

УДК 616.24-002-085.37:612-092.9

Л.С. Бузолева¹, А.В. Костюшко², Н.М. Кондрашова²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ² Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

ОЦЕНКА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ У МЫШЕЙ

Ключевые слова: экспериментальная пневмония, иммуномодуляторы, γ -интерферон, интерлейкин-10.

Изучено влияние иммуномодуляторов природного происхождения — лейкинферона и тинростима — на фагоцитарную активность, кислородзависимые механизмы бактерицидности и локальную продукцию оппозитных цитокинов при экспериментальной стафилококковой и синегнойной пневмонии. Установлено, что собственный эффект лейкинферона выражался в стимуляции кислородзависимых механизмов бактерицидности фагоцитов, тогда как тинростим оказывал иммуномодулирующее действие на показатели врожденного иммунитета. Лейкинферон вызывал увеличение уровня γ -интерферона, тинростим более выражено усиливал выработку интерлейкина-10. Праймирующий эффект препаратов *in vitro* более выражен в модели стафилококковой пневмонии, при этом лейкинферон и тинростим аналогично действовали *in vivo* на исследуемые показатели. При синегнойной же пневмонии более выраженным противовоспалительным эффектом обладал тинростим.

Изучению патогенеза и проблеме лечения пневмоний уделяется большое внимание как у нас в стране, так и за рубежом [1, 3, 8]. Несмотря на успехи этиотропной терапии и существенный рост числа антибактериальных препаратов, сохраняется тенденция к увеличению смертности от этого заболевания [10]. Спектр возбудителей нозокомиальной пневмонии характеризуется значительным разнообразием, что затрудняет планирование эмпирической терапии до получения данных микробиологического исследования [1]. Это связано с тем, что, как правило, нозокомиальная пневмония развивается на фоне тяжелой патологии, сопровождающейся серьезными метаболическими, циркуляторными нарушениями и иммунодефицитом [1, 3, 5, 9]. К факторам, усугубляющим проблему, относятся длительное пребывание больного в стационаре и предшествующее применение антибиотиков (с лечебной или профилактической целью). Однако этиология нозокомиальной пневмонии устанавливается менее чем в 50% случаев, что создает трудности в определении тактики целенаправленной антибактериальной терапии [3, 10]. Поэтому благоприятный исход заболевания часто зависит от адекватности патогенетической терапии.

В патогенезе пневмоний существенная роль отводится иммунологической реактивности организма [6]. Иммунопатогенетические механизмы развития пневмоний обуславливают необходимость применения эффективных иммуномодуляторов [4, 5, 7]. В то же время данных о преимущественном назначении

того или иного иммуностропного средства в зависимости от этиологического варианта пневмонии недостаточно, что и послужило основанием для изучения влияния иммуномодуляторов природного происхождения — лейкинферона и тинростима — на некоторые показатели врожденного иммунитета при экспериментальной пневмонии.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на белых нелинейных мышах массой 18–20 г, находившихся на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. В каждой серии экспериментов участвовало по 5 мышей. В исследованиях были использованы патогенные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, выделенные из бронхоальвеолярной жидкости больных нозокомиальной пневмонией. Экспериментальную модель получали, интраназально заражая мышей 0,05 мл смыва (на 0,85% растворе NaCl) суточной культуры микроорганизмов в дозе, соответствующей LD_{50} (1×10^3 м.т./мл для *P. aeruginosa* и 1×10^3 м.т./мл для *S. aureus*), которую устанавливали по оптическому стандарту мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Развитие пневмонии было подтверждено высевам бактерий из ткани легких. Комплексный препарат цитокинов — лейкинферон — вводили животным пятикратно 1 раз в сутки внутримышечно (по 0,1 мл в дозе 1300 МЕ) и ингаляционно (по 1300 МЕ в 5 мл физраствора). Тинростим, состоящий из комплекса пептидов, выделенных из оптических ганглиев кальмара *Berriuthis magister*, вводили по аналогичной схеме — 0,39 мг/сут. и 0,39 мг в 5 мл физраствора соответственно. Дозы были рассчитаны по формуле пересчета равноэффективных доз фармакологических препаратов для лабораторных животных и человека [2]. Контроль № 1 составили интактные животные, контроль № 2 — мыши, которым в течение 5 дней вводился лейкинферон, контроль № 3 — мыши, которым в течение 5 дней вводился тинростим. Группы «опыт» были сформированы следующим образом: № 1 — заражение мышей культурой *S. aureus*, № 2 — заражение мышей культурой *S. aureus* и введение лейкинферона по схеме, № 3 — заражение мышей культурой *S. aureus* и введение тинростима по схеме, № 4 — заражение мышей культурой *P. aeruginosa*, № 5 — заражение мышей культурой *P. aeruginosa* и введение лейкинферона по схеме, № 6 — заражение мышей культурой *P. aeruginosa* и введение тинростима по схеме. Забор материала для

Таблица

Влияние лейкинферона и тинростима на иммунологические показатели у мышей при экспериментальной пневмонии ($M \pm m$).

Группа		Показатель				
		фагоцитарный показатель, %	фагоцитарное число	НСТ-тест, усл. ед.		
				спонтанный	стимулированный лейкинфероном	стимулированный тинростимом
Контроль № 1	Интактные мыши	69,4±0,25	7,3±0,02	0,28±0,07	0,43±0,02	0,31±0,04
Контроль № 2	Лейкинферон	75,8±0,33	8,2±0,02 ¹	0,63±0,09 ¹	0,82±0,04 ¹	0,79±0,03 ¹
Контроль № 3	Тинростим	70,4±0,18	7,2±0,03 ²	0,36±0,05 ^{1, 2}	0,55±0,01 ^{1, 2}	0,43±0,07 ²
Опыт № 1	<i>S. aureus</i>	35,2±0,19 ¹	5,3±0,05 ¹	0,51±0,05 ¹	0,92±0,08 ¹	0,78±0,02 ¹
Опыт № 2	<i>S. aureus</i> + лейкинферон	62,7±0,13 ³	5,2±0,04 ¹	0,60±0,04 ^{1, 3}	0,63±0,03 ^{1, 3}	0,61±0,04 ^{1, 3}
Опыт № 3	<i>S. aureus</i> + тинростим	45,3±0,12 ^{1, 5}	5,4±0,08 ¹	0,54±0,03 ^{1, 5}	0,56±0,02 ^{1, 4}	0,55±0,02 ^{1, 4}
Опыт № 4	<i>P. aeruginosa</i>	43,7±0,15 ¹	4,8±0,03 ¹	0,37±0,03 ¹	0,62±0,02 ¹	0,51±0,01 ¹
Опыт № 5	<i>P. aeruginosa</i> + лейкинферон	55,6±0,17 ¹	5,4±0,03 ¹	0,44±0,02 ¹	0,44±0,05 ⁶	0,42±0,03 ⁶
Опыт № 6	<i>P. aeruginosa</i> + тинростим	44,2±0,16 ¹	5,1±0,05 ¹	0,40±0,03 ¹	0,42±0,01 ⁷	0,39±0,05 ⁷

¹ Различие с контролем № 1 статистически значимо.⁵ Различие с опытом № 2 статистически значимо.² Различие с контролем № 2 статистически значимо.⁶ Различие с опытами № 4 и 6 статистически значимо.³ Различие с опытом № 1 статистически значимо.⁷ Различие с опытами № 4 и 5 статистически значимо.⁴ Различие с опытами № 1 и 2 статистически значимо.

исследования осуществлялся на 7-е сутки эксперимента. Выведение животных из опыта выполнялось с использованием эфирного наркоза. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали в тесте поглощения частиц полистирольного латекса («Реаккомплекс», г. Чита), изучение внутриклеточного кислородзависимого метаболизма фагоцитов проводили с использованием теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) спектрофотометрически: оптическую плотность восстановленного диформаза измеряли при длине волны 540 нм. Продукцию цитокинов — γ -интерферона (ИФН γ) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) исследовали по их уровню в супернатанте гомогенизата легочной ткани иммуноферментным методом с использованием реактивов производства R&D system Inc. Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью пакета SPSS (v16.0) с использованием W-критерия Вилкоксона и U-критерия Манна–Уитни с проверкой нормальности распределения по методу Колмогорова–Смирнова. Критическое значение уровня значимости W-критерия принималось равным 0,062, U-критерия — 0,032: третий уровень достоверности ($p \leq 0,05$) для численности групп $n_1 = 5$ и $n_2 = 5$.

Результаты исследования. Праймирование клеток незараженных мышей лейкинфероном приводило к увеличению интенсивности кислородзависимых механизмов бактерицидности (индекс стимуляции — $1,54 \pm 0,01$, $p < 0,05$), обработка клеток тинростимом не давала значимых результатов (индекс стимуляции — $1,1 \pm 0,03$, $p > 0,05$). Влияние лейкинферона и тинростима на функциональную активность фагоцитирующих клеток здоровых животных в сериях проведенных экспериментов нельзя оценить как однозначно стимулирующее. При оценке фагоцитарного показателя и фагоцитарного числа не выявлено достоверных различий по сравнению с группой интактных мышей, за исключением показателей поглощательной способности фагоцитов под влиянием

лейкинферона в контроле № 2: фагоцитарное число увеличилось на 0,9, $p < 0,05$ (таб.).

Спонтанная способность фагоцитов генерировать активные формы кислорода в этой группе под влиянием лейкинферона увеличилась более чем в два раза при сравнении с группой интактных мышей. Праймирование клеток *in vitro* лейкинфероном приводило к еще большему увеличению продукции нейтрофильными гранулоцитами активных форм кислорода (индекс стимуляции — $1,3 \pm 0,01$), как и праймирование тинростимом (индекс стимуляции — $1,25 \pm 0,04$).

Оценка данных в контроле № 3 (введение тинростима здоровым животным) дала следующие результаты: показатели фагоцитоза остались практически на уровне интактных мышей, значения спонтанного НСТ-теста увеличились, индекс стимуляции в НСТ-тесте с лейкинфероном был равен $1,53 \pm 0,01$, в НСТ-тесте с тинростимом — $1,19 \pm 0,02$.

При экспериментальной пневмонии происходило достоверное снижение функциональной активности и поглощательной способности фагоцитирующих клеток. При этом фагоцитарный показатель при заражении мышей *S. aureus* (опыт № 1) на 7-е сутки эксперимента был ниже, чем при заражении *P. aeruginosa* (опыт № 4), тогда как количество поглощенных частиц латекса фагоцитом не зависело от этиологии экспериментальной пневмонии. В ходе исследования выявлено, что *P. aeruginosa* оказывал менее выраженное влияние на активацию гексозомонофосфатного шунта, чем *S. aureus*. Так, показатели спонтанного НСТ-теста при стафилококковой пневмонии увеличивались на 0,23 усл. ед., а при пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, — на 0,09 усл. ед. по сравнению с группой интактных мышей (контроль № 1). В условиях *in vitro* клетки мышей с пневмонией в обеих группах сравнения достаточно активно генерировали кислородный взрыв под воздействием лейкинферона и менее выражено — под воздействием тинростима (таб.).

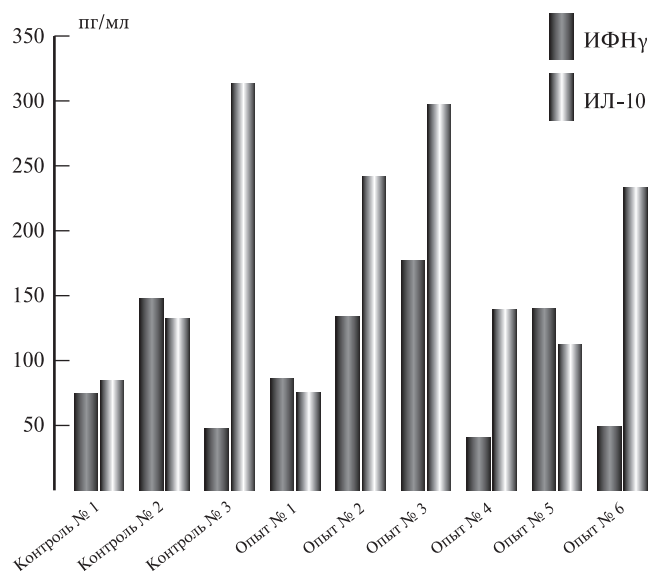


Рис. Уровни ИФН γ и ИЛ-10 в супернатанте легочной ткани при пневмонии у мышей на фоне введения иммуномодуляторов.

Серия экспериментов с введением иммуномодуляторов при одновременном заражении животных дала следующие результаты. На фоне действия лейкинферона у мышей, зараженных *S. aureus*, фагоцитарная способность нейтрофилов увеличилась на 27,5%, однако их поглотительная способность через 7 суток после заражения осталась практически неизменной. Показатель спонтанного НСТ-теста у мышей данной опытной группы достоверно не увеличился, дополнительная обработка клеток лейкинфероном и тинростимом также не приводила к увеличению кислородзависимой микробицидной способности фагоцитов. Эффект тинростима при стафилококковой пневмонии выражался в увеличении фагоцитарного показателя на 10,1%. Однако показатели спонтанного НСТ-теста были практически на уровне таковых у нелеченной группы мышей, зараженных *S. aureus*, и фагоциты почти не реагировали на стимуляцию иммуномодуляторами *in vitro* (табл.).

Введение лейкинферона при одновременном инфицировании *P. aeruginosa* (опыт № 5) приводило к незначительному увеличению значений спонтанного НСТ-теста (на 0,07 усл. ед.). При использовании тинростима в этой серии экспериментов (опыт № 6) спонтанный НСТ-тест увеличивался на 0,03 усл. ед. Анализ показателей стимулированного теста в группе мышей с пневмонией, вызванной *P. aeruginosa*, показал, что *in vitro* на 7-е сутки эксперимента клетки не были способны к дополнительной генерации активных форм кислорода ни под воздействием лейкинферона, ни под воздействием тинростима (табл.). Это свидетельствовало об истощении резервных возможностей фагоцитов в данных опытных группах.

Исследование цитокинов в супернатанте гомогенизата легочной ткани выявило незначительное превалирование содержания цитокинов Т-хелперного 2-го типа над цитокинами Т-хелперного 1-го типа у

здоровых животных (ИЛ-10 – $85,03 \pm 5,08$, ИФН γ – $74,33 \pm 6,7$ пг/мл). Снижение провоспалительной активности цитокинов было зарегистрировано в группах мышей, получавших тинростим: уровень ИФН γ в этой серии экспериментов составил $47,94 \pm 2,35$ пг/мл. Согласно результатам исследований, лейкинферон оказывал значительное стимулирующее воздействие на локальную продукцию легочными иммунными клетками ИФН γ , уровень которого поднимался до $147,9 \pm 19,61$ пг/мл, что достоверно отличалось от показателей в других исследуемых группах. Противовоспалительный эффект тинростима был значительно выше, чем у лейкинферона, и составил $313,68 \pm 11,93$ пг/мл против $132,05 \pm 5,62$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$ (рис.).

При заражении мышей *S. aureus* локальные уровни ИФН γ и ИЛ-10 изменялись недостоверно. Развитие пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa*, сопровождалось достоверным уменьшением содержания ИФН γ на 33,6 пг/мл и увеличением содержания ИЛ-10 на 54,5 пг/мл.

При исследовании локального цитокинового профиля на 7-е сутки после заражения мышей *S. aureus* и введения лейкинферона (опыт № 2) было зарегистрировано достоверное увеличение уровней как ИФН γ ($134,13 \pm 5,45$ пг/мл), так и ИЛ-10 ($241,73 \pm 11,45$ пг/мл). Стимулирующий эффект был значительно выше у мышей с синегнойной пневмонией: уровень ИФН γ увеличился на 99,08 пг/мл по сравнению с показателями опыта № 4 и равнялся $139,78 \pm 14,4$ пг/мл. Уровень ИЛ-10, напротив, при введении лейкинферона мышам с пневмонией, вызванной *P. aeruginosa*, недостоверно снизился – с $139,49 \pm 23,10$ до $112,14 \pm 10,29$ пг/мл (рис.).

Сравнительная характеристика действия тинростима на локальную выработку цитокинов показала, что при стафилококковой пневмонии тинростим увеличивает продукцию ИФН γ на 90,6 пг/мл, практически не оказывая влияния на продукцию ИФН γ при синегнойной пневмонии. Таким образом, собственный эффект тинростима у здоровых мышей, выражающийся в снижении содержания ИФН γ , проявился неожиданно высоким увеличением продукции ИФН γ на фоне стафилококковой пневмонии, что превосходило аналогичный эффект лейкинферона (рис.). Противовоспалительное действие тинростима было стабильно высоким как при исследовании собственного эффекта препарата, так и при действии в группах животных с пневмонией (рис.). Так, уровень ИЛ-10 под влиянием тинростима у мышей с пневмонией, вызванной *S. aureus*, увеличился на 221,9 пг/мл, а при пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa*, – на 93,77 пг/мл.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного иммунологического исследования свидетельствуют о том, что собственный эффект лейкинферона выражается в стимуляции кислородзависимых механизмов бактерицидности фагоцитирующих

клеток, в то время как тинростим оказывает иммуномодулирующий эффект на показатели врожденного иммунитета у здоровых животных. Лейкинферон вызывает увеличение уровня провоспалительного цитокина ИФН γ , тинростим более выражено усиливает выработку ИЛ-10.

Активация факторов врожденного и адаптивного иммунитета имеет свои отличия в зависимости от этиологии воспаления в легких. Эксперимент дает возможность оценить собственный эффект бактерий на развитие пневмонии. Так, в модели экспериментальной стафилококковой пневмонии показатели спонтанного НСТ-теста были статистически значимо выше, чем при экспериментальной синегнойной пневмонии. Праймирующий эффект исследованных иммуномодуляторов на клетки больных мышей *in vitro* был выше в модели стафилококковой, чем синегнойной пневмонии. У экспериментальных животных с пневмонией, вызванной *S. aureus*, активация микробицидной активности *in vitro* под воздействием лейкинферона была выше, чем при воздействии тинростима. Аналогичные результаты получены и в опытах заражения мышей *P. aeruginosa*: индекс стимуляции лейкинфероном был выше, чем индекс стимуляции тинростимом. *S. aureus* не вызывал выраженных изменений в продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками легких на 7-е сутки эксперимента. При экспериментальной пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, локальный уровень ИЛ-10 в легких преобладал, что указывает на развитие Т-хелперного иммунного ответа 2-го типа.

Исследование иммуномодулирующего действия препаратов *in vivo* на фоне бактериальной пневмонии позволило констатировать, что при развитии воспаления, вызванного *S. aureus*, уровень ИФН γ увеличивался под воздействием обоих иммуномодуляторов. При пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, уровень ИФН γ увеличивал только лейкинферон. Противовоспалительный эффект в виде роста уровня ИЛ-10 при синегнойной пневмонии был зафиксирован только в отношении тинростима. При введении лейкинферона на фоне пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa*, происходило снижение уровня ИЛ-10, то есть при экспериментальной пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, лейкинферон менял тип Т-хелперного иммунного ответа со 2-го на 1-й тип, что, возможно, оказывало влияние на стимуляцию иммуноцитов, удлиняло фазу действия провоспалительных медиаторов и увеличивало рекрутирование новых клеток в очаг воспаления.

Таким образом, при экспериментальной стафилококковой пневмонии выявлено аналогичное действие лейкинферона и тинростима на показатели фагоцитарной активности и оппозитных цитокинов, тогда как при синегнойной пневмонии тинростим обладал более выраженным противовоспалительным эффектом.

Литература

1. Белобородов В.Б. Проблемы профилактики и эмпирической антибактериальной терапии нозокомиальной пневмонии, связанной с проведением искусственной вентиляции легких. // Инфекции и антимикробная терапия. 2002. Т. 4, № 4. С. 108–113.
2. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во ЧГПУ, 2000. 168 с.
3. Домникова Н.П., Сидорова Л.Д., Непомнящих Г.И. Внутрибольничные пневмонии: патоморфогенез, особенности клиники и терапии, критерии прогноза. М.: Изд-во РАМН, 2003. 288 с.
4. Кузнецов В.П., Маркелова Е.В., Силич Е.В., Беляев Д.Л. Динамика цитокинов и роль иммунокоррекции при нозокомиальной пневмонии. // Российский иммунологический журнал. 2002. Т. 7, № 2. С. 151–160.
5. Маркелова Е.В. Система цитокинов у больных с острыми повреждениями легких и клинко-иммунологическое обоснование терапии лейкинфероном: дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2000. 338 с.
6. Система цитокинов и болезни органов дыхания. / Гельцер Б.И., Просекова Е.В., Маркелова Е.В. и др. Владивосток: Дальнаука, 2005. 256 с.
7. Швыдченко И.Н., Нестеров И.В., Синельникова Е.Ю. Цитокинсекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов // Иммунология. 2005. № 1. С. 31–33.
8. Holmes M.C., Zhang P., Nelson S. et al. Neutrophil modulation of the pulmonary chemokine response to lipopolysaccharide. // Shock. 2002. Vol. 18. P. 555–560.
9. Manderscheid P.A., Bodkin R.P., Davidson B.A. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. // Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2004. Vol. 11, 4. P. 742–751.
10. Vincent J. Nosocomial infections in adult intensive-care units. // Lancet. 2003. Vol. 361. P. 2068–2077.

Поступила в редакцию 10.04.2009.

ESTIMATING CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF PLANT IMMUNE-RESPONSE MODULATING AGENTS IN CASE OF EXPERIMENTAL MOUSE PNEUMONIA

L.S. Buzoleva¹, A.V. Kostyushko², N.M. Kondrashova²

¹ Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ² Vladivostok State Medical University (2 Ostryakov Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The authors have studied effects produced by plant immune-response modulating agents – leukiniferon and tinrostim – on the phagocytic activity, oxygen-dependent mechanisms of bactericidal action and local production of opposite cytokines in case of experimental staphylococcal and pseudomonas pneumonias. As shown, intrinsic leukiniferon effects were produced when stimulating oxygen-dependent mechanisms for the bactericidal activity of phagocytes; tinrostim induced immune response with respect to innate immunity. Leukiniferon caused increasing γ -interferon; tinrostim more evidently intensified interleukin-10 production. The staphylococcal pneumonia model showed priming effect of the medications *in vitro*. The leukiniferon and tinrostim produced similar effects on the parameters under study *in vivo*. In case of pseudomonas pneumonia, the most evident anti-inflammatory effects were peculiar to the tinrostim.

Key words: cytokines, experimental pneumonia, immune-response modulating agents.