

ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ГНОЙНЫХ РАНАХ В ПРОЦЕССЕ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

Григорьев А.Г.¹, Власов А.П.², Григорьева А.А.¹, Щелчкова Н.А.³, Орлинская Н.Ю.³, Болотских В.А.⁴, Шевалаев Г.А.⁵

¹Научный клинический центр «Медкриология», г. Нижний Новгород, Россия (603081, г. Нижний Новгород, ул. Медицинская, 12), e-mail: medkrio@mail.ru

²ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия (430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68), e-mail: vap.61@yandex.ru

³ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», ЦНИЛ, отдел молекулярно-клеточных технологий, г. Нижний Новгород, Россия (603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1), e-mail: rector@gma.nnov.ru

⁴ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им Н.Н. Бурденко», Воронеж, Россия (394000, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10), e-mail: canc@vsma.ac.ru

⁵ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, д. 42), e-mail: contact@ulsu.ru

В работе изучен уровень продуктов цитокинов у экспериментальных животных с гнойными ранами после использования криокислородного аэрозоля в эксперименте. Проведено исследование влияния криокислородного аэрозоля на содержание в крови показателей цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4) у 75 экспериментальных животных с гнойными ранами. Показано, что применение криокислородной терапии, как монотерапии, так и в сочетании с антибиотическими препаратами приводит к стабилизации иммунного статуса, тем самым предотвращает развитие гнойно-воспалительных осложнений. На фоне проводимой терапии в сыворотке крови возникает разнонаправленное изменение содержания ИЛ-2 (снижение концентрации после второго сеанса и резкое увеличение до уровня интактных животных после третьего), увеличение содержания ИЛ-4. Локальная криокислородная терапия является эффективным методом лечения гнойно-деструктивных ран и может применяться как в комплексном лечении, так и в качестве самостоятельного метода.

Ключевые слова: криокислородная терапия, гнойная рана, интерлейкины.

IMMUNOLOGICAL REACTION AT PURULENT WOUNDS DURING COMBINED TREATMENT

Grigoryev A.G.¹, Vlasov A.P.², Grigoriev A.A.¹, Shchelchkova N.A.³, Orlinkoye N.Y.³, Bolotskih V.A.⁴, Shevalaev G.A.⁵

¹Scientific Clinical Center «Medkriologiya», Nizhny Novgorod, Russia (603081, Nizhny Novgorod, Str. Medical, 12), e-mail: medkrio@mail.ru

²Mordvinian State University, Saransk, Russia (430005, Saransk, street Bolshevistskaya, 68), e-mail: vap.61@yandex.ru

³Medical University «Nizhny Novgorod State Medical Academy» Central Research Laboratory Department of molecular cell technologies, Nizhny Novgorod, Russia (603005, Nizhny Novgorod, pl. Of Minin and Pozharsky, 10/1), e-mail: rector@gma.nnov.ru

⁴Medical University «Voronezh State Medical Academy named after N.N. Burdenko», Voronezh, Russia (394000, Voronezh, street Student, 10), e-mail: canc@vsma.ac.ru

⁵Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia (432017, Ulyanovsk, Lev Tolstoy Str., 42), e-mail: contact@ulsu.ru

The paper examined the level of cytokines products in experimental animals with purulent wounds after use kriokislorodnogo aerosol experiment. The influence kriokislorodnogo aerosol content in the blood parameters of cytokines (IL-2, IL-4) in 75 experimental animals with purulent wounds. It is shown that the use kriokislorodnoy therapy as monotherapy or in combination with atibioticheskimi drugs leads to a stabilization of the immune status, thereby preventing the development of inflammatory complications. On the background of the therapy in the serum occurs opposite changes in IL-2 (reducing the concentration after the second session, and a sharp increase in the level of intact animals after the third), the increase in IL-4. Local kriokislorodnaya therapy is an effective method of treatment of purulent wounds destructive and can be used in treatment, and as an independent method.

Keywords: cryo oxygen therapy, purulent wound, interleukins.

Проблема лечения гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) занимает одну из ведущих позиций в хирургии в силу неуклонного роста распространенности и увеличения процента их осложнений и летальности. Явная неудовлетворительность результатами лечения многих хирургических болезней определяется ростом числа послеоперационных гнойно-септических осложнений и связанной с ними летальностью [10].

Традиционное использование антибиотиков для профилактики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний в настоящее время дает определенный сбой, что связано с распространением агрессивной микрофлоры и резистентностью к антибиотикам, а также другим дезинфицирующим средствам. Кроме того, антибиотикотерапия может приводить к подавлению нормальной микрофлоры человека, сенсibiliзирующему и токсическому эффектам [4]. Антибиотики не обладают и прямым стимулирующим действием на репарацию в ране. Есть определенные трудности и в поддержании необходимой концентрации антибиотиков в гнойной ране. Одной из важнейших причин, затрудняющих эффективную антибиотикотерапию, является динамичность раневого процесса с изменчивостью и сменой возбудителей.

Лечение гнойных инфекций осложняется как подавлением иммунной реактивности организма, вызываемым как действием патогенных микроорганизмов, так и собственно лечебных препаратов. Особые трудности лечения возникают при длительном существовании гнойных ран. У подобных больных обнаруживается снижение иммунитета, которое, является дополнительным фактором развития нозокомиальных штаммов [3,8].

Таким образом, проблема активного местного воздействия на очаги инфекции и гнойно-септические осложнения в ранах мягких тканей с целью повышения эффективности их лечения остаётся до сих пор актуальной проблемой хирургии во всем мире. Интересным представляется оценка влияния местного применения криокислородной терапии, которая сочетает в себе преимущества как классической криотерапии, так и приемов оксигенации пораженных тканей на динамику показателей некоторых интерлейкинов при лечении инфицированной раны.

Цель исследования: изучить уровень продуктов цитокинов у экспериментальных животных с гнойными ранами после использования криокислородного аэрозоля (ККА) в эксперименте.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 75 белых крысах-самцах породы «Вистар» 6-месячного возраста с массой тела 200-250 г. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, что соответствует нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Опыты на животных выполняли в соответствии с правилами гуманного обращения с

животными, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР №742 от 13.11.84г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и №48 от 23.01.85г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных». Все оперативные вмешательства проводили в стерильных условиях под общим обезболиванием.

Способ моделирования инфицированной раны заключался в формировании подкожного кармана размером 4х6 см, в который помещался фетровый диск, пропитанный суспензией, содержащий 0,5 мл 10^8 *S. aureus*. Данный способ обеспечивает получение модели инфицированной кожной раны с заданной бактериальной обсемененностью, которая по своим характеристикам максимально приближена к реальному клиническому течению раневого процесса.

Заражение животных проводили клиническим изолятом *S. Aureus* штамм 3904 MRSA (ГБУЗ НО «ГКБ № 30» г. Нижний Новгород, хирургическое отделение, трофическая язва), обладающим (на основе данных резистограммы) чувствительностью к офлоксацину, умеренной чувствительностью к пefлоксацину и ципрофлоксацину и не чувствительным к ингибитор защищенным пенициллинам, цефалоспорины, эритромицину, азитромицину, клиндамицину, линкомицину, ванкомицину, гентамицину, оксациллину, имипенему.

Лечение гнойной раны проводилось с использованием антибиотика пefлоксацина (Абактал®, рег. № 008768/01) в терапевтической дозе 8 мг/кг 1 раз в сутки в группах 1 и 2 на 1–5-е сутки, после моделирования гнойной раны.

Для обработки раны ККА использовали криогенный аппарат А.Г. Григорьева «Иней», позволяющий конденсировать газообразный кислород под заданным давлением и размером дисперсности фракционных частиц конденсированного кислорода, в зоне манипуляционного поля (патент РФ № 114837, опубликован в бюл. №11 от 20.04.2011г., ТУ 9437-001-92371253-2011, РУ ФРС № 2012/13516 от 07.06.2012г.).

При работе данного аппарата осуществляется конденсация (сжижение) рабочего газа (воздуха, кислорода, озонированного кислорода) на аппликаторе в ране. Сжиженный рабочий газ выходит из отверстия внутреннего канала канюли аппликатора под давлением, пропорциональным давлению подаваемого рабочего газа, которое можно регулировать, что позволяет проводить активную криооксигенацию тканей.

Все животные были распределены на группы:

1 группа – животные, которым после формирования гнойной раны, применяли курсовое введение антибиотика (лечение а/б);

2 группа – животные, которым после формирования гнойной раны применяли курсовое введение антибиотика и лечение ККА на 3, 5, 14-е сутки (лечение а/б+ККА);

3 группа – животные, которым после моделирования гнойной раны, применяли лечение гнойной раны ККА (лечение ККА);

4 группа – контрольная, которым после моделирования гнойной раны, не оказывалось никакого лечения (без лечения);

5 группа – интактные.

Лечение ККА проводили в группах 2 и 3 на 3, 5, 14-е сутки после формирования гнойной раны. Забор материала проводился на 5, 10, 14-е сутки после формирования гнойной раны (абсцесса) соответственно дизайну экспериментального исследования.

В указанные временные точки животные подвергались декапитации, после чего осуществляли забор крови. Кровь центрифугировали в течение 15 минут при 250 g. Полученная плазма крови использовалась для определения ИЛ-2 и ИЛ-4. В работе для количественного определения ИЛ в плазме крови были использованы набор eBioscienceRatIL-2 PlatinumELISA (Кат. № BMS634) и eBioscienceRatIL-4 PlatinumELISA (Кат. № BMS628). Проводилось гистологическое исследование тканевых структур раны.

Полученные данные были обработаны с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Для оценки вероятности различий между контрольными и опытными группами использовали U-критерий Манна-Уитни, независимый от формы распределения в группе. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение.

В данной исследовательской работе была проведена оценка иммунного статуса экспериментальных животных при сформированном гнойно-воспалительном процессе по уровню интерлейкинов. Образование и высвобождение цитокинов происходит кратковременно и жестко регулируется. Диагностически значимой считается степень изменения их тканевых или сывороточных концентраций на фоне воспаления [7]. Для получения сведений об общих закономерностях продукции основных провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в организме при гнойном воспалении был проведён анализ синтеза цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) (ИЛ-2, ИЛ-4) в плазме крови экспериментальных животных. Цитокин секретируется Т-лимфоцитами CD4+, а также Т-клетками некоторых других субпопуляций лимфоцитов [6]. ИЛ-2 является фактором роста Т-клеток, которые принимают активное участие в антибактериальном ответе, активируя специфические лимфоциты на борьбу с микроорганизмами и вирусами.

Рецепторы ИЛ-2 найдены на Т-клетках, Nk-клетках [9]. ИЛ-2 усиливает В-клеточный рост и синтез иммуноглобулинов. ИЛ-2 является важным провоспалительным цитокином, может стимулировать крупные гранулярные лимфоциты, макрофаги и В-клетки.

ИЛ-4 образовывается в основном CD4+ Т-клетками, но также и тучными клетками и базофилами. ИЛ-4 поддерживает пролиферацию активированных Т-клеток и приводит к дифференциации TH2 клеток, поддерживающих продукцию антител в гуморальном иммунном ответе [12]. Также ИЛ-4 стимулирует противовоспалительные эффекты. Он контролирует многочисленные молекулярные процессы, которые вызывают дезактивацию воспалительных макрофагов, подавление секреции провоспалительных цитокинов TNF- α , ИЛ-1, и ИЛ-8 [5, 11].

При исследовании плазмы крови у экспериментальных животных отмечалось достоверное снижение уровня ИЛ-2 во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем на 3-и сутки после формирования гнойно-воспалительного процесса (табл. 1). Наиболее низкая концентрация отмечалась в группе 4 (без лечения). По литературным данным, отрицательная динамика уровня ИЛ-2 в крови соответствует прогрессированию бактериальной инфекции [1].

Таблица 1

Содержание ИЛ в сыворотке крови крыс при гнойно-воспалительном процессе (M \pm m)

| Группа | ИЛ-2, пг/мл | ИЛ-4 пг/мл |
|--------------------------|---------------------|---------------|
| Интактные, n=15 | 65,51 \pm 2,2 | 0 |
| 5-е сутки | | |
| 1. Антибиотик, n=4 | 41,34 \pm 4,6* ** | 0 |
| 2. Антибиотик + ККА, n=4 | 39,33 \pm 4,0* ** | 0 |
| 3. ККА, n=4 | 47,37 \pm 5,8* ** | 0 |
| 4. Без лечения, n=4 | 27,17 \pm 4,2* | 0 |
| 10-е сутки | | |
| 1. Антибиотик, n=4 | 26,20 \pm 3,2* | 0 |
| 2. Антибиотик + ККА, n=4 | 13,88 \pm 1,8* ** | 0 |
| 3. ККА, n=4 | 19,76 \pm 3,2* ** | 0 |
| 4. Без лечения, n=4 | 27,37 \pm 6,2* | 0 |
| 14-е сутки | | |
| 1. Антибиотик, n=4 | 14,9 \pm 1,7* ** | 0 |
| 2. Антибиотик + ККА, n=4 | 45,6 \pm 4,8* ** | 0 |

| | | |
|---------------------|--------------|----------|
| 3. ККА, n=4 | 45,8±6,1* ** | 3,5±0,4* |
| 4. Без лечения, n=4 | 23,6±2,6* | 2,4±0,3* |

* - $p < 0.05$ по отношению к интактной группе; ** - $p < 0.05$ по отношению к контрольной группе «без лечения»

На 10-е сутки после начала лечения отрицательная динамика по уровню ИЛ-2 сохранялась, но минимальные значения фиксировались в группах с применением криокислорода как по сравнению с интактными животными, так и контрольными значениями (группа 4). Однако на 14-е сутки после начала лечения обнаружился разнонаправленный эффект на содержание ИЛ-2 при различных видах терапии. В группе 1 и 4 уровень цитокина продолжает снижаться, что говорит о сохранении бактериальной инфекции. Группы 2 и 3 характеризовались резким увеличением данного показателя по сравнению с контрольной группой 4 (без лечения). В.В. Будрик (2009) показал, что криогенное воздействие оказывает благоприятное влияние на организм в целом и обладает иммуностимулирующим действием [2]. Сопоставимость уровня ИЛ-2 в группах 2 и 3 говорит о снижении гнойно-септической нагрузки и соответствует морфологической картине в тканях раны в этих группах.

При регистрации продукции ИЛ-4 обращали на себя внимание низкий уровень базовой секреции. Однако при изучении уровня ИЛ-4 – основного противовоспалительного цитокина – обнаружен статистически достоверный рост его содержания на 14-е сутки после лечения по сравнению с контрольными пробами групп с применением криокислородного лечения.

Титры ИЛ-2, ИЛ-4, отражающие иммунокомпетентные процессы и противовоспалительную репаративную фазу цитокинового ответа, полностью соответствуют результатам гистологического исследования операционного материала тканей раны, на 14-е сутки исследования. При гистологическом исследовании операционного материала у животных групп 2 и 3 отмечается исчезновение явлений отека, полнокровия и нейтрофильной инфильтрации. В этих же группах интенсивно формируются круглоклеточные элементы и грануляционная ткань (рис.1).

В группах 1 и 4, в которых не применялось воздействие ККА, в ранах продолжались явления некроза, отека, полнокровия, сохранялась нейтрофильная инфильтрация (рис.2).

Данные морфологического изучения биоптатов в группе животных, где гнойно-деструктивный процесс лечился традиционно, свидетельствуют о замедленном темпе течения раневого процесса, при котором альтеративно-воспалительные явления преобладают над репаративными и, как итог, грануляционная ткань длительное время остается незрелой. В группах животных, которым проводилось криокислородное лечение, течение раневого процесса протекает интенсивно.

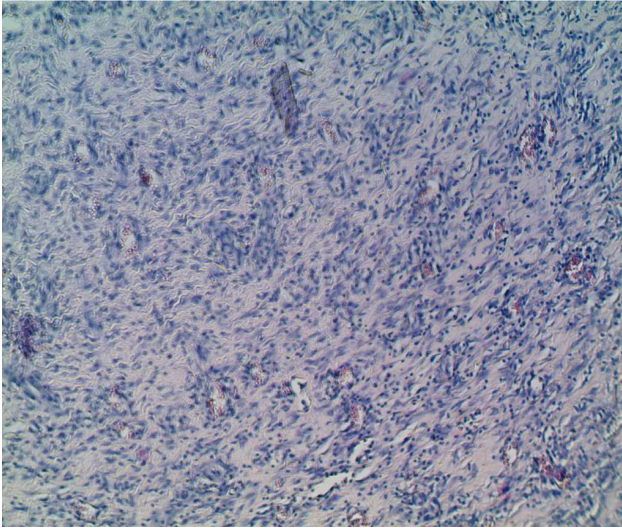


Рис. 1. Формирование круглоклеточных элементов и грануляционной ткани. 14-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином. x 200

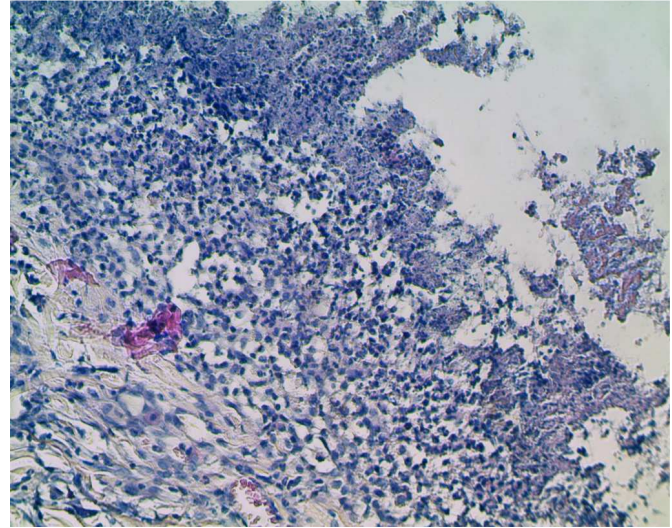


Рис. 2. В тканевых структурах раны явления некроза, отека, полнокровия сосудов, нейтрофильная инфильтрация. 14-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином. x200

Таким образом, при исследованном гнойно-воспалительном процессе динамический контроль сывороточных концентраций цитокинов позволяет проследивать этапность развития системной воспалительной реакции. Применение криокислородной методики лечения при гнойных ранах приводит к стабилизации уровня провоспалительного интерлейкина 2 и увеличению противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в плазме крови экспериментальных животных.

Выводы.

1. Многократная обработка абсцесса криокислородным аэрозолем приводит к активации системы иммунитета, что способствует скорейшему заживлению раневой поверхности.

2. На фоне проводимой терапии в сыворотке крови возникает разнонаправленное изменение содержания ИЛ-2 (снижение концентрации после второго сеанса и резкое увеличение до уровня интактных животных после третьего), увеличение содержания ИЛ-4.

Список литературы

1. Болевич С.Б., Войнов В.А Молекулярные механизмы в патологии человека: Руководство для врачей. - М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство», 2012. - 208 с.
2. Будрик В.В., Будрик В.В Метод локальной гипотермии для лучевой терапии //

Медицинская физика. -2009. - № 4.- С. 38-45.

3. Григорьев А.Г., Шевантаева О.Н., Заславская М.И. Бактерицидный эффект применения криокислородного метода при лечении гнойно-деструктивной раны // Медицинский альманах. - 2014. - № 5 (35). - С. 182-184.

4. Миронов А.Ю., Жилина С.В., Дмитриенко О.А. Архитектоника микробной экологии в отделении гнойной хирургии городской клинической больницы // Клиническая лабораторная диагностика. - 2012. - № 7.- С. 53-58.

5. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. - 2-е изд. – М.: Медицина. - 2006.- 544с.

6. Симбирцев А. С. Цитокиновая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 9 – 16.

7. Фрейдлин И.С., Тоголян А.А. Клетки иммунной системы. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.

8. Яковлев С.В. Современные проблемы антибактериальной терапии госпитальных инфекций: «горячие точки» резистентности // Укр. журн. экстрем. мед. ім. Г.О. Можяева.- 2005. – Т. 6, № 1.- С. 30-37.

9. Greene W.C., Leonard W.J. The human interleukin-2 receptor // Ann. Rev. Immunol. – 1986. - № 4. – P. 69–95.

10. Jenkins T.C., Sabel A.Z., Sarcone E.E., Price C.S., Hehler P.S., Burman W.J. Skin and soft – tissue infection requiring hospitalization at an academic medical center: opportunities for antimicrobial stewardship // Clin. Infect. Dis. – 2010.- Vol. 51, № 8. – P. 895-903.

11. Smirnova M.G., Birchall J.P., Pearson J.P. The immunoregulatory and allergy-associated cytokines in the aetiology of the otitis media with effusion. Mediators Inflamm. – 2004. – Apr. – Vol. 13(2). – P.75-88.

12. Zamorano J., Rivas M.D., Pérez GM. Interleukin-4: A multifunctional cytokine // Immunología. - Vol. 22. – 2003. - N. 2. – P. 215-224.

Рецензенты:

Смолькина А.В., д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии медицинского факультета им. Т.З. Биктимирова ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;

Рубцов О.Ю., д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск.