УДК 579.842.11:57.085.1:616-002.3-092.9

Кузьменко А.М.

СТАН ІМУНІТЕТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНОМУ ПРОЦЕСІ, СПРИЧИНЕНОМУ E.COLI

Харківський національний медичний університет

В даний час лікування гнійно-запальних захворювань (ГЗЗ) є одним з актуальних завдань сучасної медицини. E.coli відіграє значну роль у виникненні та розвитку ГЗЗ, бо може викликати інфекції кишкового тракту, сечовивідної та дихальної систем, ЛОР-органів, шкіри та м'яких тканин. Тяжкість стану та результат при лікуванні даних захворювань залежать від вираженості ендогенної інтоксикації, недостатності систем детоксикації, тривалості та виду органної недостатності, порушень імунологічного захисту організму. Метою даної роботи було визначення показників стану імунної системи при гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli. Експериментальні дослідження виконані на мишах інбредної лінії C57Bl/6JSto, що були розподілені на 2 групи (інтактні й інфіковані). Імунні клітини диференціювалися за допомогою моноклональних антитіл до різних типів клітин фірми Serotec. Для статистичної обробки результатів використано програму «Statistica» для персонального комп'ютера. Експериментально досліджено імунний статус при гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli. Встановлено, що при гнійно-запальному процесі, спричиненому кишковою паличкою, наявна недостатність Т-ланки імунітету на тлі активації В-ланки імунної системи при порівнянні імунних показників $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ у крові інтактних та інфікованих тварин. Виявлено активацію прозапальних цитокінів IL-1 та TNF з пригніченням продукції протизапального цитокіна L-4, що свідчить про дисбаланс цитокінової регуляції. Встановлено зниження рівня С3 компоненту комплементу при гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli, порівняно з негативним контролем. Після аналізу змін в імунному та цитокіновому статусі при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli, а саме: таких показників, як рівні $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD11\beta^+$, $CD18^+$, $CD22^+$, вміст IgM, С3-конвертази комплементу у інфікованих тварин, порівняно з інтактною групою, можна зробити висновок, що при гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli, наявна недостатність Т-ланки імунітету на тлі активації В-ланки імунної системи.

Ключові слова: гнійно-запальний процес, *E.coli,* імунний статус.

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківського національного медичного університету «Експериментальне мікробіологічне обґрунтування протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань», № державної реєстрації 0114U003390.

Вступ

В даний час лікування гнійно-запальних захворювань (ГЗЗ) є одним з актуальних завдань сучасної медицини. Це обумовлено підвищенням вірулентності мікроорганізмів і збільшенням їх резистентності до антибактеріальних препаратів, впливом інфекційного процесу на імунні реакції організму. *E.coli* відіграє значну роль у виникненні та розвитку ГЗЗ, бо може викликати інфекції кишкового тракту, сечовивідної та дихальної систем, ЛОР-органів, шкіри та м'яких тканин [2, 9].

Тяжкість стану та результат при лікуванні даних захворювань залежать від вираженості ендогенної інтоксикації, недостатності систем детоксикації, тривалості та виду органної недостатності, порушень імунологічного захисту організму [8, 12]. Складна та різноманітна за своєю природою ендогенна інтоксикація є одним з важливих синдромів, пов'язаних з вторинним імунодефіцитом [3]. Однією з важливих ознак розвитку вторинного імунодефіциту є зниження кількості лімфоцитів [11]. З іншого боку для обмеження пошкоджуючого ефекту гуморальних стресорних впливів на імунну систему важливе значення має стан стрес-лімітуючих систем імунітету, серед яких провідне місце займають медіатори міжклітинної взаємодії - інтерлейкіни. Саме рівень збалансованості точніше характеризує імунну систему, ніж показники кількості або функціональної активності окремих імунологічних параметрів [1, 7].

У зв'язку з цим необхідним є патогенетичне обґрунтування комплексного лікування ГЗЗ з використанням методів детоксикації та імунокорекції, що істотно знижує ризик виникнення ускладнень і летальність при ГЗЗ [4].

Мета роботи

Визначення показників стану імунної системи при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli.*

Об'єкт і методи дослідження

Експериментальні дослідження виконані на 20 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» [5, 10]: 1 група – інтактні миші (n=10); 2 група – інфіковані миші (n=10). Імунні клітини диференціювалися за допомогою моноклональних антитіл до різних типів клітин фірми Serotec. Для статистичної обробки результатів використано програму «Statistica» для персонального комп'ютера [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Загальна схема імунної відповіді на будь-який антиген включає етапи поглинання антигену макрофагами, його перетравлення та презентація ними патогену Т-клітинам з наступним запусканням специфічної імунної відповіді, що закінчується біосинтезом антитіл, тобто відгуком на попадання будь-якого антигену в організм є кооперативна взаємодія імунних клітин. Антитіла, в[illegible], зв'язуючись з антигеном, сп[illegible] впізнавання антигену іншими [illegible] імунної системи: роблять антиген більш доступним для фагоцитозу, формують циркулюючі імунні комплекси – усе це спрямовано на руйнування бактерій, яке здійснюється також і за допомогою системи комплементу. Тому для оцінки функціонування імунної системи при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli* необхідним є визначення основних клонів імунної системи, а саме: CD3+, CD4+, CD8+ (Т-ланка імунітету), CD11β+ і CD18+ (фагоцитоз та нейтрофіли), CD22+ (В-клітини), IgM, С3-конвертази комплементу у інфікованих тварин у порівнянні з інтактною групою.

При порівнянні отриманих значень $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ у крові інтактних та інфікованих тварин (рис. 1), встановлено пригнічення Т-ланки імунітету (достовірне зниження [illegible], CD8+ у інфікованих [illegible]олем).

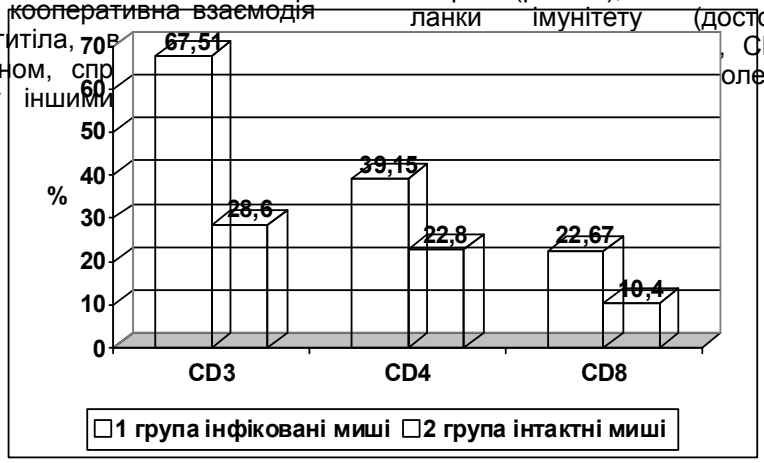

Рис. 1. Показники імунітету у крові інтактних та інфікованих тварин при гнійно-запальному процесі, спричиненому E. coli.

Зниження вмісту показників, що характеризують Т-клітинний імунітет, говорить про те, що при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli*, наявний дефіцит Т-клітинного імунітету, тобто фактори патогенності кишкової палички пригнічують продукцію тимоцитами загальної популяції Т-клітин ($CD3^+$), тим самим порушується диференціювання Т-клітин.

Аналіз порівняння концентрації $CD22^+$ у крові інтактних та інфікованих мишей виявив, що при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli*, має місце гіперпродукція В-клітин, обумовлена дією ферментів агресії кишкової палички (рис. 2).

Активація В-ланки імунітету приводить до посилення продукції імуноглобулінів класу М, про що свідчить підвищення вмісту IgM сироватки крові у 2 рази серед інфікованих (79,3±3,4 г/л) порівняно з інтактними (39,38±2,5 г/л).

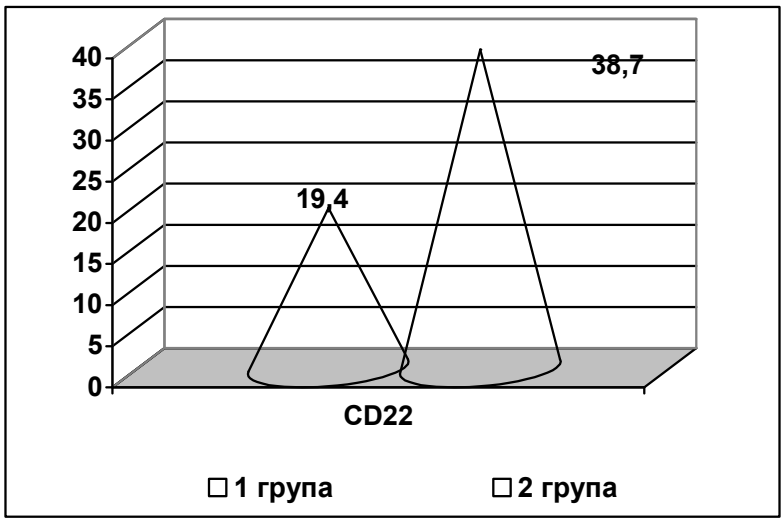

Рис. 2. Рівень В-клітин (у %) в крові інтактних мишей та мишей з гнійно-запальним процесом, спричиненим E. coli.

Рис. 3. *Рівень CD 11β⁺ та CD 18⁺ (у %) в крові інтактних й інфікованих мишей при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli.*

Порівняння у крові мишей обох груп таких показників як рівень CD11β⁺ та CD18⁺ показало, що при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli*, спостерігається зниження даних показників (рис. 3).

При визначенні показників цитокінового статусу (IL-1, IL-4, TNF) експериментальних тварин встановлено, що під дією факторів *E.coli* відбувається активація цитокінового каскаду: підвищується рівень IL-1 та TNF – прозапальних цитокінів, які, в свою чергу, спрямовано посилюють гуморальний імунітет. L-4 – є протизапальним цитокіном, при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli,* його фікованих тварин актною групою.

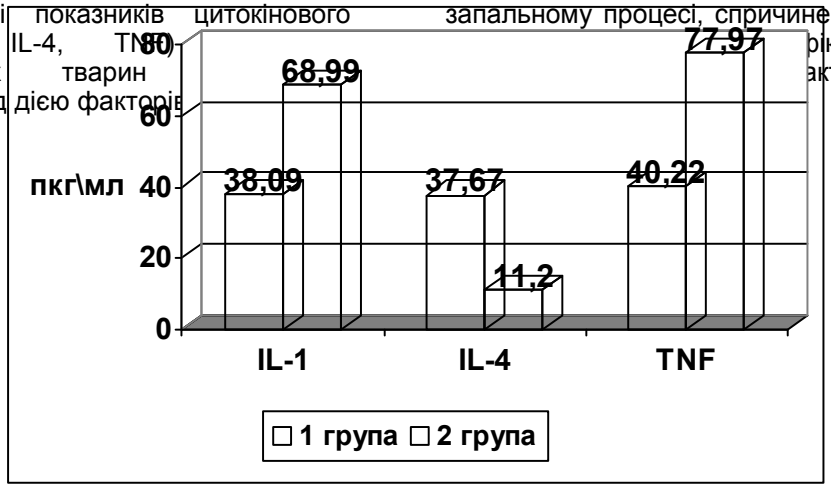

Рис. 4. Концентрація IL-1, IL-4 та TNF у крові лабораторних тварин при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому E.coli.

При активації системи комплементу ключовим компонентом є С3 компонент, продукт розщеплення якого С3b активує термінальні компоненти мембранатакуючого комплексу, тому обов'язковим з'явилося визначення рівня С3 фракції. Слід зазначити зниження рівня С3 компонента комплементу в 2,8 разів серед інфікованих мишей (16,3±0,9) у порівнянні з інтактними тваринами (45,6±1,8).

Висновки

Таким чином, після аналізу змін в імунному та цитокіновому статусі при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli*, а саме: таких показників, як рівні $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD11\beta^+$, $CD18^+$, $CD22^+$, вміст IgM, С3-конвертази комплементу у інфікованих тварин, порівняно з інтактною групою, можна зробити висновок, що при гнійно-запальному процесі, спричиненому *E.coli,* наявна недостатність Т-ланки імунітету на тлі активації В-ланки імунної системи.

Перспективою подальших досліджень в даному напрямку є проведення експериментальних дослідження щодо розробки оптимальних схем протимікробної терапії із застосуванням імуномодуляторів.

Література

1. Воспаление: руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М. : Медицина, 1995. – 640 с.
2. Габидуллин В.Г. Факторы патогенности бактерий семейства Enterobacteriaceae, обеспечивающие выживание в организме хозяина / В.Г. Габидуллин, А.А. Ахтариева, М.М. Туйгунов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т.4, № 5. – С. 86- 94.
3. Девятов В.А. Новый фактор в патогенезе раневого процесса / В.А. Девятов, Ю.В. Поняков, Б.П. Кудрявцев // «МИС-РТ», Науч.-исслед. центр «PIKAP». – 2002. – № 27. – С. 3.
4. Кузин М.И. Синдром системного ответа на воспаление / М.И. Кузин // Хирургия. – 2000. – № 2. – С. 54-59.
5. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии / Г.Н. Першин. – М. : Медицина, 1971. – 539 с.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
7. Васильков В.Т. Роль нарушений антиоксидантного статуса организма в формировании синдрома эндогенной интоксикации у больных в токсической и терминальной стадиях перитонита / В.Т. Васильков [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2001. – № 6. – С. 31-34.
8. Савельев В.С. Абдоминальный сепсис: современная концепция и вопросы классификации / В.С. Савельев [и др.] // Анналы хирургии. – 1999. – № 6. – С.8-14.
9. Bush K. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β-lactamases from gram-negative bacteria / K. Bush, J.F. Fisher // Ann. Rev. Microbiol. – 2011. – Vol. 65. – P. 455–478.
10. European Convention for the protection of vertebratae animals used for experemental and opher scientific purposes // Strasbourg. Counsil Treatu Series. - 1987. – № 123. – 52 p.
11. Sieling P.A. CD 1-restricted T cells: T-cells with a unique immunological niche / P.A. Sieling // Clin. Immunol. – 2000. – Vol. 96. – P. 3-10.
12. Sulaiman H. Role of plasminogen activators in peritoneal adhesion formation / H. Sulaiman // Biochem. Soc. Trans. – 2002. – Vol. 30. – P. 126-131.

References

1. Vospalenie: rukovodstvo dlja vrachej / Pod red. V.V. Serova, B.C. Paukova. – M. : Medicina, 1995. – 640 s.
2. Gabidullin V.G. Faktory patogennosti bakterij semejstva Enterobacteriaceae, obespechivajushhie vyzhivanie v organizme hozjaina / V.G. Gabidullin, A.A. Ahtarieva, M.M. Tujgunov [i dr.] // Medicinskij vestnik Bashkortostana. – 2009. – T.4, № 5. – S. 86-94.
3. Devjatov V.A. Novyj faktor v patogeneze ranevogo processa / V.A. Devjatov, Ju.V. Ponjakov, B.P. Kudrjavcev // «MIS-RT», Nauch.-issled. centr «PIKAR». – 2002. – № 27. – S. 3.
4. Kuzin M.I. Sindrom sistemnogo otveta na vospalenie / M.I. Kuzin // Hirurgija. – 2000. – № 2. – S. 54-59.
5. Pershin G.N. Metody jeksperimental'noj himioterapii / G.N. Pershin. – M. : Medicina, 1971. – 539 s.
6. Rebrova O.Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA / O.Ju. Rebrova. – Moskva : MediaSfera, 2003. – 312 s.
7. Vasil'kov V.T. Rol' narushenij antioksidantnogo statusa organizma v formirovanii sindroma jendogennoj intoksikacii u bol'nyh v toksicheskoj i terminal'noj stadijah peritonita / V.T. Vasil'kov [i dr.] // Anesteziologija i reanimatologija. – 2001. – № 6. – S. 31-34.
8. Savel'ev B.C. Abdominal'nyj sepsis: sovremennaja koncepcija i voprosy klassifikacii / B.C. Savel'ev [i dr.] // Annaly hirurgii. – 1999. – № 6. – S.8-14.
9. Bush K. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β-lactamases from gram-negative bacteria / K. Bush, J.F. Fisher // Ann. Rev. Microbiol. – 2011. – Vol. 65. – R. 455–478.
10. European Convention for the protection of vertebratae animals used for experemental and opher scientific purposes // Strasbourg. Counsil Treatu Series. - 1987. – № 123. – 52 г.
11. Sieling P.A. CD 1-restricted T cells: T-cells with a unique immunological niche / P.A. Sieling // Clin. Immunol. – 2000. – Vol. 96. – P. 3-10.
12. Sulaiman H. Role of plasminogen activators in peritoneal adhesion formation / H. Sulaiman // Biochem. Soc. Trans. – 2002. – Vol. 30. – P. 126-131.

Реферат

СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ, ВЫЗВАННОМ *E.COLI*

Кузьменко А.Н.

Ключевые слова: гнойно-воспалительный процесс, *E.coli*, иммунный статус.

В настоящее время лечение гнойно-воспалительных заболеваний является одной из актуальных задач современной медицины. *E.coli* играет значительную роль в возникновении и развитии гнойно-воспалительных заболеваний, потому что может вызвать инфекции кишечного тракта, мочевыделительной и дыхательной систем, ЛОР-органов, кожи и мягких тканей. Тяжесть состояния и результат при лечении данных заболеваний зависят от выраженности эндогенной интоксикации, недостаточности систем детоксикации, продолжительности и вида органной недостаточности, нарушений иммунологической защиты организма. Целью данной работы было определение показателей состояния иммунной системы при гнойно-воспалительном процессе, вызванном *E.coli*. Экспериментальные исследования выполнены на мышах линии C57Bl/6JSto, которые были разделены на 2 группы (интактные и инфицированные). Иммунные клетки дифференцировали с помощью моноклональных антител к различным типам клеток фирмы Serotec. Для статистической обработки результатов пользовались программой «Statistica» для персонального компьютера. Экспериментально исследован иммунный статус при гнойно-воспалительном процессе, вызванном *E.coli*. Установлено, что имеется недостаточность Т-звена иммунитета на фоне активации В-звена иммунной системы при сравнении иммунных показателей CD3 +, CD4 +, CD8 + в крови интактных и инфицированных животных. Выявлено активацию провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF с угнетением продукции противовоспалительного цитокина IL-4, свидетельствующее о дисбалансе цитокиновой регуляции. Установлено снижение уровня С3 компонента комплемента при гнойно-воспалительном процессе, вызванном *E.coli*, по сравнению с отрицательным контролем. После анализа изменений в иммунном и цитокиновом статусе при экспериментальном гнойно-воспалительном процессе, вызванном *E.coli*, а именно: таких показателей, как CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD11β +, CD18 +, CD22 +, содержание IgM, С3-конвертазы комплемента у инфицированных животных по сравнению с интактной группой, можно сделать вывод, что при данной патологии имеется недостаточность Т-звена иммунитета на фоне активации В-звена иммунной системы.

Summary

IMMUNITY STATE IN EXPERIMENTAL PYO-INFLAMMATORY PROCESS CAUSED BY E.COLI

Kuzmenko A.M.

Key words: pyo-inflammatory process, *E.coli*, immune state.

The treatment of inflammatory diseases is still one of the urgent issues of current medicine. *E.coli* plays a significant role in the development of pyo-inflammatory processes, because it can cause infections of gastro-intestinal tract, urinary and respiratory systems, skin and soft tissues. The severity of clinical course and treatment outcomes considerably depend on the endogenous intoxication level, lack of detoxification, duration and type of organ failure, disorders in the body immune defences. The aim of this study was to evaluate the parameters of the immune system in the inflammatory process caused by E. coli. Materials and methods. Experimental studies were performed on C57Bl / 6JSto mice, which were divided into 2 groups (intact and infected). Immune cells were differentiated by using of monoclonal antibodies to the different cell types (“Serotec”). Statistical analysis was performed by «Statistica» PC software. Results. It was found that in the pyo-inflammatory process caused by E. coli there was a T-immunity failure together with activation of B-cells took place compared with such immune parameters of CD3 +, CD4 +, CD8 + in the blood of intact and infected animals. The activation of pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF together with inhibition of inflammatory cytokine IL-4 production indicates an imbalance in cytokine regulation. The decrease of complement component C3 in pyo-inflammatory process caused by E. coli was established. Conclusions. Thus, having analyzed the immune and cytokine changes in modelled pyo-inflammatory process caused by E. coli reflected with such indices as levels of CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD11β +, CD18 +, CD22 +, the contents of IgM, C3-convertase in infected animals compared to the intact group, we may suggest the pyo-inflammatory process caused by E. coli leads to T-immunity failure along with activation of B-cells.