

УДК 616.24-002-022:612.017

РОЛЬ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В ЦИТОКИНОВОМ ДИСБАЛАНСЕ ПРИ ПНЕВМОНИИА.В. Костюшко^{1, 2}, Н.М. Кондрашова¹¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Лечебно-диагностический центр «Мечников» (690001 г. Владивосток, ул. Капитана Шефнера, 2а)**Ключевые слова:** цитокины, экспериментальная пневмония, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*.

В эксперименте на мышах установлены различия между уровнями системных и локальных цитокинов и динамикой их выработки в зависимости от этиологии пневмонии. Энтеробактериальная пневмония характеризовалась повышенной системной продукцией γ -интерферона и интерлейкина-10. При пневмонии, вызванной *Escherichia coli*, уровень интерферона не изменялся, а интерлейкина-10 – был значимо ниже его величин в сыворотке крови интактных животных. Локальный уровень цитокинов при пневмонии, вызванной *Enterobacter* spp., характеризовался активацией интерлейкина-10 и депрессией выработки γ -интерферона спустя 2 недели после заражения. При заражении мышей *E. coli* регистрировалось нарастающее локальное преобладание концентрации интерлейкина-10. Таким образом, *Enterobacter* spp. и *E. coli* оказывают выраженное иммунодепрессивное влияние на легочные факторы защиты, что необходимо учитывать при выборе методов патогенетической терапии нозокомиальной пневмонии.

Внутрибольничные инфекции во всем мире являются одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения [1, 4, 5, 8, 9]. Несмотря на противоэпидемические мероприятия и значительные достижения в области лечебно-диагностических технологий, частота их возникновения, летальность и стоимость терапии продолжают возрастать, придавая проблеме еще большую медицинскую и социальную значимость. По данным мониторинга эпидемической обстановки, в отделениях реанимации и блоках интенсивной терапии в различных странах у 85% госпитализированных наблюдается колонизация патогенными микроорганизмами, а у более чем 45% больных имеются клинические признаки различных инфекций [1, 10, 12, 13].

Нозокомиальная пневмония занимает 3-е место по частоте среди внутрибольничных инфекций [1, 11]. При этом в структуре летальности от инфекций в стационаре она стоит на 1-м месте, являясь в 20% случаев причиной смерти пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии [11, 13]. Патогенез нозокомиальной пневмонии, с одной стороны, тесно связан с иммунологическим фоном пациента, в то же время характер инфекционного процесса в дыхательных путях и состояние иммунной реактивности зависят от фактора, вызывающего воспаление [6]. В 90% случаев нозокомиальная пневмония имеет бактериальную этиологию [12]. У больных «ранней пневмонией», не получавших антибиотики, основными возбудителями заболевания являются чувствительные штаммы микрофлоры верхних дыхательных путей: *Streptococcus*

pneumoniae, *Staphylococcus* spp., *Haemophilus influenza* и некоторые энтеробактерии. При «поздней» госпитальной пневмонии, развившейся на фоне или после лечения (профилактики) антибиотиками, ведущую роль играют госпитальные штаммы: представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter* spp.), *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* [1, 4, 10, 13]. Иммунный ответ имеет особенности, когда в качестве возбудителя выступают условно-патогенные микроорганизмы, в том числе энтеробактерии, являющиеся одними из основных этиологических агентов пневмонии [1–3]. В развитии воспалительной реакции большую роль играют цитокины, которые, несмотря на неспецифичность синтеза в ответ на действие разных патогенов, определяют динамику патологического процесса [7, 8, 11].

В проведенных нами ранее исследованиях были выявлены различия в уровне цитокинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных нозокомиальной пневмонией в зависимости от ее этиологии, что позволило сделать предположение о влиянии этиологического фактора на динамику цитокинового каскада и патогенез воспаления легких. Однако, учитывая многофакторность пневмонии и многофункциональность самой системы цитокинов, в организме человека достаточно трудно дифференцировать непосредственную роль возбудителя в механизме развития заболевания. Поэтому лишь экспериментальные исследования позволяют получить достоверные данные о динамике иммунного воспаления в ответ на воздействие конкретного возбудителя.

Целью работы явился сравнительный анализ продукции γ -интерферона (ИФН γ) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) в динамике пневмонии, вызванной энтеробактериями, в эксперименте на лабораторных животных.

Материал и методы. Исследование выполнено на белых беспородных мышах массой 18–20 г. Модель пневмонии, вызванной *Escherichia coli*, и пневмонии, вызванной *Enterobacter* species, получали, интраназально заражая мышей штаммами, выделенными от больных с нозокомиальными пневмониями, по 0,05 мл в дозе, соответствующей LD₅₀ (1 $\times$ 10⁵ м.т./мл для *E. coli* и 1 $\times$ 10³ м.т./мл для *Enterobacter* spp.). В каждой группе, выводимой из опыта на этапах исследования, включая контрольную (интактные мыши), было по 5 животных. Продукция цитокинов исследовалась по их уровню в сыворотке крови и в супернатанте гомогенизата легочной ткани на 1-е, 7-е и 14-е сутки после заражения методом иммуноферментного анализа с использованием

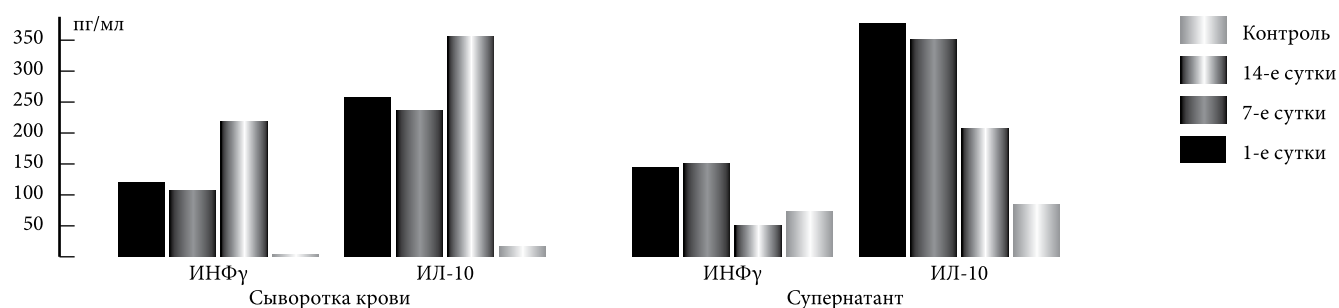


Рис. 1. Уровни цитокинов в сыворотке крови и в супернатанте легочной ткани при заражении мышей *Enterobacter* spp.

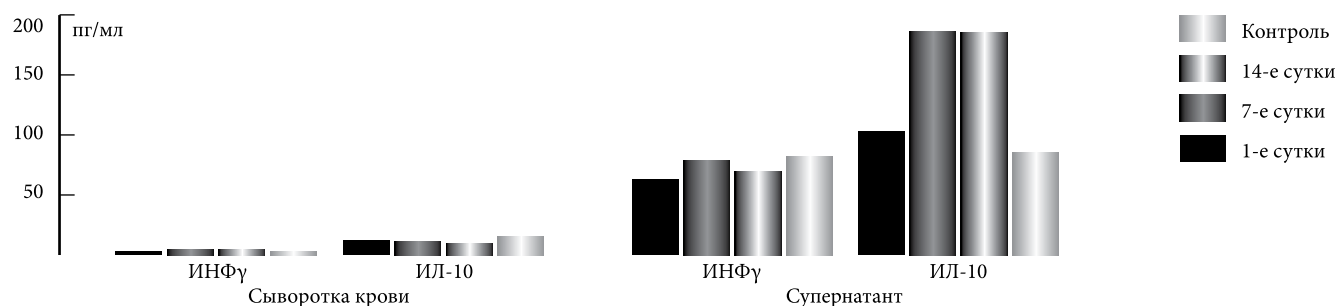


Рис. 2. Уровни цитокинов в сыворотке крови и в супернатанте легочной ткани при заражении мышей *E. coli*.

реактивов R&D diagnostics Inc. Обработка результатов проводилась с помощью модуля «Критерий Вилкоксона» статистического пакета SPSS 16.0.

Результаты исследования. Сравнение уровней цитокинов в динамике после заражения выявило односторонние сдвиги в обеих экспериментальных группах, выраженные в более низком системном и локальном содержании ИФНγ по сравнению с ИЛ-10. Однако на всем протяжении исследования уровень цитокинов в сыворотке крови при пневмонии, вызванной *Enterobacter* spp., был более чем в 20 раз выше, чем в контрольной группе, тогда как при пневмонии, вызванной *E. coli*, уровень ИФНγ мало отличался от контрольных значений, а уровень ИЛ-10 был значительно ниже, чем у интактных животных.

Так, через 1 сутки от начала эксперимента у мышей, зараженных *Enterobacter* spp., сывороточный уровень цитокинов значительно увеличивался: ИФНγ – до $119,88 \pm 15,32$ пг/мл (контроль – $3,14 \pm 0,59$ пг/мл), ИЛ-10 – до $257,19 \pm 30,03$ пг/мл (контроль – $15,55 \pm 0,83$ пг/мл). На 7-е сутки содержание цитокинов имело тенденцию к снижению, а на 14-е статистически значимо увеличивалось: ИФНγ – до $218,58 \pm 28,09$ пг/мл, ИЛ-10 – до $356,31 \pm 46,48$ пг/мл (рис. 1). При заражении мышей *E. coli* уровень цитокинов в сыворотке крови через 1 сутки снижался: ИФНγ – до $2,85 \pm 0,93$ пг/мл, ИЛ-10 – до $11,77 \pm 1,79$ пг/мл. В динамике уровень ИЛ-10 оставался на том же уровне, а ИФНγ – увеличился (рис. 2).

Мониторинг локальных цитокинов показал, что содержание ИФНγ в группе животных, зараженных *Enterobacter* spp., через 1 сутки вдвое увеличивалось ($144,45 \pm 21,64$ против $74,33 \pm 6,7$ пг/мл в контроле) и продолжало увеличиваться к 7-м суткам, а затем резко снижалось на 14-е сутки эксперимента. В данной группе через 1 сутки после заражения значительно увеличивался и уровень ИЛ-10 ($377,97 \pm 70,76$ против

$85,03 \pm 5,08$ пг/мл в контроле). На 7-е сутки содержание ИЛ-10 практически не изменялось, а на 14-е сутки – снижалось (рис. 1). У мышей, зараженных *E. coli*, уровень локального ИФНγ через 1 сутки после заражения, как и в сыворотке крови, снижался (до $56,97 \pm 4,96$ пг/мл). На 7-е сутки происходило его увеличение, а на 14-е сутки – снижение. Уровень ИЛ-10 в супернатанте на 7-е сутки увеличивался в 2 раза (с $103,61 \pm 8,12$ до $186,08 \pm 5,13$ пг/мл) и оставался высоким на 14-е сутки после заражения (рис. 2).

Обсуждение полученных данных. Сывороточные уровни оппозитных цитокинов при экспериментальной пневмонии, вызванной *E. coli*, оказались значительно ниже, чем в супернатанте легочной ткани, что свидетельствует об интенсивности местного воспаления, в то время как при пневмонии, вызванной *Enterobacter* spp., как в супернатанте легочной ткани, так и в сыворотке крови уровни ИФНγ и ИЛ-10 были значительно повышены. Важно отметить, что к 14-м суткам с момента заражения *Enterobacter* spp. локальный уровень цитокинов снижался более чем в 2 раза, тогда как их содержание в сыворотке крови, напротив, резко увеличивалось. В группе мышей, зараженных *E. coli*, зафиксировано достоверное увеличение только уровня противовоспалительного ИЛ-10.

Различия в цитокиновом профиле прослеживались и по соотношению между провоспалительными и противовоспалительными факторами, рассчитанному по коэффициенту ИФНγ/ИЛ-10. У интактных мышей в сыворотке крови преобладали противовоспалительные влияния, в ткани легких соотношение регуляторных цитокинов было более уравновешенным. Зафиксировано значительное повышение регуляторного коэффициента в сыворотке крови и снижение его в супернатантах легочной ткани при заражении мышей *Enterobacter* spp., что свидетельствовало

Таблица

Иммунный регуляторный коэффициент при экспериментальной пневмонии

Параметр эксперимента		ИФН γ /ИЛ-10			
		1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	контроль
Сыворотка крови	<i>Enterobacter</i> spp.	0,47 $\pm$ 0,09*	0,45 $\pm$ 0,02*	0,61 $\pm$ 0,05*	0,20 $\pm$ 0,01
	<i>E. coli</i>	0,24 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,05*	0,41 $\pm$ 0,07*	
Супернатант	<i>Enterobacter</i> spp.	0,38 $\pm$ 0,01*	0,42 $\pm$ 0,05*	0,23 $\pm$ 0,01*	0,87 $\pm$ 0,03
	<i>E. coli</i>	0,55 $\pm$ 0,01*	0,38 $\pm$ 0,09*	0,34 $\pm$ 0,05*	

* Разница с контролем статистически значима.

о преобладающем противовоспалительном влиянии в легочной ткани весь период наблюдения (табл.).

Таким образом, мониторинг при энтеробактериальной пневмонии в эксперименте позволил зафиксировать повышенную продукцию ИФН γ с одновременно резко усиленной продукцией ИЛ-10. При пневмонии, вызванной *E. coli*, уровень ИФН γ мало отличался от контрольных значений, а уровень ИЛ-10 был значимо ниже его величин в сыворотке крови интактных животных. Различия в динамике выработки локальных цитокинов зависели от этиологии пневмонии. Значительная ранняя локальная активация ИЛ-10 и выраженная депрессия ИФН γ , зарегистрированная спустя 2 недели, зафиксированы при пневмонии, вызванной *Enterobacter* spp. Это свидетельствовало о развитии глубокого дефекта клеточно-опосредованного иммунитета, так как ранняя и избыточная продукция противовоспалительных цитокинов изменяет последовательность механизмов противоинфекционной защиты и усугубляет течение воспалительного процесса. При заражении мышей *E. coli* регистрировалось нарастающее локальное преобладание ИЛ-10 без изменения концентрации ИФН γ в динамике, что указывало на недостаточную активацию клеточного звена иммунитета. Таким образом, и *Enterobacter* spp., и *E. coli* оказывают выраженное иммунодепрессивное влияние на легочные факторы защиты, что необходимо учитывать при выборе методов патогенетической терапии нозокомиальной пневмонии.

Литература.

- Домникова Н.П., Сидорова Л.Д., Непомнящих Г.И. Внутрибольничные пневмонии: патоморфогенез, особенности клиники и терапии, критерии прогноза. М.: изд-во РАМН, 2003. 287 с.
- Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий // Вестник РАМН. 2000. № 1. С. 13–17.
- Туйгунов М.М., Табидуллин З.Г., Зурочка А.В., Бухарин О.В. Молекулярные механизмы взаимоотношений организма и патогенных энтеробактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 4. С. 23–27.
- Abroad C., Chaaria A., Bronchard R., Armand-Lefevre L., Montravers P., Rygniera B., Wolff M., Lucet J.-C. High level cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* ventilator-associated pneumonia: prognostic factors based on a cohort study // J. Hospital infection. 2011. Vol. 77, Is. 1. P. 64–69.
- Chawla R. Epidemiology, etiology, and diagnosis of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in Asian countries // Am. J. Infect. Control. 2008. Vol. 36. P. 93–100.
- Gordon S.B., Read R.C. Macrophage defenses against respiratory tract infections // Br. Med. Bul. 2002. Vol. 61. P. 45–61.
- 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.
- 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, No. 4. P. 742–751.
- Masterton R., Craven D., Rello J. et al. Hospital-acquired pneumonia guidelines in Europe: a review of their status and future development // Journal Antimicrob. Chemother. 2007. Vol. 60. P. 206–213.
- Masterton R.G., Galloway A., French G. et al. Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia in the UK: report of the working party on hospital-acquired pneumonia of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy // J. Antimicrob. Chemother. 2008. Vol. 62. P. 5–34.
- Muehlstedt S.G., Richardson C.J., West M.A. et al. Cytokines and the pathogenesis of nosocomial pneumonia // Surgery. 2001. Vol. 130. P. 6002–6011.
- Rotstein C., Evans G., Born A. et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2008. Vol. 19, No. 1. P. 19–53.
- Vincent J. Nosocomial infections in adult intensive-care units // Lancet. 2003. Vol. 361. P. 2068–2077.

Поступила в редакцию 25.01.2011.

ROLE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN CYTOKINE IMBALANCE IN CASE OF PNEUMONIA

A.V. Kostyushko^{1,2}, N.M. Kondrashova¹¹ Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), ² Medical and Diagnostic Center "Metchnikoff" (2a Captain Shefner St. Vladivostok 690001 Russia)

Summary – The rat-experiments allowed identifying differences between the levels of systemic and local cytokines and dynamics of their production, depending on the aetiology of pneumonia. *Enterobacter*-induced pneumonia was characterized by increasing systemic production of g-interferon and interleukin-10. In case of pneumonia caused by *Escherichia coli*, the level of interferon did not change; the level of interleukin-10 in blood serum was considerably lower than that of intact animals. The local level of cytokines in case of pneumonia caused by *Enterobacter* spp. was characterised by activation of interleukin-10 and suppression in production of g-interferon measured two weeks after infection. The growing local prevalence of interleukin-10 concentration was observed in case of mice infected with *E. coli*. Therefore, *Enterobacter* spp. and *E. coli* have evident immune-depressive effects on pulmonary defence factors required to be taken into account when choosing methods of pathogenetic therapy of nosocomial pneumonia.

Key words: cytokines, experimental pneumonia, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 3, p. 36–38.