



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК: 615.361.013.68.014.41:612.017.1: 616.381- 002

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ОСТРОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

К.А. ГОЛЬЦЕВ
М.В. ОСТАНКОВ
О.Ю. КОЖИНА
Л.В. ОСТАНКОВА
А.Н. ГОЛЬЦЕВ

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

В работе представлены экспериментальные данные по оценке эффективности применения криоконсервированной кордовой крови человека (кККЧ) в комплексной терапии острого гнойного перитонита (ОГП) у крыс.

Установлено, наиболее выраженное снижение уровня воспалительного цитокина ИФН- γ и повышение содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10, уменьшение концентрации С-РБ наблюдались в группе животных, которым во время релапаротомии и санации брюшной полости кККЧ вводили с антибиотиком. В этой же группе наблюдалась максимальная выживаемость животных. Такое действие кККЧ можно связать с присутствием в ней иммуотропных субстанций и их участием в регуляторных эффектах, обеспечивающих сопряженную работу иммунной, эндокринной и нервной систем.

Ключевые слова: острый гнойный перитонит, криоконсервированная кордовая кровь человека, воспалительный – ИФН- γ и противовоспалительный – ИЛ-10 цитокины, С-реактивный белок.

Проблема перитонита определяется широкой его распространенностью, сложностью и множеством нарушений в организме больного при данном заболевании [4, 9]. Несмотря на применение антибиотиков широкого спектра действия, некоторых видов иммуномодуляторов, методов экстракорпоральной детоксикации организма, гипербарической оксигенации, лапаротомии, СВЧ и т.д. существенного снижения летальности при данном заболевании не наблюдается [4, 12].

В свете новых диагностических технологий очевидна необходимость изучения состояния иммунной системы (ИС) и, в частности, роли иммуновоспалительного процесса при перитоните [1, 2, 8]. Это позволит оптимизировать схемы и повысить эффективность применения иммуномодулирующей терапии, направленной на уменьшение реакции локального воспаления [5], минимизации риска развития аутоиммунной агрессии, коррекции в целом систем обеспечения гомеостаза организма, т.е. нейро-иммунно-эндокринного блока и, как итог, снизить степень инвалидности и летальность пациентов.

Исходя из сказанного, становится очевидным необходимость применения для лечения острого гнойного перитонита (ОГП) препаратов с потенциалом надсистемной регуляторной активности [3, 4, 8, 9, 12]. На основании достаточного объема информации к ним вполне можно отнести и кККЧ [3, 11, 12, 14], которая и была апробирована в наших исследованиях как потенциальный корректор состояния ИС организма экспериментальных животных при развитии ОГП.

Цель исследования. Оценить коррегирующий эффект криоконсервированной кордовой крови человека (кККЧ) на медиаторы воспаления: воспалительный (ИФН- γ) и противовоспалительный (ИЛ-10) цитокины, уровень С-реактивного белка, как сочетанного компонента комплексного лечения крыс с ОГП.

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах линии Вистар массой 160-180 гр. 6-ти месячного возраста в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позво-



ночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург, 1985 г.), одобренными Национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2003 г.) [6]. Лабораторные животные содержались в условиях вивария ИПКиК НАНУ и были использованы в экспериментальной работе согласно рекомендаций. Моделировали ОГП путем перевязки и отсечения червеобразного отростка, который оставляли в брюшной полости крысы [10]. Оперировали крыс под общим тиопенталовым наркозом. Метод криоконсервирования ККЧ разработан в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [11,12]. Хранится кККЧ при -196°C в низкотемпературном банке. Представляет кККЧ суспензию взвешенных в собственной плазме кордовой крови ядросодержащих клеток, в состав которых входят гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки. Аутологичная плазма содержит биологически-активные вещества, например, монокины, интерлейкины, интерферон, ферменты, гормоны, микроэлементы, аминокислоты и витамины. Размораживание осуществляли на водяной бане при температуре $40-41^{\circ}\text{C}$ [3].

Крысам опытных групп через 24 часа после операции проводили релапаротомию с санацией брюшной полости раствором фурацилина. Все крысы были разделены на 5 групп: 1 – интактные крысы (контроль); 2 – с индукцией ОГП; 3 – ОГП, внутримышечная инъекция ампицилина (40 мг/кг массы тела); 4 – ОГП, одновременно с инъекцией ампицилина внутривенно вводили кККЧ (в объеме 0,3 мл. – $5-6 \times 10^6$ клеток); 5 – ОГП, которым внутривенно вводили кККЧ в том же объеме. Содержание клеток-продуцентов цитокинов ИЛ-10 и ИФН- γ в селезенке крыс оценивали методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием МАТ (BD, США) к соответствующим медиаторам [7]. Для идентификации указанных внутриклеточных цитокинов, перед инкубацией с МАТ клетки предварительно пермеабилizировали с помощью реактивов Cytofix/Cytoperm и Perm/Wash Duffer фирмы BD Pharmingen™. В качестве контроля использовали пробы с добавлением неиммунных меченных FITC и PE МАТ того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера. Статистический учет данных, полученных цитофлуориметрическим анализом, осуществляли с помощью программы WinMDI 2.8. Уровень С-РБ определяли в сыворотке крови крыс с использованием метода латексной агглютинации. Оценку вышеуказанных показателей проводили на 1-, 3- и 5-е сутки после релапаротомии. Из эксперимента животных выводили путем декапитации. Во 2-, 3-, 4- и 5-й группах были дополнительно оставлены животные с ОГП для определения их выживаемости в течение 1-, 3-, и 5-х суток после релапаротомии. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера с помощью программы Statistica 7.0, (Stat Soft Inc), адаптированной к поставленным задачам.

Результаты и их обсуждение. Воспалительный цитокин ИФН- γ является регулятором функционирования субстратов клеточного и гуморального иммунитета, то есть одним из ключевых медиаторов первичного иммунного ответа на антиген. Как видно из представленных на рис.1 данных, уже на 1-е сутки после релапаротомии количество клеток-продуцентов цитокина ИФН- γ достоверно ($p < 0,001$) повышалось у крыс всех опытных групп. На 5-е сутки достоверное снижение данного показателя до уровня контроля наблюдалось только у животных 4-й группы, что, доказывает кооперативное участие кККЧ с антибиотиком в минимизации продукции воспалительного цитокина ИФН- γ . Действительно, при стандартном лечении антибиотиком уровень воспалительного цитокина у крыс группы 3 оставался повышенным и на 5-е сутки наблюдения, но был ниже, чем у не леченных животных группы 2. Существенно, что у крыс группы 5, которым после релапаротомии была введена только кККЧ позитивное снижение концентрации ИФН- γ^+ клеток на 5-е сутки уступало только показателям в группе 4 (рис. 1).

Проведенное исследование продемонстрировало значимость дефицита противовоспалительных цитокинов в патогенезе перитонита. Известно, что прогрессирование воспалительного процесса может происходить не только на фоне увеличения концентрации, но и недостатка продукции противовоспалительных цитокинов [13, 15]. В соответствии с этим тезисом находятся и результаты исследования, представленные на рис. 2. Определение содержания клеток-продуцентов ИЛ-10 у крыс опытных групп выявило значительное их снижение при развитии ОГП, вариабельность изменения, что, вероятно, также отражает разную иммунокорректирующую активность разных форм терапии. Например, у животных, которых лечили только антибиотиком, низкое содержание продуцентов ИЛ-10 $^+$ клеток относительно контроля было отмечено во все сроки наблюдения. Более того, на 3-и сутки концентрация ИЛ-10 $^+$ клеток была даже ниже, чем на 1-е и 5-е сутки, что согласуется с данными об иммуносупрессивном эффекте при антибиотикотерапии. Наиболее выражены показатели содержания ИЛ-10 $^+$ клеток приближались к контролю у крыс группы 4 на 5-е сутки исследования. При этом надо отметить, что в отличие от ИФН- γ^+ клеток, концентрация клеток-продуцентов цитокина ИЛ-10 в данном случае все же оставалась ниже контроля.

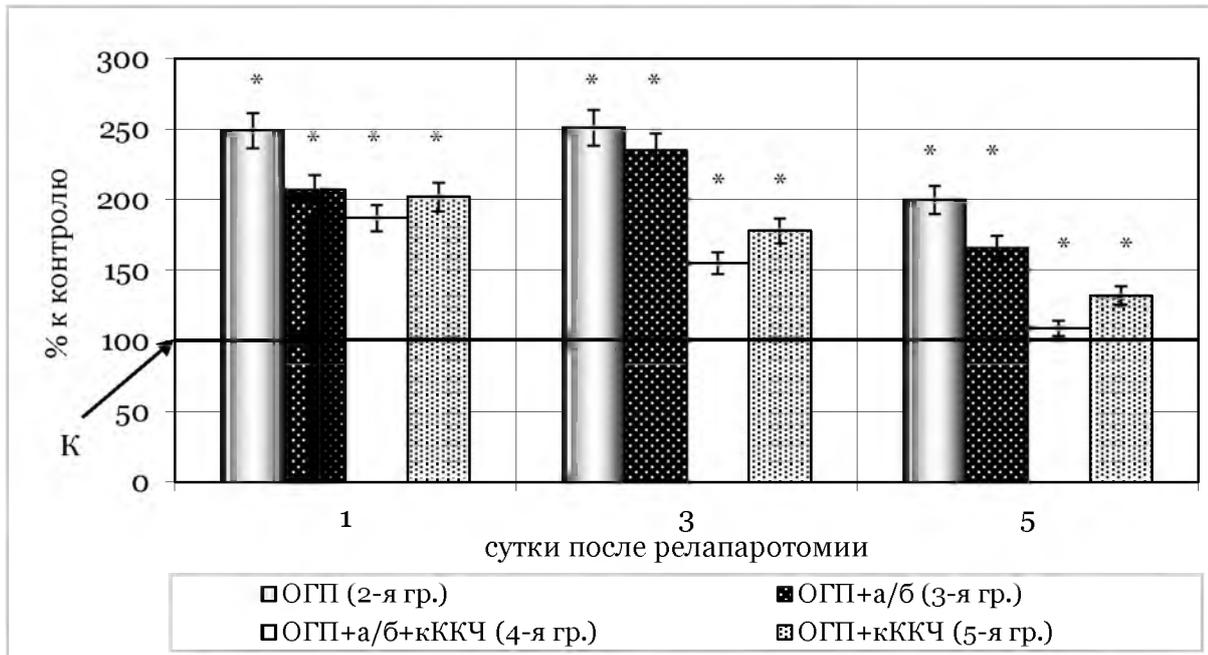


Рис. 1. Динамика изменения концентрации клеток-продуцентов воспалительного цитокина ИФН-γ у крыс с ОГП до и после лечения. Примечания: Показатели в группе интактных животных (группа 1) приняты за 100% (К – контроль); * – достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с контролем

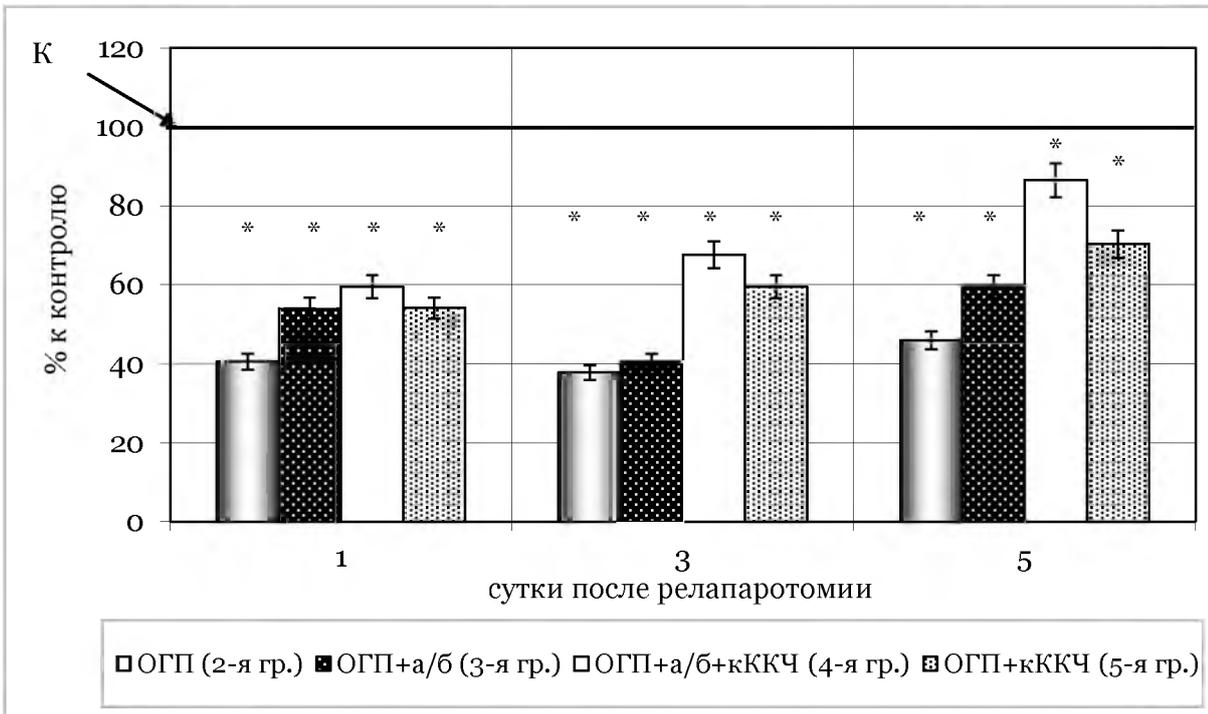


Рис. 2. Динамика изменения концентрации клеток-продуцентов противовоспалительного цитокина ИЛ-10 у крыс с ОГП до и после лечения. Примечания: Показатели в группе интактных животных (группа 1) приняты за 100% (К – контроль); * -достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с контролем

Неоднократно отмечалась многовекторная биологическая активность ККЧ [3, 11] и в данном случае наши результаты акцентируют внимание на более выраженной коррекции под ее влиянием состояния медиаторов воспаления в сравнении с провоспалительными. Вместе с тем, более выраженное повышение уровня цитокина ИЛ-10 на 5-е сутки у крыс группы 5 хотя и наблюдали, по сравнению с группой 3, но было менее выраженным, чем у крыс группы 4 в этот период. Данный факт подчеркивает проявление корректирующего эффекта кККЧ и антибиотика и в отношении противовоспалительного каскада ИС.



Следовательно, применение кККЧ с антибиотиком положительно воздействовало на формирование цитокинового профиля организма крыс с ОГП, приближало к норме концентрацию клеток-продуцентов противовоспалительного ИЛ-10 и одновременно нормализовало содержание клеток-продуцентов воспалительного цитокина ИФН- γ .

Доказательством причастности такого рода изменений цитокинового профиля к изменению интегрального развития иммуновоспалительного процесса у крыс с ОГП являются результаты оценки содержания в сыворотке крови животных С-РБ. Так, на 1-е сутки после операции положительные результаты (от + до ++) на С-РБ были обнаружены в сыворотке крови животных всех опытных групп. На 5-е сутки у крыс группы 3 и 5 и наблюдали положительную реакцию на содержание С-РБ в сыворотке крови с результатом (+). В этот же период у крыс группы 4 отмечали слабоположительную реакцию или ее отсутствие.

Таким образом, проведенное исследование выявило взаимосвязь между маркерами иммунного воспаления: концентрацией цитокинов и С-РБ, их ролью в патогенезе ОГП. Известно, что воспалительный цитокин ИФН- γ является одним из главных медиаторов первичного иммунного ответа на АГ, который активирует ИС и, регулируя функцию Т- и В-лимфоцитов при патологиях, может запускать аутоиммунную реакцию.

С-РБ принадлежит к эволюционно древнему семейству белков со специфическим «карманом», в котором имеется участок связывания с ионами кальция. Благодаря связыванию с Fc рецепторами, С-РБ повышает фагоцитоз определенных АГ и микроорганизмов.

В данных исследованиях было показано, что существует прямая связь между изменением уровня С-РБ в сыворотке крови, концентрацией цитокинов, тяжестью и динамикой клинических проявлений воспалительного процесса. Чем выше концентрация С-РБ, тем выше количество клеток-продуцентов ИФН- γ и тяжесть воспалительного процесса у крыс с ОГП, и наоборот.

При сопоставлении полученных результатов была установлена положительная корреляция между повышением уровня ИФН- γ^+ клеток и С-РБ ($r=1,0$). Вместе с тем изменение концентрации ИЛ-10 $^+$ клеток имело отрицательную корреляцию с содержанием С-РБ ($r=0,51$), что свидетельствует об усилении воспалительного процесса на фоне недостаточной продукции оппозитных противовоспалительных медиаторов. Другими словами проведенное исследование продемонстрировало значимость дефицита активности формирования в течение 5-и суток пула иммунокомпетентных клеток (ИКК) причастных к формированию противовоспалительных цитокинов, (т.е. ИЛ-10 $^+$ клеток). К тому же, в сочетании с С-РБ эти показатели позволяют прогнозировать неблагоприятное течение перитонита вплоть до летального исхода.

Подтверждением этому служат результаты оценки интегрального показателя тяжести развития ОГП – гибель животных на протяжении 5-и суток (рис. 3). Как видно, на 3-и сутки после релапаротомии среди не леченных животных в группе 2 погибло около 50%, а на 5-е сутки – почти 80%, что подтверждается результатами других экспериментальных наблюдений по высокой летальности при тяжелых формах перитонита [9].

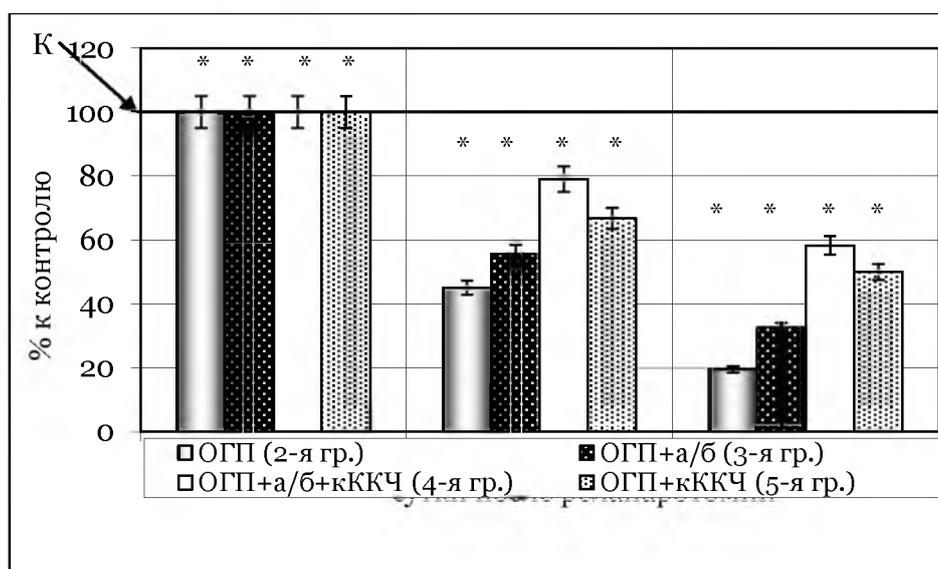


Рис. 3. Показатели выживаемости крыс с ОГП до и после лечения.
 Примечания: Показатели в группе интактных животных (группа 1) приняты за 100% (К (1-я гр.) – контроль); * – достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с контролем



В группе 3 животных, которых лечили только антибиотиком, выживаемость к 5-м суткам была в 1,7 раза выше, чем в группе 2. Применение с антибиотиком кККЧ (группа 4) обеспечивало выживаемость примерно 80% крыс на 3-и сутки. Т.е. введение кККЧ создавал "запас прочности" выживаемости уже на 3-и сутки, подчеркивая ее способность быстро мобилизовать защитный потенциал организма. На 5-е сутки в группе 4 выживаемость животных, которых лечили кККЧ с антибиотиком хотя и снижалась, но снова оставалась на более высоком уровне в сравнении с другими группами, подчеркивая существенное преимущество такого лечения не только по сравнению с не лечеными животными, но и с применением только антибиотика (группа 3) или только кККЧ (группа 5).

Сравнительный анализ полученных результатов свидетельствует о том, что выживаемость животных с ОГП четко коррелировала с динамикой изменения концентрации ИКК, определяющих профиль воспалительных и противовоспалительных цитокинов организма, уровень С-РБ. Максимально выраженная корреляция цитокинов обоого типа (ИФН- γ и ИЛ-10) и С-РБ при сочетанном лечении животных кККЧ с антибиотиком обеспечивало максимальную выживаемость крыс в течение всего срока наблюдения.

Выводы. Кривоконсервированная ККЧ при сочетанном применении с антибиотиком во время релапаротомии является важным компонентом патогенетического лечения острого гнойного перитонита в условиях эксперимента. Установлено преимущество применения кККЧ с антибиотиком в сравнении с применением только антибиотика, или только кККЧ, что обеспечивает наиболее выраженное снижение концентрации клеток-продуцентов воспалительного цитокина ИФН- γ и уровня С-РБ, повышение количества клеток-продуцентов противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и выживаемости животных. Полученные результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать применение кККЧ в сочетании с антибиотиком для клинического применения при лечении ОГП.

Литература

1. Бугай М. І., Польовий В.П. Імунні порушення у хворих на поширені форми перитоніту [М. І. Бугай, В.П. Польовий] // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. XI, №3 (41), Ч.2. – С.18-20.
2. Бунатян А.А. Иммунокорректоры в комплексном лечении послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у хирургических больных и мониторинг иммунологических показателей, [А.А.Бунатян, Е.В.Ивняева., В.В.Нигода Л.И. Винницкий] // Анестезиология и реаниматология – 2004. – №5. – С. 79 – 83.
3. Гольцев А.Н. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть I. Характеристики гемопоэтического потенциала [А.Н. Гольцев, Т.А. Калининско] // Проблемы криобиологии. – 1998. – №1. – С.3-24.
4. Гнойный перитонит. Патофизиология и лечение. Бойко В.В., Криворучко И.А., Минухин В.В., Логачев В.К., Гусак И.В., Иванова Ю.В., Пархоменко К.Ю. / Под ред. А.Я. Цыганенко. – Харьков: Контраст, 2002. – 280 с.
5. Гусев Е.Ю. Методология изучения системного воспаления [Е.Ю. Гусев, Л.Н. Юрченко, В.А. Черешнев, Н.В.Зотова] // Цитокины и воспаление. -2008. – Т.7,№1. – С. 15-23.
6. Загально етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т.8, №1. – С. 142-145.
7. Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть. – Київ: Выща школа, 1989. – 304 с.
8. Косинец В.А. Изменения в системе иммунитета при распространенном гнойном перитоните и возможности их коррекции // Новости хирургии. – 2012. – Т. 20, №3. – С. 36-42.
9. Мельник В.М. Обґрунтування і результати патогенетичного лікування експериментального гострого гнійного поширеного перитоніту [В.М. Мельник, О.І. Пойда] // Укр. журнал екстремальної мед ім. Г.О. Можасва – 2005. – Т 6, № 4. – С.56 – 60.
10. Усиков Ф.Ф. Хирургическая модель острого гнойного перитонита [Ф.Ф. Усиков, Е.В. Пастернак, Л.Д. Романова и др. // Хирургия. – 1984. – № 8. – С. 27-29.
11. Цуцаева А.А. Заготовка, криоконсервирование и клиническое применение гемопоэтических клеток кордовой крови человека [А.А. Цуцаева, В.И. Грищенко, О.С. Прокошук и соавт.] // Методические рекомендации – Харьков, 2000. – 18 с.
12. Украина, патент №31847А, МПК А01№1/02, заявл. 05.11.98г. Опубл.: Бюл. №7, с. 1.10, 15.12.2000г. «Способ криоконсервирования кровяных клеток кордовой крови», [А.А. Цуцаева, В.И. Грищенко, О.С. Прокошук и др.].
13. Badiu D.C., Paunescu V., Aungurenci A., Pasarica D. Proinflammatory cytokines in peritonitis [D.C. Badiu, V Paunescu, A Aungurenci, D. Pasarica]// J. Med. Life. – 2011. – Vol. 4, №2. – P.158-162.
14. Kurtzberg J. Progress with unrelated cord blood transplants in adults. // Blood. – 2003. – Vol. 101 – P.4648 – 4659.



15. Laurin L.P., Brissette M.J., Lepage S., Cailhier J.F. Regulation of experimental peritonitis: a complex orchestration peritonitis [L.P.Laurin, M.J Brissette., S. Lepage, J.F. Cailhier // *Nephron. Exp. Nephrol.* – 2012. – Vol. 120, №1. –41-46.

16. Nguyen H.H., Tran B.T., Muller W., Jack R.S. IL-10 acts as a developmental switch guiding monocyte differentiation to macrophages during a murine peritoneal infection // *J. Immunol.* – 2012. – Vol.189, №6. – P. 3112-3120.

APPLICATION OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD IN COMBINED THERAPY OF ACUTE PURULENT PERITONITIS

K.A. GOLTSEV
M.V. OSTANKOV
O.YU. KOZHINA
L.V. OSTANKOVA
A.N. GOLTSEV

*Institute for Problems of Cryobiology
the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkov*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

In the paper there are presented experimental data on estimation of the efficiency of cryopreserved human cord blood (cHCB) application in a combined therapy of acute purulent peritonitis (APP) in rats. It was established that the most pronounced reduction of the level of inflammatory cytokine IFN- γ and an increase in the content of anti-inflammatory cytokine IL-10, a decrease in C-reactive protein concentration were observed in the group of animals, received cHCB with antibiotic during relaparotomy and abdominal cavity sanitation. In the same group there was found the maximum survival of animals. Such an effect of cHCB may be related to the presence in it of immunotropic substances and their involvement into regulatory effects, providing a conjugated work of immune, endocrine and nervous ones.

Keywords: acute purulent peritonitis, cryopreserved human cord blood, inflammatory – IFN - γ and anti-inflammatory – IL -10 cytokines, C-reactive protein