



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97616** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61B 17/00
A61P 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 10717	(72) Винахідник(и): Гольцев Анатолій Миколайович (UA), Криворучко Ігор Андрійович (UA), Гольцев Кирило Анатолійович (UA), Останков Максим Вадимович (UA), Бондарович Микола Олександрович (UA), Останкова Людмила Василівна (UA), Ажгибесов Кирило Анатолійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.10.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2015, Бюл.№ 6	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ГОСТРОГО ГНІЙНОГО ПЕРИТОНІТУ

(57) Реферат:

Спосіб лікування гострого гнійного перитоніту передбачає використання препарату, що має антибактеріальну і протизапальну дію. Як такий препарат використовують кріоконсервовані клітини кордової крові людини.

UA 97616 U

Корисна модель належить до області експериментальної медицини і може бути використана в абдомінальній хірургії.

Традиційні способи лікування гострого гнійного перитоніту (ГГП) включають лапаротомію, усунення причин перитоніту і санацію черевної порожнини шляхом промивання перитоніальної порожнини такими рідинами як фурацилін, фізіологічний розчин, 5 %-ний розчин глюкози, перекис водню і четвертинні амонійні основи. При цьому, через низьку ефективність зазначених розчинів відносно патогенної мікрофлори, звичайно після санації проводять курс антибіотикотерапії [1].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб лікування ГГП [2], відповідно до якого після санації черевної порожнини самкам мишей лінії CD-1 у віці 4-6 тижнів внутрішньом'язово вводять антибіотик ампіцилін у дозі 150 мг/кг ваги тіла.

Недоліком зазначеного способу є високий ризик розвитку ускладнень (алергійні реакції, антибіотикасоційована діарея) і, як наслідок, висока летальність через токсичну дію антибіотика на нервову систему, нирки, печінку, шлунково-кишковий тракт, гемопоетичну систему.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб лікування ГГП, у якому б, за рахунок використання біологічно-активного препарату, забезпечувалася можливість зменшити ризик розвитку ускладнень і таким чином знизити летальність.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі лікування ГГП, який передбачає використання препарату, що має антибактеріальну й протизапальну дію, згідно з корисною моделлю, як такий препарат використовують кріоконсервовані клітини кордової крові людини (кКККЛ).

Дія кКККЛ, як і антибіотиків, спрямована на зниження бактеріальної інвазії і запальної реакції. Крім того, введення кКККЛ дозволяє мінімізувати ризик розвитку аутоімунної агресії провести корекцію в цілому систем забезпечення гомеостазу організму, тобто нейро-імунно-ендокринного блоку. Здатність кКККЛ відновлювати клітиноопосередкований імунітет дає можливість подолати його посттравматичний функціональний параліч.

Препарат кКККЛ не чинить токсичної дії на системи організму, тому не приводить до розвитку ускладнень. Його використання дозволяє знизити летальність на 11,7 % у порівнянні із застосуванням антибіотика.

Ефективність застосування кКККЛ досліджували на 91 щурі лінії Вістар 6-місячного віку масою 160-180 гр. ГГП моделювали у щурів під загальним тіопенталовим наркозом, провівши лапаротомію, ревізію черевної порожнини і аппендектомію. Перев'язаний червоподібний відросток укладали вільно в черевну порожнину (в області проекції серединної рани). Під час операції, при виконанні ревізії черевної порожнини, внутрішньочеревно вводили 3 мл фізіологічного розчину. Зашивали лапаротомну рану. Через 24 години оперованій тварині під ефірним наркозом проводили релапаротомію. Після зняття швів із очеревино-м'язових клаптів, що фіксували червоподібний відросток, його виявляли і видаляли. Санацію черевної порожнини здійснювали 0,02 % водним розчином фурациліну, охолодженим до температури 4-6 °С. Після промивання черевної порожнини промивну рідину евакуювали відсмоктувачем. Черевну стінку зашивали пошарово.

Із цільної кордової крові людини шляхом пасивної седиментації еритроцитів у градієнті щільності поліглюкіна одержували лейкоконцентрат, який відбирали в стерильні флакони і додавали цитратно-фосфатно-декстрозний розчин (антикоагулянт CPD). Потім лейкоконцентрат кордової крові піддавали кріоконсервуванню.

Щури були розділені на групи: 1 - інтактні щури (контроль, n=7); 2 - з індукцією ГГП (n=28); 3 - з ГГП і внутрішньом'язовою ін'єкцією ампіциліна (40 мг/кг маси тіла, n=28); 4 - з ГГП, внутрішньовенним введенням кКККЛ (в обсязі 0,3 мл - $5-6 \times 10^6$ клітин, n=28). Оцінку показників проводили шляхом виведення з експериментів 7 щурів з контрольної групи і по 7 щурів з кожної дослідної групи (2-4 групи) на 1, 3, 5 добу після релапаротомії, при цьому залишивши в дослідних групах по 7 щурів для визначення виживаності лікованих і нелікованих тварин з ГГП.

Оскільки клітинна ланка імунітету відображає характер протікання запального процесу при перитоніті, проводили оцінку фенотипії імункомпетентних клітин (ІКК). Субпопуляційний склад клітин селезінки визначали методом прямої мембранної імунофлуоресценції на проточному цитофлюориметрі (FACS Calibur (BD, США)) з використанням антищурячих Фітц-мічених моноклональних антитіл (МАТ) (BD, США) до CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD72, ІФН- γ , ІЛ-10. Статистичне обрахування даних, отриманих цитофлюориметричним аналізом, здійснювали за допомогою програми WinMDi 2.8. Визначення кількості лейкоцитів крові проводили в геманалізаторі (Abacus, Австрія).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стюдента-Фішера за допомогою програми Statistica 7.0, (Stat Soft Inc), адаптованої до поставлених завдань.

Діагностика імунних розладів має велике значення при лікуванні перитоніту, оскільки відображає ступінь імунodefіциту на початку захворювання, а також динаміку, спостережувану в процесі лікування. Проведені дослідження продемонстрували, що після індукції патології спостерігали явно виражені порушення стану загальних Т-лімфоцитів ($CD3^+$), концентрація яких на 5 добу після релапаротомії була в 5 разів нижче контролю. Концентрація $CD4^+$ -клітин у цей період знизилася приблизно в 6 разів, а $CD8$ клітин - в 22 рази. Це знайшло своє відображення в різкому збільшенні імунорегуляторного індексу ($IPI = CD4^+/CD8^+$), що майже в 5 разів перевищував контроль (табл. 1). Вміст Т-рег ($CD4^+CD25^+$)-клітин, відповідальних за пригнічення імунзапальних реакцій, було в 3 рази нижче контрольних значень ($p < 0,05$) (табл. 1). При розвитку ГПП, на тлі істотної інтоксикації, вміст популяції клітин природних кілерів (ПК, $CD16^+$ -клітини) був в 2,5 рази менший, ніж у контролі ($p < 0,05$) (табл. 1). Виявлені зміни вказують на стан імунodefіциту, викликаний розвитком патології. Знижений же вміст Т-рег клітин указує на нездатність організму протистояти імунзапальним реакціям.

Застосування антибіотиків у групі 3 трохи поліпшувало показник загальних Т-лімфоцитів ($CD3^+$) у щурів з ГПП, хоча цей показник залишався на стабільно більш низькому рівні в порівнянні з контролем (табл. 1). Вміст Т-рег також був вище, ніж у нелікованих тварин, про що свідчить наближення цього показника до значень контролю ($p < 0,5$). Такими ж змінами характеризувалися показники вмісту ПК і Т-рег (табл. 1). На 5 добу кількість регуляторних клітин Т-клітинної ланки знижувалося, що обумовлювало підвищення IPI (табл. 1).

Застосування кКККЛ під час релапаротомії у тварин групи 4 продемонструвало поліпшення показників загальних Т-лімфоцитів, субпопуляції Т-хелперів і Т-супресорів/цитотоксичних. Важливо, що найбільшою мірою наближався до контролю IPI . Подібним чином після такої терапії змінювалися показники ПК і Т-рег (табл. 1). Отримані дані вказують на те, що застосування кКККЛ перешкоджає виникненню імунodefіциту, підвищуючи протизапальний потенціал організму. Підвищення вмісту ІКК може лежати в основі антибактеріальних властивостей препарату.

Запальний цитокін ІФН- γ є регулятором функціонування субстратів клітинного й гуморального імунітету. ІФН- γ продукується Т-клітинами і ПК. Існує кореляція між стабільно високим рівнем ІФН- γ і летальністю. Як видно із представлених у табл. 2 даних, у тварин групи 2 кількість клітин-продуцентів цитокіну ІФН- γ вірогідно ($p < 0,001$) підвищувалося у щурів всіх досліджених груп. На 5 добу достовірне зниження даного показника до рівня контролю спостерігалось тільки у тварин групи 4, що доводить участь кКККЛ у зниженні запальних реакцій, індукованих розвитком перитоніту. При стандартному лікуванні антибіотиком рівень запального цитокіну у щурів групи 3 залишався підвищеним, але був нижче, ніж у нелікованих тварин групи 2 (табл. 2).

Інтерлейкін-10 (ІЛ-10) належить до цитокінів з яскраво вираженим протизапальним ефектом. Виробляють його Т-клітини і моноцити. Визначення вмісту клітин-продуцентів ІЛ-10 у щурів при розвитку ГПП виявило значне його зниження (табл. 2). У тварин, яких лікували тільки антибіотиком, був відзначений низький вміст ІЛ-10 $^+$ -клітин щодо контролю. Найбільш виражено показники вмісту ІЛ-10 $^+$ -клітин наближалися до контролю у щурів групи 4. (табл. 2). Виявлені зміни у вмісті клітин продуцентів протизапального й запального цитокінів можуть бути відображенням тих механізмів, через які реалізується протизапальний ефект кКККЛ.

Ступінь виразності лейкоцитозу, що є наслідком запалення, у щурів при розвитку ГПП і після лікування була різною (табл. 3). Так у нелікованих тварин групи 2 кількість лейкоцитів крові в 2 рази перевищувала контрольні показники. Застосування антибіотика приводило до зниження кількості лейкоцитів, однак, даний показник був вище контролю. У щурів групи 4 кількість лейкоцитів у крові знизилася й практично відповідала контролю (табл. 3).

У групі 3 тварин, яких лікували тільки антибіотиком, виживаність до 5 доби була в 1,7 разу вище, ніж у групі 2. Застосування кКККЛ із антибіотиком (група 4) забезпечувало виживаність у 50 % щурів (табл. 4). Таким чином, у групі 4 виживаність тварин, яких лікували кКККЛ із антибіотиком хоч і знижувалася, але залишалася на більш високому рівні у порівнянні з іншими групами, підкреслюючи істотну перевагу такого лікування не тільки в порівнянні з нелікованими тваринами, але і з тваринами, яких лікували тільки антибіотиком (група 3).

Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить про те, що виживаність тварин з ГПП чітко корелювала зі зміною концентрації ІКК, що визначає профіль запальних і протизапальних цитокінів організму. Максимально виражена кореляція цитокінів обох типів (ІФН- γ і ІЛ-10) при лікуванні тварин кКККЛ забезпечувало більш високу виживаність щурів ($50 \pm 3,5$ %), у порівнянні з такою у щурів, лікованих тільки одним антибіотиком ($32,5 \pm 2,1$ %).

Таблиця 1

Показники клітинної ланки імунітету у щурів з ГГП до і після лікування, %

Популяції і субпопуляції клітин (фенотипові характеристики)	Групи тварин									
	1	2			3			4		
		1 доба	3 доба	5 доба	1 доба	3 доба	5 доба	1 доба	3 доба	5 доба
CD3 ⁺ /загальні Т-лімфоцити	20,4±2,2	10,3±0,6 ^{1,3,4}	8,2±0,5 ^{1,3,4}	4,1±0,18 ^{1,3,4}	12,5±1,4 ^{1,2,4}	13,9±1,1 ^{1,2}	11,0±0,7 ^{1,2}	13,8±1,2 ^{1,2}	15,3±3 ^{1,2,3}	12,6±1,2 ^{1,2,3}
CD4 ⁺ /хелпери	16,7±0,9 ¹	18,7±0,4 ^{1,3,4}	6,8±0,3 ^{1,3,4}	2,9±0,2 ^{1,3,4,5}	10,1±0,85 ^{1,2,4}	8,9±0,4 ^{1,2}	6,1±0,3 ^{1,2}	12,0±1,0 ^{1,2,3}	11,2±1,2 ^{1,2,3}	8,9±1,1 ^{1,2,3}
CD8 ⁺ /супресори /ітотоксичні	8,8±1,5 ¹	2,2±0,12 ^{1,3,4}	1,0±0,08 ^{1,3,4}	0,4±0,03 ^{1,3,4}	3,65±0,7 ^{1,2,4}	3,9±0,2 ^{1,2,4}	1,4±0,2 ^{1,2,4}	4,8±0,2 ^{1,2,3}	7,2±1,6 ^{1,2,3}	4,7±0,3 ^{1,2,3}
CD72 ⁺ /В-лімфоцити	58,3±3,5	62,3±3,8 ^{3,4}	63,7±4,9 ^{1,3,4}	50,2±3,6 ^{1,3,4}	65,5±4,7 ⁴	65,3±3,9 ^{1,2,4}	63,8±3,8 ^{2,4}	64,7±1,3 ^{1,2,3}	64,3±1,3 ^{1,2,3}	65,0±1,0 ^{1,2,3}
CD16 ⁺ /ПК-клітини	12,5±0,9	26,1±3,2 ^{1,3,4}	10,1±2,8 ^{1,3,4}	4,9±0,26 ^{1,3,4}	18,0±2,1 ^{1,2,4}	13,7±0,9 ^{1,2,4}	8,4±0,5 ^{1,2,4}	17,0±1,0 ^{1,2,3}	13,7±0,5 ^{1,2}	8,9±0,1 ^{1,2}
IPI* CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,9±0,3	4,1±0,2 ^{1,2,3,4}	6,8±0,42 ^{1,3,4}	7,2±0,6 ^{1,3,4}	2,9±0,4 ^{1,2,4}	2,3±0,3 ^{1,2,4}	4,1±0,3 ^{1,2,4}	2,5±0,3 ^{1,2,3}	1,55±0,1 ^{1,2,3}	1,9±0,1 ^{2,3}
CD47 CD25 ⁺ Т-рег клітини	5,3±0,5	2,7±0,8 ^{1,3,4}	2,3±0,3 ^{1,3,4}	1,77±0,7 ^{1,3,4}	3,5±0,5 ^{1,2}	3,3±0,3 ^{1,2,4}	3,8±0,8 ^{1,2,4}	3,7±0,3 ^{1,2,3}	4,3±10,3 ^{1,2,3}	5,0±0,2 ^{1,2,3}

Примітки: * - IPI - імунорегуляторний індекс (відношення CD4⁺ до CD8⁺-клітин). Достовірні розходження (p < 0,05) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблиця 2

Показники вмісту цитокінів у щурів з ГГП до і після лікування, %

Клітини-продуценти цитокінів	Групи тварин									
	1	2			3			4		
		1 доба	3 доба	5 доба	1 доба	3 доба	5 доба	1 доба	3 доба	5 доба
ІФН-γ ⁺ -клітини	8,89±0,4	22,16±2,1 ^{1,3,4}	22,34±2,3 ^{1,4}	17,80±1,0 ^{1,3,4}	18,42±1,4 ^{1,2}	20,92±1,9 ^{1,4,5}	14,17±0,8 ^{1,2,4,5}	17,98±1,9 ^{1,2}	15,84±1,4 ^{1,2,3}	11,75±1,7 ^{1,2,3}
ІЛ-10 ⁺ -клітини	3,7±0,4	1,49±0,2 ^{1,3}	1,40±0,4 ¹	1,70±0,3 ^{1,3}	2,0±0,2 ^{1,2}	1,50±0,5 ¹	2,20±0,2 ¹	2,0±0,2 ^{1,2}	2,20±1,2 ^{1,2,3}	2,60±0,3 ^{1,2}

Примітки: Достовірні розходження (p < 0,05) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблиця 3

Вміст лейкоцитів у щурів з ГГП до і після лікування, x10⁶ кл/мл

Група тварин	Строк після релапаратомії (доба)		
	1-а	3-я	5-а
Інтакт	5,0±0,6	5,0±0,6	5,0±0,6
ГГП	9±0,7 ^{1,3,4}	27,9±1,9 ^{1,3,4}	10,6±1,9 ^{1,3,4,5}
ГГП + антибіотик	6,9±0,4 ^{1,2}	20,2±1,8 ^{1,2,4}	6,9±0,7 ^{1,2}
ГГП + кордова кров	7±0,5 ^{1,2}	16,2±1,4 ^{1,2,3}	6±0,3 ^{1,2}

Примітки: Достовірні розходження (p < 0,05) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблица 4

Вживаність щурів з ГГЕ до і після лікування, %

Група тварин	Строк після релапаратомії		
	1 доба	3 доба	5 доба
ГГП	100	45,0±2,9	19,2±1,2
ГГП + антибіотик	100	55,0±3,6*	32,5±2,1*
ГГП + кордова кров	100	66,7±4,2*#	50±3,5*#

Примітки: Достовірні розходження ($p < 0,05$) у порівнянні з показником: * - групи 2; # - групи 3 у відповідний термін.

Джерела інформації:

- 5 1. Шалимов А.А., Шапошников В.И., Пинчук М.П. Острый перитонит. Киев: Наукова Думка, 1981. - С. 124-128.
2. Chenoweth C.E., Robinson K.A., Schaberg D.R. Efficacy of ampicillin versus trimethoprim-sulfamethoxazole in a mouse model of lethal enterococcal peritonitis // Antimicrob Agents Chemother. - 1990. - Vol. 34, № 9. - P. 1800-1802.
- 10 3. Цуцаева А.А. Грищенко В.И., Прокопюк О.С. и соавт. Заготовка, криоконсервирование и клиническое применение гемопоэтических клеток кордовой крови человека // Методические рекомендации - Харьков, 2000г., 18 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Спосіб лікування гострого гнійного перитоніту, який передбачає використання препарату, що має антибактеріальну і протизапальну дію, який **відрізняється** тим, що як такий препарат використовують кріоконсервовані клітини кордової крові людини.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601