

**Abstract**

**O. O. Chuhay,**  
*Danylo Halatsky Lviv National  
Medical University*

**INFLUENCE OF KORVITYN ON IMMUNE RESPONSE  
INDICES IN EXPERIMENTAL PNEUMONIA DEVELOPMENT**

**Introduction.** Despite all attempts of doctors, pneumonia remains a common medical and social problem in the 21<sup>st</sup> century both in developing and developed countries. According to WHO, pneumonia is an acute, usually, infectious disease predominantly of the respiratory part of the lungs / respiratory bronchioles and alveoli / with the presence of exudate with neutrophil content in the alveoli and is seen on X-ray as infiltrative darkening of the lungs. Currently, bioflavonoids are often used as an accompanying therapy to correct disturbances, induced by long-lasting inflammatory process. There are over 150 such biologically active substances with similar properties. Flavonoids possess antioxidant, membrane-protective, angioprotective, anti-inflammatory, immunomodulating properties, etc. Quercetin has the most powerful antioxidant action among flavonoid substances.

**Purpose:** to investigate the influence of korvityn on indices of cell-mediated and humoral immunity in experimental pneumonia development.

**Materials and Methods.** Experimental investigation was performed on 30 guinea pigs (males) weighing 180–220 g, distributed into 5 groups, 6 animals in each: I group – intact guinea pigs (control); II group – guinea pigs with experimental pneumonia on the 6<sup>th</sup> day; III group – guinea pigs with experimental pneumonia on the 10<sup>th</sup> day; IV group – guinea pigs with experimental pneumonia on the 20<sup>th</sup> day; V group – guinea pigs with experimental pneumonia under the action of korvityn. This antioxidant was injected in the dose 40 mg/kg intraperitoneally for 7 days (from 13 to 20 day). Experimental pneumonia was induced by intranasal introduction of *Staphylococcus aureus* culture to animals by the method of V. N. Shlyapnikov and co-authors. The animals were decapitated on the 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> day of EP development. Amount of T- and B-lymphocytes (CD3+ and CD19+) in the blood was determined by the method of E. F. Chernushenko, L. S. Kogosova. The level of circulating immune complexes was determined by the method of V. Haskova, J. Kaslik.

**Discussion.** Both early and late periods of EP were characterized by the disturbance of immune system functioning. Experimental pneumonia in guinea pigs was accompanied by inhibition of cell-mediated immunity, which was marked by the decrease in T-lymphocyte level in the blood. Simultaneously, activation of humoral immunity was observed, marked by increase in B-lymphocytes and CIC in the blood in early and late periods of EP. This condition may be caused by the nature of the agent itself. Since EP in guinea pigs was caused by *Staphylococcus aureus*, which is a gram-positive bacterium, activation of humoral immunity plays a significant role in combating this infection. Medication «Korvityn» prevented further development of immune

system imbalance, limiting inflammatory reaction. This effect may be caused by anti-inflammatory and immunomodulating properties of Korvityn, which may be recommended as an accompanying therapy in pneumonia.

**Keywords:** pneumonia, Korvityn, humoral immunity, cell-mediated immunity.

**Corresponding author:** [olhachuhay1@gmail.com](mailto:olhachuhay1@gmail.com)

## Резюме

О. О. Чугай,

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

## ВПЛИВ КОРВІТИНУ НА ПОКАЗНИКИ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ЗА УМОВИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПНЕВМОНІЇ

**Мета.** вивчення впливу Корвітину на показники клітинного та гуморального імунітету за умови розвитку експериментальної пневмонії (ЕП).

**Матеріали та методи.** Дослідження проводились на 30 морських свинках, поділених на 5 груп: I група – інтактні (контроль); морські свинки з експериментальною пневмонією на 6-ту добу (II група); 10-ту добу (III група) та 20-ту добу (IV група). V група – морські свинки кореговані «Корвітином», який вводили дозою 40 мг/кг внутрішньоочередовно впродовж 7 діб (з 13 по 20 добу). Відтворювали ЕП шляхом інтраназального введення тваринам культури *Staphylococcus aureus*. Тварин декапітували на 6-ту, 10-ту та 20-ту доби розвитку ЕП. У крові визначали рівні Т і В лімфоцитів і циркулюючих імунних комплексів.

**Результати.** У морських свинок з ЕП на 6-ту та 10 доби виявили зниження рівня Т-лімфоцитів, відповідно, на 1,8 % і 11,74 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними тваринами. У вказані періоди спостерігали, вірогідне підвищення рівня В-лімфоцитів, відповідно, на 19,45 % і 25 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою. Щодо вмісту ЦК, то на 6 добу виявили підвищення їх рівня на 13,68 % ( $p < 0,05$ ), а на 10 добу - рівень не змінювався порівняно з контрольною групою.

На 20 добу визначили подальше зниження рівня Т-лімфоцитів на 18,6 % ( $p < 0,05$ ), також зростання В-лімфоцитів і ЦК, відповідно, на 43,65 % та 29,8 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з групою контролю.

Введення Корвітину сприяло підвищенню рівня Т-лімфоцитів на 39,29 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з некорегованими тваринами. Водночас, показники гуморального імунітету знижувалися: В-лімфоцити на 17,54 % ( $p < 0,05$ ), ЦК на 26,34 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з тваринами без корегування.

**Висновки.** Препарат «Корвітин» попереджував розвиток дисбалансу імунної системи, обмежуючи запальну відповідь, що дозволяє рекомендувати його як терапія супроводу при пневмонії.

**Ключові слова:** пневмонія, Корвітин, гуморальний імунітет, клітинний імунітет.



**Резюме****О. А. Чугай,**

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

**ВЛИЯНИЕ КОРВИТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИМУННОГО ОТВЕТА ПРИ УСЛОВИИ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ**

**Цель.** Изучение влияния Корвитина на показатели клеточного и гуморального иммунитета при условии развития экспериментальной пневмонии (ЭП).

**Материалы и методы.** Исследования проводились на 30 морских свинках, разделенных на 5 групп: I группа – интактные (контроль); морские свинки с экспериментальной пневмонией на 6-е сутки (II группа); 10-е сутки (III группа) и 20-е сутки (IV группа). V группа – морские свинки под коррекцией Корвитином, который вводили в дозе 40 мг/кг внутривентриально в течение 7 суток (с 13 по 20 сутки). Воспроизводили ЭП путем интраназального введения животным культуры *Staphylococcus aureus*. Животных декапитировали на 6-е, 10-е и 20-е сутки развития ЭП. В крови определяли уровни Т и В лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов.

**Результаты.** В морских свинок с ЭП на 6-е и 10-е сутки обнаружили снижение уровня Т-лимфоцитов, соответственно, на 1,8 % и 11,74 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными животными. В указанные периоды наблюдали, достоверное повышение уровня В-лимфоцитов, соответственно, на 19,45 % и 25 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой. В отношении содержания ЦИК, то на 6-е сутки наблюдали повышение их уровня на 13,68 % ( $p < 0,05$ ), а на 10-е сутки – уровень не изменялся по сравнению с контрольной группой.

На 20 сутки определили снижение уровня Т-лимфоцитов на 18,6 % ( $p < 0,05$ ), а также увеличение В-лимфоцитов и ЦИК, соответственно, на 43,65 % и 29,8 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля.

Введение Корвитина способствовало повышению уровня Т-лимфоцитов на 39,29 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными без коррекции этим препаратом. В то же время, показатели гуморального иммунитета снижались: В-лимфоциты на 17,54 % ( $p < 0,05$ ), ЦИК на 26,34 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными без корректировки соответствующим препаратом.

**Выводы.** Препарат «Корвитин» предупреждал развитие дисбаланса иммунной системы, ограничивая воспалительный ответ, что позволяет рекомендовать его в качестве терапии сопровождения при пневмонии.

**Ключевые слова:** пневмония, Корвитин, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет.

**Автор, відповідальний за листування:** [olhachuhay1@gmail.com](mailto:olhachuhay1@gmail.com)

**Вступ**

Як відомо, незважаючи на всі старання лікарів, пневмонія у ХХІ ст. залишається значною медико-соціальною проблемою як у країнах, що розвиваються, так і в промислово розвинених країнах. За визначенням ВООЗ, пневмонія – це гостре, як правило, інфекційне за-

хворювання переважно респіраторної частини легень/респіраторні бронхіоли і альвеоли/з наявністю в альвеолах ексудату нейтрофільного вмісту і рентгенологічно проявляється інфільтративним затемненням легень [1]. Значна площа поверхні легеневого епітелію і масивна капілярна сітка для обміну газів роблять легені



вразливими до антигенів довкілля. Як наслідок, дихальні шляхи можуть служити «вхідними воротами» для багатьох інфекційних агентів. На захисті респіраторного каналу від патогенної агресії стоїть імунна система.

Імунна система дихальних шляхів складається зі спеціалізованої мережі клітин, до якої входять секреторні клітини Клара, війчасті клітини, келихоподібні клітини та субмукозні залози. Основними клітинами мієлоїдного походження у просвіті легень є альвеолярні макрофаги, які володіють високою фагоцитарною активністю. Завдяки цим клітинам у легенях ефективно знешкоджуються маловірулентні мікроорганізми. Однак, для боротьби з патогенами, які уникають цих природжених механізмів захисту, необхідна активація набутої ланки імунної відповіді [2].

Відомо, що специфічна імунна реакція є надзвичайно важливою для захисту легень від патогенів, які зазнали неповного фагоцитозу (мікобактерії, грибки, віруси) та позаклітинних організмів, які тяжко піддаються фагоцитозу (інкапсульовані бактерії). Мікробні інфекції, які уникають природжених захисних механізмів, продукують значну кількість антигенів, що, в свою чергу, активує антиген-специфічну імунну реакцію. Зокрема, сюди відносять антиген-специфічну проліферацію і диференціювання Т- та В-лімфоцитів [3].

Як відомо, Т-лімфоцити забезпечують формування клітинної ланки імунітету. Серед Т-лімфоцитів розрізняють низку типів, зокрема, Т-хелпери (Th), Т-цитотоксичні лімфоцити (CD8+), регуляторні Т-клітини, Т-лімфоцити пам'яті та  $\gamma\delta$  Т-клітини.

Т-клітини (CD4+ - хелпери) стимулюють перетворення В-лімфоцитів у плазматичні клітини, активують дендритні клітини через продукцію цитокінів і ко-стимулюючих молекул, а також ініціюють активацію CD8+ - цитотоксичних лімфоцитів [4]. Існує дві субпопуляції CD4+-хелперів – Т-хелпери 1 і 2 типів, що не мають відмінностей за антигенною структурою, але розрізняються за профілем цитокінів, які вони синтезують у відповідь на антигенну стимуляцію. Від цього залежить профіль активації основних типів імунної відповіді (клітинний або гуморальний) [5].

CD8+ – цитотоксичні лімфоцити продукують значну кількість прозапальних цитокінів, зокрема, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , та IL-2, а також безпосередньо руйнують власні клітини організму,

інфіковані вірусами або іншими патогенними внутрішньоклітинними мікроорганізмами, атипові клітини. Особливістю Т-клітинного рецептору є здатність розпізнавати чужорідний антиген тільки в комплексі з власними клітинними антигенами на поверхні антиген-презентуючих клітин (дендритних або макрофагів) [2].

$\gamma\delta$  Т-клітини та інваріантні природні кілерні Т-клітини (iNKT), аналогічно до недавно виявлених вроджених лімфоїдноподібних клітин (ILCs), також відіграють значну роль у ранній відповіді на легенеvu інфекцію [6].

В-лімфоцити забезпечують гуморальну імунну реакцію шляхом продукції антитіл. За допомогою імуноглобулінових рецепторів В-лімфоцити можуть розпізнавати не тільки пептиди, а й великі молекули білків, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди, полісахаридні та ліпопротеїдні розчинні антигени [5]. Однією з найбільш важливих біологічних функцій імуноглобулінів є їх зв'язування з антигеном та утворення імунного комплексу (ІК). Утворення ІК вважається складовою нормальної імунної відповіді, що перманентно проходить в організмі людини та направлена на підтримку стабільності його внутрішнього середовища [5]. Загалом утворення в організмі комплексів «антиген-антитіло» відбувається постійно, оскільки є заключним етапом звичайних імунних реакцій, що здійснюють захист від чужорідних алергенів. Проте кількість таких комплексів є незначною, а тривалість перебування у крові короткою, оскільки відбувається їх захоплення і руйнування макрофагами селезінки та іншими клітинами системи мононуклеарних фагоцитів, зокрема клітинами Купфера в печінці. Елімінація імунних комплексів відбувається завдяки їх зв'язуванню з фагоцитами через мембранні Fc- та C3b-рецептори (антитіла комплексів фіксують і активують комплемент) [7].

На сьогоднішній день для корекції порушень, викликаних тривалим запальним процесом, як терапія супроводу часто використовують біофлаваноїди. Існує більше 150 видів таких біологічних речовин зі схожими властивостями. Флаваноїди володіють антиоксидантними, мембрано-, ангіопротекторними, протизапальними, імуномодельючими властивостями тощо [8]. Серед флаваноїдних сполук найпотужнішу антиоксидантну дію має кверцетин. Через низьку біодоступність, що зумовлена низькою розчинністю у біологічних рідинах,



препарат тривалий час мав обмежене використання [9]. Для подолання цієї проблеми було створено унікальний розчинний у воді кверцетин – препарат «Корвітин» для ін'єкцій, що дало поштовх широкого використовувати його в лікувальній практиці [10].

**Мета нашого дослідження:** вивчення впливу «Корвітину» на показники клітинного та гуморального імунітету за умови розвитку експериментальної пневмонії (ЕП).

**Матеріали та методи дослідження.** Експериментальні дослідження проводились на 30 морських свинках (самцях) масою 180–220 г, поділених на 5 груп по 6 тварин у кожній:

- I група – інтактні морські свинки (контроль);
- II група – морські свинки з ЕП на 6-ту добу;
- III група – морські свинки з ЕП на 10-ту добу;
- IV група – морські свинки з ЕП на 20-ту добу.
- V група – морські свинки з ЕП під дією Корвітину.

Даний антиоксидант вводили дозою 40 мг/кг внутрішньоочеревинно впродовж 7 днів (з 13 по 20 добу).

З метою раціональної інтерпретації одержаних цифрових даних умовно виділяли два періоди (ранній і пізній) розвитку ЕП. Ранній період охоплював групу тварин із ЕП на 6 та 10 добу експерименту, а пізній період – тварин на 20 добу.

Усіх тварин утримували в стандартних умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації з дотриманням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1985). Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001).

Відтворювали експериментальну пневмонію шляхом інтраназального введення тваринам культури *Staphylococcus aureus* за методом В. Н. Шляпникова і співавт. [11].

Згодом тварин декапітували на 6-ту, 10-ту та 20-ту добу розвитку ЕП. Визначали вміст Т і В лімфоцитів (СДЗ та СД19) у крові за методом Е. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова [12]. Рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у крові за методом V. Haskova, J. Kaslik [13].

Отримані результати статистично оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного (М) за результатами кожного дослідження  $\pm$  стандартне відхилення (m). Достовірними вважались відмінності при  $p < 0,05$  (95,5 %).

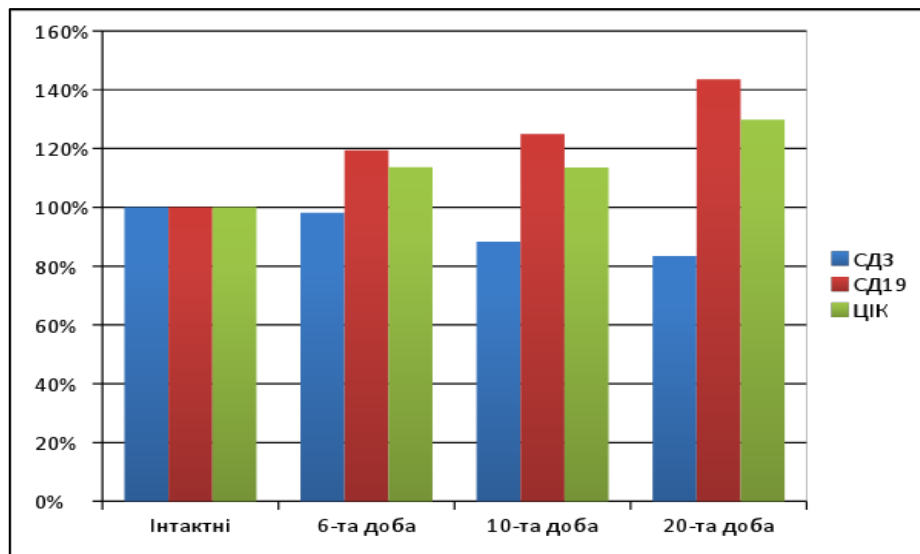
**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати імунних досліджень показали, що в ранній період, який охоплює 6-у і 10-у доби розвитку ЕП, відбувалися помітні зміни окремих показників клітинного та гуморального імунітету.

Зокрема, у морських свинок на 6-ту добу ЕП рівень Т-лімфоцитів у крові знизився на 1,8 % порівняно з 1-ю групою. Далі, на 10 добу експерименту спостерігався подальший спад вказаних вище показників на 11,74 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними тваринами, що свідчило про пригнічення клітинної ланки імунітету.

Стан гуморального імунітету оцінювався за рахунок визначення вмісту В-лімфоцитів і ЦІК. У ранній період ЕП, на 6 добу спостерігалось підвищення рівня В-лімфоцитів на 19,45 % ( $p < 0,05$ ) відносно 1-ї групи. Згодом, на 10-ту добу експерименту, спостерігалось подальше зростання вмісту В-лімфоцитів у крові на 25 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою тварин. Щодо вмісту ЦІК, то на 6 добу відбулося підвищення рівня ЦІК на 13,68 % ( $p < 0,05$ ) відносно інтактних тварин. Однак на 10-ту добу експерименту ми не виявили подальшого зростання вмісту ЦІК, він був аналогічним 6 добі (зростання на 13,5 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою) (Рис.1).

Таким чином, проведені імунологічні дослідження окремих показників імунної системи на 6-у і 10-у доби експерименту показали підвищення вмісту В-лімфоцитів і ЦІК та зниження рівня Т-лімфоцитів у крові, що свідчило про порушення імунної відповіді з активацією гуморальної ланки на тлі пригнічення клітинних реакцій в ранній період формування ЕП.





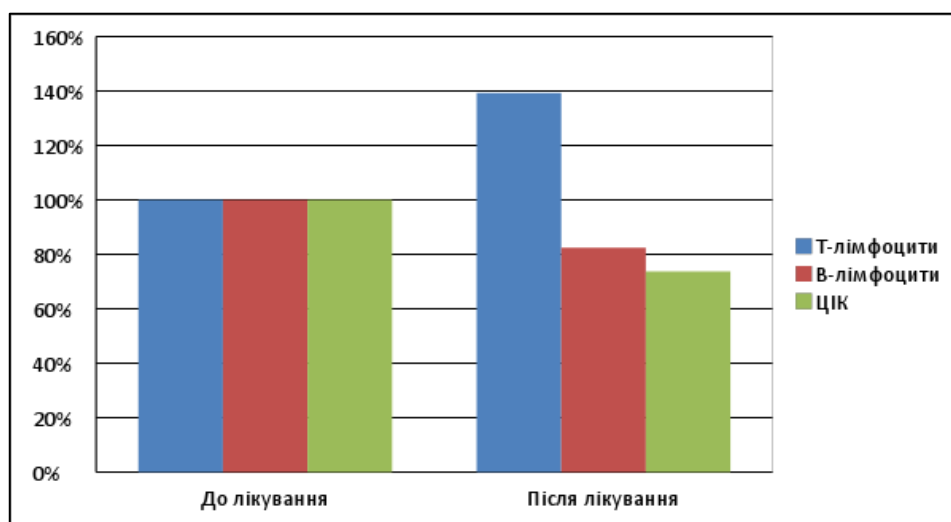
**Рисунок 1 – Рівень Т-, В-лімфоцитів та ЦІК у крові морських свинок в динаміці формування ЕП (% від контролю)**

У пізній період розвитку ЕП, зокрема на 20 добу, встановлено подальше зниження рівня Т-лімфоцитів на 18,6 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 1-ю групою. Водночас, показники гуморального імунітету продовжували зростати. Зокрема, рівень В-лімфоцитів і ЦІК зросли на 43,65 % та на 29,8 % ( $p < 0,05$ ), відповідно, порівняно з групою інтактних тварин (Рис.1). Таким чином, пізній період ЕП характеризувався подальшим порушенням імунної відповіді.

З метою вивчення впливу Корвітину на показники гуморального та клітинного імунітету у морських свинок з ЕП даний препарат вводили внутрішньоочеревинно у дозі 40 мг/кг протягом 7 днів (з 13-ї до 20-ї доби).

У результаті проведеної терапії виявили певні закономірності. Зокрема, спостерігалось підвищення рівня Т-лімфоцитів на 39,29 % ( $p < 0,05$ ) на 20 добу порівняно з тваринами без корекції Корвітином. Паралельно тривало зниження показників гуморального імунітету: на 17,54 % ( $p < 0,05$ ) знизився рівень В-лімфоцитів і на 26,34 % ( $p < 0,05$ ) рівень ЦІК порівняно з показниками морських свинок на 20 добу без корекції Корвітином (Рис. 2).

Як ми бачимо, за допомогою препарату Корвітин вдалось попередити подальший дисбаланс імунної відповіді, що підтверджувало його протизапальний та імунокорегуючий ефект.



**Рисунок 2 – Вплив «Корвітину» на показники гуморального та клітинного імунітету у морських свинок з ЕП (% від тварин на 20 дні життя без лікування)**



**Висновки**

Як ранній, так і пізній період ЕП характеризувався порушенням функціонування імунної системи. Експериментальна пневмонія у морських свинок супроводжувалась пригніченням клітинної ланки імунітету, що виражалось зниженням рівня Т-лімфоцитів у крові. Паралельно спостерігалась активація гуморальної ланки імунітету, що проявлялося зростанням рівня В-лімфоцитів і ЦІК у крові в ранній і пізній періоди ЕП. Даний стан може бути зумовлений природою самого збудника. Оскільки ЕП у морських

свинок викликалась *Staphylococcus aureus*, який є грам-позитивною бактерією, то в боротьбі з даною інфекцією основну роль відіграє активація гуморальної ланки імунітету.

Препарат Корвітин попереджував подальший розвиток дисбалансу імунної системи, обмежуючи запальну реакцію. Даний ефект може бути зумовлений протизапальними та імуномодуючими властивостями Корвітину, що дозволяє рекомендувати його як терапія супроводу при пневмонії.

**References (список літератури)**

1. Drannik GM. *Klinicheskaya immunologiya i alergologiya* [Clinical immunology and allergology]. K.: LCC «Poligraf plus» Publ., 2010. 552 p.
2. Chen K, Kolls K. *T cell-mediated host immune defenses in the lung*. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:605–633.
3. Moore BB, Moore TA, Toews GB. *Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defences*. *Eur Respir J*. 2001;18:846–856.
4. Marshall NB, Swain SL. *Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity*. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:954602.
5. Chopyak VV, Potomkina HO, Gavrylyuk AM et al. *Posibnyk dlia provedennia praktychnykh zaniat z klinichnoi imunolohii ta alerholohii* [A guide for conducting practical classes in clinical immunology and allergology]. Lviv: Tetyuh TV Publ., 2015. 208 p.
6. Kuznetsov LV, Babadzan VD, Harchenko NV et al. *Imunolohiia: pidruchnyk* [Immunology: textbook]. Vinnitsa: TOV «Merkuri Podillya» Publ., 2013. 526 p.
7. Ataman OV. *Patofiziolohiia. T.1. Zahalna patolohiia* [Pathophysiology. VI. Common pathology]. Vinnitsa: Nova knyga Publ., 2012. 592 p.
8. Chekman IS. *Klinichna fitoterapiia* [Clinical phytotherapy]. K.: A.S.K. Publ., 2003. 552 p.
9. Mohort MA, Danova IV, Myslyvets OV. [Pharmacodynamics of quercetin and its pharmaceutical forms]. *Ukr. Pharmacology and drug toxicology*. 2009;6(13):3-7.
10. Levitskiy AP, Skydan MI, Skydan KV. [The use of quercetin in dentistry]. *Rus. Herald of dentistry*. 2010;1:81–87.
11. Shlapnykov VI, Solodova TL, Stepanova SA et al. *Eksperimentalnyye modeli ostrykh pnevmoniy. vyzvannykh uslovno-patologicheskimi bakteriyami i ikh assotsiatsiyey: metod. ukazaniya* [Experimental models of acute pneumonia caused by opportunistic bacteria and their association: methodical guidelines]. Saratov. 1988. 30 p.
12. Chernushenko EF, Kogosova LS. *Imunologiya i immunopatologiya zbolevaniy legkikh* [Immunology and immunopathology of lungs diseases]. K.: Zdorovya Publ., 1981. 208 p.
13. Haskova V, Kaslik J, Matejkava M. *Novy zpusob stanoveni circulujicich imunokomplexy w lidskych serech*. *Cas. Lek. Ces*. 1977;116(14):436–437.

(received 27.12.2017, published online 01.04.2018)

(одержано 27.12.2017, опубліковано 01.04.2018)

