

УДК 618.12-007.274-084-092.4.615.37

СОСТОЯНИЕ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ «МЕЗОГЕЛЯ» И «КУПРЕНИЛА» В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СПАЕЧНОГО ПРОЦЕССА В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

¹Ефременков А.М., ²Николаев С.Б., ¹Липатов В.А., ¹Конопля А.И.

¹ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»

Минздравоохранения России, Курск, e-mail: kurskmed@mail.ru;

²БМУ «Курская областная клиническая больница», Курск, e-mail: nsb-kursk@yandex.ru

Целью исследования было изучение иммуномодулирующих эффектов различных схем применения «Мезогеля» и «Купренила» при моделировании спаечного процесса в брюшной полости. У экспериментальных животных исследовались показатели гуморального иммунного ответа и гиперчувствительности замедленного типа на 7 и 14 сутки после операции. Установлено, что включение в схему профилактики спаечной болезни «Купренила» позволило предотвратить или уменьшить выраженность иммунодефицитного состояния при развитии спаечного процесса и применении «Мезогеля». Наибольшей иммуностимулирующей активности удалось достичь при внутрибрюшинном введении «Купренила» в сочетании с «Мезогелем».

Ключевые слова: спаечная болезнь, иммунодефицит, иммунокоррекция, «Купренил», «Мезогель»

INFLUENCE OF «MESOGEL» AND «CUPRENYL» ON THE CONDITION OF ADAPTIVE IMMUNITY AT EXPERIMENTAL ADHESIVE PROCESS IN THE ABDOMINAL CAVITY

¹Efremenkov A.M., ²Nikolaev S.B., ¹Lipatov V.A., ¹Konoplya A.I.

¹Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: kurskmed@mail.ru;

²Kursk Regional Clinical Hospital, Kursk, e-mail: nsb-kursk@yandex.ru

The aim of the research was to study immunomodulating effects of various schemes of application of «Mesogel» and «Cuprenyl» at the modeling of an adhesive process in the abdominal cavity. At experimental animals the indicators of a humoral immune answer and delayed type hypersensitivity for 7 and 14 days after operation were investigated. It is established that including in the scheme of preventive maintenance of an adhesive disease of «Cuprenyl», has allowed to prevent or reduce expression immunodeficiency at the development of the adhesive process and «Mesogel» application. The greatest immunopotentiating activity was observed at the intraperitoneal introduction of «Cuprenyl» in a combination with «Mesogel».

Keywords: an adhesive disease, an immunodeficiency, an immunocorrection, «Cuprenyl», «Mesogel»

Увеличение количества оперативных вмешательств на органах брюшной полости и растущее число спаечных осложнений сохраняет актуальной проблему предупреждения образования послеоперационных спаек. Предложенные многочисленными методами профилактики спаечной болезни брюшины позволяют получать антиадгезивный эффект в 20–65 % случаев [5].

Одной из причин спайкообразования считается механическое повреждение мезотелия брюшины, а также ее иммунное воспаление и инфицирование. Имеющиеся литературные данные о состоянии иммунной реактивности и роли иммунитета в патогенезе спаечного процесса немногочисленны и неоднозначны по своим выводам [2, 5].

Одним из современных направлений профилактики спаечной болезни являются средства, обладающие барьерным действием, способные разобщать десерозированные поверхности на время, необходимое для их ремезотелизации. Единственным отечественным антиспаечным средством барьерного действия, разрешенным для

клинического применения, является средство «Мезогель» (ООО «Линтекс», г. Санкт-Петербург). Перспективным направлением профилактики образования спаек также является использование препаратов, способных подавлять синтез коллагена. Одним из таких препаратов является D-пеницилламин («Купренил», TEVA KUTNO, S.A. (Польша)). Имеются единичные сообщения о возможности использования «Купренила» для профилактики и лечения спаечного процесса брюшной полости (СПБП) в клинической практике [3] и эксперименте [6].

Оба указанных препарата обладают также собственной иммуномодулирующей активностью, что немаловажно, если учитывать иммунный компонент патогенеза спайкообразования. При этом их влияние на показатели адаптивного иммунитета в процессе развития спаечной болезни при монотерапии и совместном применении ранее не исследовалось, а немногочисленные литературные данные свидетельствуют об их иммуносупрессирующих свойствах [4, 9].

Таким образом, целью работы было изучение иммуномодулирующих эффектов изолированного и совместного применения препаратов «Мезогель» (М) и «Купренил» (К), при различных способах введения последнего, в условиях экспериментального моделирования СПБП.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на крысах Wistar массой 180–200 г. Операции и все манипуляции с животными проводились с использованием общего обезболивания при соблюдении принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей

(г. Страсбург, Франция, 1986) и правил лабораторной практики РФ (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Спаечный процесс в брюшной полости моделировался асептическим травматическим способом: брюшина вентральной стенки после предварительной гидравлической препаровки с помощью 3 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия, отсекалась и иссекалась на площади 1 см². Слепая кишка на всей поверхности подвергалась скарификации до появления на ее поверхности «кровоной росы».

Способы, дозировки и кратность введения препаратов экспериментальным животным представлены в табл. 1. Перерасчет доз с человека (средний вес 70 кг) на животных – белых крыс производился в сторону увеличения в 5,9 раза.

Таблица 1

Препараты, дозировки, способы и кратность введения крысам со СПБП

№ п/п	Группа животных	Вводимые препараты	Доза	Способ введения	Кратность введения
1	Здоровые животные	-	-	-	-
2	СПБП	-	-	-	-
3	СПБП	Физиологический раствор NaCl	10,7 мл/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
4	СПБП	«Мезогель»	10,7 мл/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
5	СПБП	«Купренил»	160 мг/кг	Внутрижелудочно	Ежедневно до забоя каждые 24 часа
6	СПБП	Физиологический раствор NaCl	10,7 мл/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
		«Купренил»	160 мг/кг	Внутрижелудочно	Ежедневно до забоя каждые 24 часа
7	СПБП	Физиологический раствор NaCl	10,7 мл/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
		«Купренил»	160 мг/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
8	СПБП	«Мезогель»	10,7 мл/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
		«Купренил»	160 мг/кг	Внутрижелудочно	Ежедневно до забоя каждые 24 часа
9	СПБП	«Мезогель»	10,7 мл/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно
		«Купренил»	160 мг/кг	Внутрибрюшинно интраоперационно	Однократно

Крыс иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением эритроцитов барана на 2 и 9-е сутки после моделирования СПБП. О выраженности гуморального иммунного ответа (ГИО) на эритроциты барана (ЭБ) судили по количеству антителообразующих клеток (АОК) [8] в селезенке на пятые сутки после иммунизации. О выраженности гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на эритроциты барана судили по разнице масс регионарного и контрлатерального подколенных лимфатических узлов (РМ) и по разнице количества в них кардиоцитов (РК) через сутки после введения разрешающей дозы ЭБ [7]. Животные выводились из эксперимента путем передозировки наркоза на 7 и 14-е сутки.

Статистическую обработку результатов исследования проводили путем вычисления средней арифметической и ошибки средней. Достоверность статистических различий средних арифметических величин оценивалась с использованием критериев Стьюдента с поправкой Бонферрони и Крускала–Уоллиса. Нор-

мальность распределения проверялась критерием Шапиро–Уилка. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Важнейшую роль в обеспечении противoinфекционного иммунитета и предупреждении развития гнойных осложнений играет ГИО. Формирующаяся клеточная память позволяет в короткие сроки при повторном контакте с бактериальным агентом элиминировать его из организма. В связи с этим первым этапом работы стала оценка влияния «Мезогеля» и «Купренила» на формирование ГИО у интактных животных и у крыс с экспериментальным СПБП.

У животных со СПБП супрессируется формирование ГИО, о чем свидетельству-

ет снижение иммунных АОК в селезенке животных со СПБП к 7 суткам эксперимента в 2 раза, а к 14 – в 3,2. Аналогичные изменения ГИО выявлены у крыс со СПБП при плацебо-контроле с физиологическим раствором. Внутривентриальное введение «Мезогеля» животным со СПБП не предотвратило развитие иммуносупрессии (табл. 2). «Купренил» у животных со СПБП при внутривентриальном введении (без или одновременно с физиологическим раствором в брюшную полость) нормализовал количество АОК к 14 суткам эксперимента. Использование внутривентриального вве-

дения «Купренила» совместно с физиологическим раствором при СПБП позволило к 7 суткам достоверно увеличить количество иммунных АОК в селезенке, а к 14 суткам – нормализовать данный показатель ГИО. Сочетанное внутривентриальное введение «Купренила» и внутривентриальное «Мезогеля» нормализовало иммунную реактивность на ЭБ к 14 суткам. Полной нормализации формирования ГИО, индуцированного ЭБ, удалось достичь на всех сроках исследования у животных со СПБП только при сочетанном внутривентриальном применении «Мезогеля» и «Купренила» (табл. 2).

Таблица 2

Формирование ГИО на ЭБ у крыс со СПБП после введения «Мезогеля» и «Купренила»

№ п/п	Группа животных	АОК	
		Сутки после моделирования СПБП	
		7	14
1	Здоровые	8,9 ± 0,21	
2	Моделирование СПБП	4,43 ± 0,11 ^{*1}	2,8 ± 0,09 ^{*1}
3	СПБП + физраствор в брюшную полость	3,91 ± 0,42 ^{*1}	2,91 ± 0,1 ^{*1}
4	СПБП + М	4,22 ± 0,23 ^{*1}	3,38 ± 0,12 ^{*1}
5	СПБП + К внутривентриально	4,47 ± 0,13 ^{*1}	8,72 ± 0,25 ^{*2-4}
6	СПБП + физраствор в брюшную полость + К внутривентриально	4,52 ± 0,22 ^{*1}	8,09 ± 0,24 ^{*2-4}
7	СПБП + физраствор и К в брюшную полость	6,1 ± 0,33 ^{*1-6}	8,31 ± 0,47 ^{*2-4}
8	СПБП+М+К внутривентриально	4,58 ± 0,31 ^{*1,7}	9,01 ± 0,53 ^{*2-4}
9	СПБП+М+К в брюшную полость	8,53 ± 0,97 ^{*2-8}	8,36 ± 0,68 ^{*2-4}

Примечание: здесь и в табл. 3: 1. * – $p < 0,05$; 2. – цифра рядом со звездочкой указывает на группу, по отношению к которой различия достоверны; 2. – $p < 0,05$ по сравнению с 7 сутками.

ГИО тесно связан с развитием реакции гиперчувствительности замедленного типа, однако, эти процессы отличаются по свойствам основных видов обуславливающих их клеток и цитокинов, которые эти клетки выделяют. Исходя из этого, следующей задачей стало изучение влияния «Мезогеля» и «Купренила» на формирование клеточной формы иммунной реактивности на ЭБ у здоровых животных и в условиях СПБП.

У животных со СПБП установлено угнетение формирования ГЗТ на 7, с последующей нормализацией на 14 день эксперимента. Внутривентриальное интраоперационное введение «Мезогеля» животным со СПБП достоверно еще больше снижало показатели ГЗТ на всех сроках наблюдения (табл. 3). Изолированное внутривентриальное введение «Купренила» (или совместно с внутривентриальным интраоперационным введением физиологического раствора) не влияло на сниженные показатели клеточной формы иммунитета к 7 суткам и нормализовало показатели РМ и РК к 14 дню наблюдения.

Локальное введение «Купренила» и физиологического раствора животным со СПБП нормализовало исследуемые показатели ГЗТ к 7 суткам эксперимента. Внутривентриальное введение «Купренила» в сочетании с аппликацией «Мезогеля» на брюшину при моделировании СПБП уменьшало супрессирующие эффекты последнего в отношении показателей ГЗТ на всех сроках наблюдения (достоверно больше к 14 суткам), однако не позволяло их полностью корригировать. Нормализация формирования ГЗТ наблюдалась только при внутривентриальном введении «Купренила» и «Мезогеля» у животных со СПБП (см. табл. 3).

Таким образом, развитие послеоперационного спаечного процесса в брюшной полости сопровождается угнетением формирования адаптивного иммунитета. При этом наиболее выраженная супрессия ГИО происходит к 14 суткам, а ГЗТ к 7 дню эксперимента. В основе вторичного иммунодефицита при моделировании СПБП, конечно, непосредственно лежит сама опе-

рационная травма. Разница во времени ингибирования развития ГИО и ГЗТ, по-видимому, объясняется отсутствием альтернативных механизмов активации ГИО. Без нормальной трехклеточной ассоциации (макрофаг или нейтрофил, Т-хелпер второго типа – В-клетка – плазмоцит) нет достаточного синтеза антител. Мобилизация пула нейтрофилов в зону асептическо-

го воспаления в брюшной полости к концу первой недели операционной травмы [4] уменьшает количество «свободных» антигенпредставляющих клеток и соответственно угнетает развитие ГИО, которое манифестирует к 14 дню. Клеточный иммунитет способен активироваться другими клетками, поэтому пик его угнетения более ранний.

Таблица 3

Развитие ГЗТ на ЭБ у крыс со СПБП после введения «Мезогеля» и «Купренила»

№ п/п	Группа животных	Сутки после моделирования СПБП			
		7		14	
		PM	PK	PM	PK
1	Здоровые	PM – 3,04 ± 0,12 PK – 1,98 ± 0,07			
2	Моделирование СПБП	2,12 ± 0,06* ¹	1,6 ± 0,03* ¹	2,98 ± 0,11	1,87 ± 0,11
3	СПБП + физраствор в брюшную полость	2,22 ± 0,09* ¹	1,54 ± 0,04* ¹	2,8 ± 0,14	1,91 ± 0,12
4	СПБП + М	1,09 ± 0,05* ¹⁻³	1,04 ± 0,04* ¹⁻³	1,98 ± 0,13* ¹⁻³	1,03 ± 0,11* ¹⁻³
5	СПБП + К внутрижелудочно	2,0 ± 0,13* ^{1,4}	1,58 ± 0,09* ^{1,4}	2,89 ± 0,13* ⁴	1,8 ± 0,11* ⁴
6	СПБП + физраствор в брюшную полость + К внутрижелудочно	2,11 ± 0,09* ^{1,4}	1,49 ± 0,08* ^{1,4}	2,76 ± 0,11* ⁴	1,79 ± 0,09* ⁴
7	СПБП + физраствор и К в брюшную полость	2,8 ± 0,14* ²⁻⁶	1,77 ± 0,1* ²⁻⁶	2,87 ± 0,17* ⁴	1,93 ± 0,14* ⁴
8	СПБП + М + К внутрижелудочно	2,02 ± 0,14* ^{1,4-7}	1,41 ± 0,12* ^{1,4-7}	2,34 ± 0,11* ¹⁻⁷	1,36 ± 0,09* ¹⁻⁷
9	СПБП + М + К в брюшную полость	3,01 ± 0,08* ^{2-6,8}	2,0 ± 0,05* ^{2-6,8}	3,1 ± 0,18* ^{4,8}	2,11 ± 0,13* ^{4,8}

Подтверждение наших данных об угнетении адаптивного иммунного ответа под влиянием «Мезогеля» при моделировании СПБП [2] можно объяснить коллоидно-осмотическими свойствами самого геля. Создавая вязкую субстанцию в брюшной полости, с одной стороны, он тормозит процесс диффузии биологически активных веществ, в том числе медиаторов воспаления и хемоаттрактантов, что приводит к нарушению нормального межклеточного взаимодействия, а с другой, создавая «барьер», он сам по себе препятствует межклеточному контакту.

Таким образом, нами подтверждены основополагающие моменты изменения адаптивного иммунитета при спайкообразовании в брюшной полости: супрессия ГИО, ГЗТ на ЭБ, усугубляющаяся при профилактическом введении «Мезогеля» [2]. Исходя из этого, следующим этапом стала попытка коррекции выявленных нарушений «Купренилом», который обладает не только иммуностропной активностью, но и способен влиять на регенераторные процессы в брюшной полости и увеличивать эффективность противоспаечной терапии [3].

Из литературных данных известно об иммуносупрессорных свойствах «Купренила»: подавление Т-хелперной функции лимфоцитов, торможение хемотаксиса ней-

трофилов [9]. Однако нами установлено, что в условиях иммуносупрессии, индуцированной СПБП и усугубляющейся применением «Мезогеля», «Купренил» способен частично восстанавливать нарушенную иммунную реактивность при внутрижелудочном введении и полностью нормализовать исследуемые показатели ГИО и ГЗТ при локальном внутрибрюшинном введении. Возможно в основе иммуномодулирующего влияния «Купренила» могут лежать два фактора: снижение активности асептического воспаления в брюшной полости за счет торможения процессов спайкообразования и вовлечения в процесс антигенпрезентирующих клеток – нейтрофилов и макрофагов, а также инверсия иммуносупрессирующих свойств препарата на стимулирующие при взаимодействии с модифицированными эритроцитами. Возможности такой инверсной иммуномодуляции, например, некоторыми антибиотиками обсуждаются в литературе [1]. В качестве модификаторов эритроцитов может выступать как сам спаечный процесс, так и применение «Мезогеля». Неодинаковая выраженность иммуномодулирующего эффекта «Купренила» при внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения препарата может объясняться различным соотношением конкурирующих

механизмов реализации супрессирующих и стимулирующих эффектов данного препарата в этих схемах лечения. Большая курсовая доза препарата при внутрижелудочном введении, по-видимому, за счет первичной иммуносупрессорной активности, не позволяет полностью реализоваться инверсной иммуностимуляции, которую мы наблюдали в части экспериментов с однократным внутрибрюшинным введением «Купренила».

Таким образом:

1. Включение в схему профилактики спаечного процесса брюшной полости «Купренила» позволяет предотвратить или уменьшить выраженность иммунодефицитного состояния при развитии спаечного процесса и применении «Мезогеля».

2. Наиболее эффективная стимуляция адаптивного иммунитета достигается при внутрибрюшинном применении «Купренила» в сочетании с «Мезогелем», фармакологические схемы с внутрижелудочным введением «Купренила» показали меньшую эффективность.

Список литературы.

1. Братчиков О.И. Иммунометаболическая активность фторхинолонов, иммобилизованных в клеточные носители при токсическом поражении почек в условиях стафилококковой инфекции // Урология. – 2009. – №2. – С. 13–18.
2. Гомон М.С. Динамические изменения иммунологической реактивности при моделированном спаечном про-

цессе в брюшной полости // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. XV, №1. – С. 35–37.

3. Коновалов А.К., Сергеев А.В. Современная методика лечения спаечной болезни у детей // Эндоскопическая хирургия. – 2006. – Т. 12, №2. – С. 61а–61.

4. Лазаренко В.А. Коррекция нарушений иммунитета при экспериментальном спаечном процессе брюшной полости с использованием дерината и лонгидазы // Человек и его здоровье. – 2010. – №3 – С. 37–43.

5. Станулис А.И. Иммуноферментная терапия в комплексном лечении больных со спаечной болезнью брюшины // Российский аллергологический журнал. – 2007. – №4. – С. 24–27.

6. Стрелков Н.С., Пчеловодова Т.Б., Шадрин Е.А. Влияние купренила на течение спаечного процесса: экспериментальное исследование // Материалы научно-практической конференции детских хирургов, ортопедов-травматологов, анестезиологов-реаниматологов. – Ижевск, 2008. – 176 с.

7. Федосеева В.Н. Руководство по иммунологическим и аллергологическим методам в гигиенических исследованиях. – М., 1993. – 319 с.

8. Фримель Г. Иммунологические методы. – М., 1987. – 472 с.

9. Rosada M. Effect of D-penicillamine on the T cell phenotype in scleroderma. Comparison between treated and untreated patients // Clin. Exp. Rheumatol. – 1993. – Vol. 11, №2. – P. 143–148.

Рецензент –

Снимщикова И.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой иммунологии и специализированных клинических дисциплин ГОУ ВПО «Орловский государственный университет», г. Орел.

Работа поступила в редакцию 27.10.2011.