aureus* та під впливом комплексної терапії. Встановлено, що під впливом комплексної терапії із застосуванням протимікробного препарату гатифлоксацину, імуномодулятору поліоксидонію та цитокинокоректору ронколейкіну в органах імунної системи спостерігається зниження відносного обсягу лімфоплазмоцитарно-макрофагальної інфільтрації й зниження ступеня виразності запально-проліферативних процесів.

Ключові слова: гнійно-запальний процес, *S. aureus*, імуноморфологічний статус.

УДК 579. 862. 1:615. 37:615. 33:616-002. 3-092. 9:612. 01. 1

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ПРИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ, ВЫЗВАННОМ *S. AUREUS* И ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Мишина М. М.

Резюме. Экспериментально исследовано иммуноморфологическое состояние тканей при гнойно-воспалительном процессе, вызванном *S. aureus* и под влиянием комплексной терапии. Установлено, что под влиянием комплексной терапии с применением противомикробного препарата гатифлоксацина, иммуномодулятора полиоксидония и цитокинокорректора ронколейкина в органах иммунной системы наблюдается снижение относительного объема лимфоплазмоцитарно-макрофагальной инфильтрации и снижение степени выраженности воспалительно-пролиферативных процессов.

Ключевые слова: гнойно-воспалительный процесс, *S. aureus*, иммуноморфологический статус.

UDC 579. 862. 1:615. 37:615. 33:616-002. 3-092. 9:612. 01. 1

Peculiarities of Immunomorphological State in Purulent-Septic Process Caused by *S. aureus* and under the Influence of Combination Therapy (experimental research)

Mishina M. M.

Abstract. Introduction. At the present day full attention is given to pathogenesis of disorders of immune response and its correction in pyoinflammatory processes caused by *S. aureus*. The secondary immune deficiency in this pathology is grounded on several mechanisms: death of population cells, imbalance of cell populations, functional cell blocking of the receptors due to binding of receptor apparatus by microbial toxins.

The goal of this research is studying of the peculiarities of cell immunity in the tissues before and after combination therapy which includes immunomodulators, cytokine correctors and antimicrobial agents.

The object and methods of the research. Experimental research conducted on 80 mice of inbred lines C57Bl/6JSto. The experiments were carried out according to the national General Ethical Principles for Experiments on Animals (Ukraine, 2001) which are agreed upon by the principles of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18. 03. 1986). The immunomorphological research was conducted on the paraffin sections with thickness of 5-6 μm by the indirect

method of Kuns according to Brosman technology. Immune cells were differentiated by means of monoclonal antibodies to different types of cells of Serotec Company. The number of producer cells of cytokines was calculated within sight of $\times 400$.

The results of the research and its consideration. In immunomorphological research it has been established that the viscera of the infected laboratory animals is characterized by presence of producer cells of cytokines. Moreover its number is increased in comparison with the group of intact animals. Manifestation rate of macrophage reaction, reaction of plasmation as well as content ratio of producer cells of cytokines is probably higher of those ones in intact animals. Intravascular fixation of neutrophilic granulocytes to the surface is observed. The number of plasmoblasts and producer cells of interleukins IL-1 β , IL-6, TNF- α is increased. The walls of the vessels are with mediated fibrinoid necrosis; proliferation of the endothelium is apparent. The microscopic study of the tissues of internal organs has shown hyperemia of the blood capillaries and edema of weak fuchsinophil stroma.

In treatment of the animals by antimicrobial agent Gatifloxacin and immunomodulator Polyoxidonium with cytokine corrector Roncoleukin, significant changes in the microscopic picture of the internal organs in comparison with the groups of animals, which underwent treatment only by antimicrobial agent with immunomodulator or antimicrobial agent and cytokine corrector, are detected. Edema of moderately fuchsinophil stroma is reduced; its inflammatory infiltration is either absent, or is observed in the form of fine-focal perivascular lymphoid cellular infiltrates with low reactions to RNP and DNP in the cytoplasm and nucleus. Relevant volume of inflammatory infiltration is reliably decreased in comparison with the group of infected animals. In its composition all clones of the immune cells are found. Among the elements of inflammatory infiltration relevant volume of macrophages, plasmoblasts and producer cells of anti-inflammatory cytokines is reduced. The tissues of internal organs are not characterized by destructive changes and the dystrophic ones are not significant. The walls of vessels are fuchsinophil, without destructive proliferative changes; the basal endothelial membrane is moderately PAS-positive and has type IV collagen. Endotheliocytes show moderate luminous intensity.

Conclusion. Consequently, due to use of combination therapy which includes antimicrobial agent, immunomodulator and cytokine corrector, the organs of the immune system are characterized by recovery of structure and reduction of morphological manifestation of antigen exposure.

Keywords: purulent-septic process, *S. aureus*, immunomorphological state.

Рецензент – проф. Старченко І. П.
Стаття надійшла 10. 08. 2014 р.