

Опыт применения ткани криоконсервированного плодового тимуса в лечении послеродовых инфекционных заболеваний

В.И. Грищенко¹, Н.Н.Аветисян²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

²Харьковский государственный медицинский университет

Experience of Cryopreserved Fetal Thymus Application When Treating Puerperal Infections

GRISCHENKO V.I.¹, AVETISYAN N.N.²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Kharkov State Medical University

Результаты исследований свидетельствуют о высокой эффективности гетеротопической трансплантации ткани криоконсервированного fetal тимуса человека, которая повышает иммунологические возможности организма и является действенным средством борьбы с послеродовыми инфекциями.

Ключевые слова: криоконсервирование, fetal тимус, родильница.

Результаты досліджень свідчать про високу ефективність гетеротопічної трансплантації тканини криоконсервованого fetal тимуса людини, яка підвищує імунологічні можливості організму і є дійвим засобом боротьби з післяпологовими інфекціями.

Ключові слова: криоконсервування, fetal тимус, породілля.

Investigation results testify to high efficacy of heterotopic transplantation of cryopreserved human fetal thymus tissues, which increases an organism's immunological possibilities and is an active way for postoperative infections treatment.

Key words: cryopreservation, fetal thymus, puerperae.

Лечение послеродовых инфекционных заболеваний является одной из актуальных проблем в современном акушерстве. Наиболее частой формой послеродовой инфекции является послеродовой эндометрит, частота которого составляет от 36,3 до 59% всех послеродовых инфекций (после нормальных родов – 0,5-10,9%, после патологических – 8-20%). Это связано с появлением высоковирулентных антибиотико-резистентных госпитальных штаммов микроорганизмов и резким снижением иммунологической резистентности организма женщин, которые обусловлены стрессом на фоне родов, неблагоприятными экономическими и экологическими условиями.

В последнее время в связи с изменениями экологической структуры заболевания и широким распространением микроорганизмов, устойчивых к действию β-лактамов антибиотиков, значительно снизилась эффективность аминогликозидов, цефалоспоринов в терапии послеродовой инфекции [1,4,5]. В связи с этим необходим более эффективный подход в лечении послеродовых инфекционных заболеваний.

Treatment of puerperal infections is known to be one of the up-to-date problems in current obstetrics. Puerperal endometritis, which rate makes 36.3 to 59% among all the puerperal infections (followed normal labor it is 0.5-10.9%, after pathological labor is 18-20%) is considered as the most frequent form of puerperal infection. This is related to the appearance of highly virulent antibiotic-resistant hospital microorganism strains and sharp decrease of women's organism immunological resistance, resulted from a labor stress, unfavourable economical and ecological conditions.

Recently the efficacy of aminoglycosides, cephalosporins in the therapy of puerperal infection [1, 4, 5] has significantly decreased because of the changes in ecological structure of the disease and wide spreading of the microorganisms resistant to the effect of β-lactamic antibiotics. In this connection the more efficient approach is essential when treating puerperal infectious diseases. Nowadays as a result of cryobiology and cryomedicine development we have got an opportunity of the preparing and long-term storage of cells and tissues in cryobank without the

Адрес для корреспонденции: Грищенко В.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7724143, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Grischenko V.I. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7724143, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

В настоящее время в результате развития криобиологии и криомедицины появилась возможность заготавливать и длительно хранить в криобанке клетки и ткани без изменения их биологической и функциональной структуры для дальнейшей трансплантации [2,3]. Опыт низкотемпературного консервирования ряда биологических объектов (клетки крови, щитовидная железа, плацента, яичники) открывает определенные перспективы использования ткани такого биологически активного органа, как ткань криоконсервированного плодового тимуса [5]. Вилочковая железа, как известно, играет важную роль в обеспечении высокого уровня сопротивляемости организма, его иммунитета, а последний при послеродовой инфекции обычно снижен.

Цель работы – анализ эффективности применения трансплантации ткани криоконсервированного плодового тимуса в комплексном лечении послеродовых инфекционных заболеваний родильниц.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 92 родильницы. При распределении родильниц на группы использовали принцип рандомизации, что обеспечивало достоверность полученных результатов. В I (контрольную) группу вошли 30 здоровых родильниц с физиологическим течением послеродового периода. Клиническую группу II составили 62 родильницы, у которых течение пуэперии осложнилось послеродовым эндометритом. Во IIА группу вошли 30 родильниц с послеродовым эндометритом, получавших общепринятую терапию с применением антибиотиков при учете чувствительности микрофлоры; дезинтоксикационной инфузионно-трансфузионной терапии, направленной на коррекцию общей циркулирующей крови ОЦК, водно-электролитного и кислотно-щелочного баланса; десенсибилизирующей и антикоагулянтной терапии; проточного дренирования полости матки с применением антисептических растворов. Во IIБ группу вошли 32 родильницы с послеродовым эндометритом, которым наряду с традиционным лечением проводилась гетеротопическая трансплантация криоконсервированной ткани фетального тимуса человека. Для этого в верхненаружном ягодичном квадранте под местной анестезией производился разрез кожи до 3 см с образованием подкожного “кармана” за счет частичной отсепаровки тканей. Ткань криоконсервированного плодового тимуса вводили в образованный “карман”, фиксировали. На кожу накладывали швы, асептическую повязку.

В комплекс диагностических мероприятий вошли клиническое наблюдение, общеклинические методы исследования: ультразвуковое

change in their biological and functional structure with the aim of further transplantation [2, 3]. An experience of low temperature preservation for the series of biological objects (blood cells, thyroid gland, placenta, ovaries) represents the certain perspectives for the use of such a biological organ as tissue of cryopreserved fetal thymus [5]. Thymus is known to play an important role in providing a high level of an organism resistance, its immunity, actually, the latter is usually reduced.

Analysis of the efficacy of cryopreserved fetal tissue transplantation in puerperae in complex treatment of puerperal infectious diseases was the aim of the work.

Materials and methods

Ninety two puerperae were under observation. When dividing the patients into groups we used the principle of randomization to provide significance of the results obtained. The group I consisted of 30 healthy women with physiological course of puerperal period. Clinical group II comprised 62 women with the puerperal period complicated by puerperal endometritis. Group IIA was composed of 30 women with puerperal endometritis who were subjected to commonly used therapy with antibiotics when taking in account the quadrant sensitivity of microflora; desensitizing infusive-transfusive therapy directed to the correction of total blood circulation, aqueous-electrolytic and acidic-alkaline balance, desensitizing and anti-coagulative therapy, flow draining of uterus cavity with antiseptic solutions. The group II B was composed of 32 puerperae with puerperal endometritis, those were subjected to heterotopic transplantation of cryopreserved tissue of human fetal thymus combined with traditional treatment. With this aim the skin dissection up to 3 cm was performed to an upper outer buttock site under local anesthesia with forming a subcutaneous “pocket” due to partial tissue separation. Cryopreserved fetal thymus tissue was injected into the “pocket” formed and fixed. Sutures and aseptic dressing were put onto a skin.

Clinical observation, general clinical examination such as ultrasonic transabdominal scanning, immunological and biochemical testing, coagulogram, microbiological (bacteriological and bacterioscopic testing for lochia, histological testing of the tissues obtained during vacuum aspiration and curettage of uterus cavity were performed as a complex of diagnostic measures. For immune system examination there was determined the relative and absolute number of peripheral blood lymphocytes, the content of T-B-lymphocytes, sub-population of T-helpers and T-suppressors was determined in immune-fluorescent test using monoclonal anti-

трансабдоминальное сканирование, иммунологическое и биохимическое исследование, коагулограмма, микробиологическое (бактериологическое и бактериоскопическое) исследование лохий, гистологическое изучение тканей, полученных при вакуум-аспирации и кюретаже полости матки. Для оценки иммунной системы определяли относительное и абсолютное количество лимфоцитов периферической крови, исследовали содержание Т-В-лимфоцитов, субпопуляции Т-хелперов и Т-супрессоров в иммунофлюоресцентном тесте с помощью монолокальных антител (МА) [5]. Использовали МА ООО "Сорбент" (Россия) для идентификации лимфоцитов с фенотипом CD3⁺ (тотальная популяция Т-клеток; CD4⁺ (Т-хелперы); CD8⁺ (Т-супрессоры); CD22⁺ (В-лимфоциты); вычисляли иммунорегуляторный индекс CD4/CD8.

Для оценки функционального состояния В-лимфоцитов и состояния системного гуморального иммунитета определяли содержание иммуноглобулинов (Ig) классов А, М, G в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии (G. Mancini et al., 1965).

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью компьютера IBM PC Pentium 100 с применением прикладных статистических программ, рассчитанных на обработку медико-биологической информации. Для анализа параметрических показателей использовали вычисление их средних величин и коэффициента Стьюдента, результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении иммунологических показателей у родильниц с послеродовым эндометритом обращало на себя внимание значительное снижение как относительного, так и абсолютного числа лимфоцитов (19,7±0,65)% и (1,12±0,05)×10⁹/л по отношению к контрольной группе (26,3±0,7)% и (1,94±0,02)×10⁹/л ($p < 0,05$). Общее количество Т-лимфоцитов у родильниц основной клинической группы по отношению к контролю также было снижено и составляло (43,2±0,2)% или (0,84±0,01)×10⁹/л при норме (52,4±0,3)% или (1,04±0,08)×10⁹/л, что свидетельствовало об угнетении Т-клеточного звена иммунитета. В процессе исследования было установлено статистически достоверное снижение количества В-лимфоцитов (16,9±0,04)% или (0,34±0,08)×10⁹/л. О наличии иммунологической недостаточности по вторичному супрессорному варианту свидетельствовало снижение иммунорегуляторного индекса $T_{\text{хелп}}/T_{\text{супр}}$ (1,1±0,04).

При исследовании показателей гуморального иммунитета у родильниц с хроническим метро-

bodies (МА) [5]. The MA produced by Sorbent Ltd. (Russia) was used for lymphocytes identification with CD3⁺ phenotype (total T-cell population); CD4⁺ (T-helpers); CD8⁺ (T-suppressors); CD22⁺ (B-lymphocytes); as well as we evaluated CD4/CD8 immunoregulatory index.

To evaluate the functional state of B-lymphocytes and systemic humoral immunity there was determined the state of A, M, G immunoglobulin classes (Ig) in blood serum by the method of radial immune diffusion (G. Mancini et al., 1965).

Statistical analysis of the data obtained was accomplished by IBM PC Pentium 100 computer using the applied statistical programs intended for the processing of medical and biological information. Evaluation of the mean values and Student's coefficient were used for the analysis of parametric indices, the results were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

When studying immunological indices in women with puerperal endometritis we noticed a significant decrease of both relative and absolute lymphocytes number (19.7±0.65)% and (1.12±0.05)×10⁹/l in respect of the control group (26.3±0.7)% and (1.94±0.02)×10⁹/l ($p < 0.05$). Total number of T-lymphocytes in puerperae of the main clinical group in respect of the control was also decreased and made (43.2±0.2)% or (0.84±0.01)×10⁹ with the norm of (52.4±0.3)% or (1.04±0.08)×10⁹/l that testified to the suppression of T-cellular immunity. Studying of the process revealed statistically significant number of B-lymphocytes (16.9±0.04)% or (0.34±0.08)×10⁹/l.

Decrease of immune regulatory complex $T_{\text{help}}/T_{\text{supr}}$ (1.1±0.04) testified to the presence of immunological insufficiency on a secondary suppressory variant.

When studying humoral immunity indices in puerperae with chronic metroendometritis there was noted a statistically significant Ig fall down to 12.4±0.8 g/l with the indices of 15.1±0.08 g/l in the control group. Ig G is known to be responsible for the formation of anti-infectious humoral immunity.

In 54 puerperae (87.2%) of clinical group II there was noted a significant reduction of the concentration of serum class M immunoglobulins (0.54±0.03) g/l ($p < 0.05$), that testified to the deficit of immune response to an antigen stimulation. When studying the clinically manifested severe endometritis in 18 puerperae (29.4%) the decrease of class A immunoglobulins was observed.

In women of clinical group II a significant increase of the uterus cavity and cervix dissemination with pseudo-pathogenic microorganisms strains comparing to healthy puerperae was noted, that testified to a decreased elimination capability; the strains

эндометритом было отмечено статистически достоверное снижение Ig G до $12,4 \pm 0,8$ г/л при показателях в группе контроля $15,1 \pm 0,08$ г/л. Известно, что Ig G ответственный за формирование противoinфекционного гуморального иммунитета.

У 54 (87,2%) родильниц II клинической группы отмечалось достоверное снижение концентрации сывороточных иммуноглобулинов класса M ($0,54 \pm 0,03$) г/л ($p < 0,05$), что свидетельствовало о недостаточности иммунного ответа на антигенную стимуляцию. При клинически выраженном тяжелом течении эндометрита у 18 (29,4%) родильниц наблюдалось снижение иммуноглобулина класса A.

У родильниц II клинической группы было отмечено существенное увеличение осеменения полости матки и цервикального канала штаммами условно-патогенных микроорганизмов в сравнении со здоровыми родильницами, что свидетельствовало о сниженной элиминационной способности, причем были выделены штаммы, устойчивые к большинству антибиотиков. Согласно результатам нашего исследования ведущее место в этиологии послеродового эндометрита принадлежит условно-патогенной микрофлоре, которая представлена в виде ассоциации анаэробов (34,2%) и аэробов (65,8%). При оценке результатов исследования выявлен высокий уровень урогенитального инфицирования: бактериурия – у 27,6, гестационного пиелонефрита – у 18,2, кольпита – у 37,6, бактериального вагиноза – у 24,2% женщин.

Под влиянием традиционной терапии у родильниц IIА группы отмечалась тенденция к нормализации показателей клеточного и гуморального иммунитета, однако, полноценного восстановления их в период клинического выздоровления не наблюдалось.

У больных IIБ группы с использованием гетеротопической трансплантации ткани фетального тимуса человека наблюдались более быстрая (в среднем на $5,4 \pm 0,2$ дня) ликвидация как общих, так и местных признаков воспаления (нормализация общего количества лейкоцитов, лейкоцитарной формулы, СОЭ), а также ускорение процессов заживления и очищения инфицированной раны.

Клиническое выздоровление у родильниц, которых лечили с применением фетальной терапии, в целом наблюдалось на $3,8 \pm 0,6$ дня раньше, чем в группе сравнения.

Во IIБ группе родильниц увеличение уровня CD4⁺ свидетельствовало о восстановлении хелперной активности и нормализации иммунорегуляторного индекса, который после лечения составил $1,52 \pm 0,04$ ($p < 0,05$). При этом изменение

resistant to the most of antibiotics. According to the investigation results the leading place in etiology of puerperal endometritis belongs to pseudo-pathogenic microflora represented as anaerobic (34.2%) and aerobic (65.8%) association. When evaluating the testing results there was revealed a high level of urogenital infecting: bacteriuria in 27.6% of women, gestational pyelonephritis in 18.2%, colpitis in 37.6%, bacterial vaginosis in 24.2% of patients.

Under the effect of traditional therapy in puerperae of II A group there was a tendency to normalization of cellular and humoral immunity indices, although no full recovery was noted during the period of their clinical recuperation.

In the patients of group II B subjected to heterotopic transplantation of human fetal thymus tissue there was observed the more rapid liquidation (in average 5.4 ± 0.2 days) of general and local inflammation signs (normalization of total leukocytes number, differential blood count, erythrocyte sedimentation) as well as acceleration of recovering processes and purification of the wound infected.

Clinical recovery in the puerperae treated with fetal therapy was noted in the whole by 3.8 ± 0.6 days prior to the group of comparing.

In the 2nd group B puerperae the rise of CD4⁺ level testified to helpers' activity recovery and normalization of immune-regulatory index, which made 1.52 ± 0.04 ($p < 0.05$) following the treatment. In this case the change of immune-regulatory index in women of the 2nd group A was not statistically significant.

Normalization of IgG index which made 14.0 ± 0.2 g/l following the treatment, testified to an increase of the level of anti-infectious immunity in puerperae.

In women of the 2nd A group the rise of Ig G was also noted, although it was less manifested (12.8 ± 0.7 g/l). Similar picture was also observed as for the other classes of serum immunoglobulins.

Shortening of the term of staying at the hospital for puerperae of the 2nd group B confirmed the positive effect of heterotopic transplantation of fetal thymus tissue. An average in-patient day in this group made 10.6 ± 0.4 that was significantly lower ($p < 0.05$) if compare to the patients of the comparing group (14.1 ± 0.3).

It should be noted that the maintaining in an organism tissue of the pool of main metabolic substances, transplant's capability to stimulate the formation of certain cells, to accept neurohumoral signals and their further transfer inside the cells is the guarantee for successful functioning of biologically active transplant, as well as thymus in an organism.

Neurohumoral regulation is essential for maintenance of thymus tissue functional activity, as the main regulating effect is provided by

иммунорегуляторного индекса у родильниц ПА группы не было статистически достоверным.

О повышении уровня противоинфекционного иммунитета у родильниц, лечившихся с применением фетальной терапии, свидетельствовала нормализация показателя IgG, который после лечения составил $14,0 \pm 0,2$ г/л.

У родильниц ПА группы также отмечалось повышение Ig G, однако менее выраженное ($12,8 \pm 0,7$ г/л). Аналогичная картина наблюдалась и в отношении других классов сывороточных иммуноглобулинов.

Отражением положительного влияния гетеротопической трансплантации ткани фетального тимуса на клиническое течение послеродового эндометрита было сокращение срока пребывания в стационаре родильниц группы ПБ. Средний койко-день у них равнялся $10,6 \pm 0,4$, что достоверно меньше ($p < 0,05$), чем у родильниц группы сравнения ($14,1 \pm 0,3$).

Необходимо отметить, что залогом успешного функционирования биологически активного трансплантата, в том числе тимуса, в организме является сохранение в его ткани основных метаболитических веществ, способность трансплантата к стимуляции образования соответствующих клеток и секреции биологически активных веществ, а также восприятия нейрогуморальных сигналов и последующей их передачи внутрь клеток.

Нейрогуморальная регуляция важна для поддержания функциональной активности ткани тимуса, поскольку основное регулирующее влияние на него оказывают циркулирующее в крови биологически активные субстанции.

Благодаря сигналам, поступающим в клетку с помощью этих соединений, в трансплантате поддерживаются на определенном уровне активность метаболитических процессов, а также его специфические функции [5,8].

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности гетеротопической трансплантации ткани криоконсервированного фетального тимуса человека, которая повышает иммунологические возможности организма и является действенным средством борьбы с послеродовыми инфекциями.

Выводы

Таким образом, послеродовые эндометриты являются наиболее частой формой послеродовой инфекции, возникающей на фоне мочепоолового инфицирования в период беременности. Изменение экологической структуры заболевания и широкое распространение микроорганизмов, устойчивых к действию β -лактамовых антибиотиков, обуславливает необходимость поиска

биологически активных веществ циркулирующих в крови. Due to the signals accepted by cell from those compounds the activity of metabolic processes in a transplant, as well as its specific functions are maintained at a certain level [5, 8].

The results obtained testify to a high efficiency of heterotopic transplantation of cryopreserved human fetal tissue, which increases immunological possibilities of an organism and is an effective method for puerperal infections treatment.

Conclusions

Thus, puerperal endometritis is the most frequent form of puerperal infection appeared at the background of urogenital infectioning during pregnancy. The change in the disease ecological structure and spreading of microorganisms resistant to the effect of β -lactamic antibiotics stipulates the necessity to search for the novel, highly efficient treatment methods.

Combination of the traditional treatment of puerperal endometritis with heterotopic tissue transplantation of human fetal thymus allows to affect perfectly the immunological status of patients to achieve more rapid recovery and shortening of hospitalization period in average by 5.4 ± 0.7 days.

References

1. Goltsev A.N., Grischenko O.V., Kushnirenko N.N., Ostapenko E.V. Pathophysiological bases for the change of an organism immune reactivity after the introduction of fetoplacental complex products // Vestnik problem biologii i mediciny.– 1997.– N10, P. 95-106.
2. Grinevich Yu.A. Immunobiology of thymus hormones.– Kiev:Zdorovya.– 1989.– 151 p.
3. Grischenko V.I., Pankov E.Ya., Oboznaya E.I. Qualitative renewal of cell characteristics following cryopreservation // Uspekhi sovremennoy biologii.– 1989.– V.108.– Issue 215.– P. 299-309.
4. Grischenko V.I., Chujko V.A., Pushkar N.S. Cell and tissue cryopreservation of endocrinic organs.– Kiev: Naukova dumka, 1993.– 241 p.
5. Frolov V.M., Peresadin N.A., Kozakov S.E. Use of "immunological compass" for immune disorders diagnostics // Klinicheskaya Lab. Diagnostika.– 1994.– N1.– P. 10-13.
6. American College of Obstetricians and Gynecologist. Antimicrobial therapy for obstetric patients // ACOG Technical Bulletin.– 1998.– 117 p.
7. Gilstap I.C., Cunningham F.G. The bacterial pathogenesis of infection following cesarian section // Obstet. Gynecol.– 1989.– P. 543-545.
8. Stilver H.G., Forvard K.R., Livingston R.A. et al. Multicenter comparison of cefoxitin versus cefozolin for prevention of infections morbidity after nonelective cesarean section // Obstet. Gynecol.– 1983.– № 5.– P. 145-148.

Accepted in 28.01.2003

новых, высокоэффективных методов лечения.

Сочетание традиционных методов лечения послеродового эндометрита с гетеротопической трансплантацией ткани фетального тимуса человека позволяет более полноценно воздействовать на иммунологический статус пациенток, добиться скорейшего выздоровления и сокращения сроков госпитализации в среднем на $5,4 \pm 0,7$ дня.

Литература

1. Гольцев А.Н., Грищенко О.В., Кушниренко Н.Н., Остапенко Е.В. Патофизиологические основы изменения иммунореактивности организма после введения продуктов фетоплацентарного комплекса // Вестник пробл. биологии и медицины.– 1997.– № 10.– С. 95-106.
2. Гриневич Ю.А. Иммунобиология гормонов тимуса.– Киев: Здоров'я, 1989.– 151 с.
3. Грищенко В.И., Панков Е.Я., Обозная Э.Ю. Качественное обновление свойств клеток после криоконсервации // Успехи современной биологии.– 1989.– Т. 108.– Вып. 215.– С. 299-309.
4. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук. думка, 1993.– 241 с.
5. Фролов В.М., Пересадин Н.А., Козаков С.Е. Использование "иммунологического компаса" для диагностики иммунных нарушений // Клин. лаб. диагностика.– 1994.– № 1.– С. 10-13.
6. American College of Obstetricians and Gynecologist. Antimicrobial therapy for obstetric patients // ACOG Technical Bulletin.– 1998.– 117 p.
7. Gilstrap I.C., Cunningham F.G. The bacterial pathogenesis of infection following cesarian section // Obstet. Gynecol.– 1989.– P. 543-545.
8. Stilver H.G., Forvard K.R., Livingston R.A. et al. Multicenter comparision of cefoxitin versus cefozolin for prevention of infections morbiliti after nonelective cesarean section // Obstet. Gynecol.– 1983.– № 5.– P. 145-148.

Поступила 28.01.2003