

С.Н. Серебренникова ¹, И.Ж. Семинский ¹, И.В. Клименков ², Н.В. Семенов ¹

РОЛЬ АЗОКСИМЕРА БРОМИДА В МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ В ОЧАГЕ МИКРОБНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

¹ Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

² Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)

В статье представлен механизм регулирующего действия азоксимера бромида на показатели клеточных фаз микробного воспаления с определением концентраций интерлейкина-1 β , интерлейкина-10, кортикостерона. Выявлено, что стафилококковое воспаление имеет тенденцию к хронизации процесса, однако применение азоксимера бромида сокращает длительность клеточных фаз воспаления, активизирует функции клеток, реализующих воспалительный процесс, оптимизирует синтез интерлейкинов и кортикостерона, препятствуя хронизации воспаления.

Ключевые слова: стафилококк, воспаление, интерлейкины, кортикостерон, азоксимера бромид

THE ROLE OF AZOXIMERA BROMIDE IN REGULATORY MECHANISMS OF CELL'S REACTIONS AT THE MICROBIC INFLAMMATION

S.N. Serebrennikova ¹, I.Zh. Seminsky ¹, I.V. Klimenkov ², N.V. Semenov ¹

¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk

² Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk

The regulatory mechanisms of azoximera bromide on the characteristics of cell's phases experimental microbic inflammation with indicate concentrations of interleukin-1 β , interleukin-10, corticosterone are presented. The inflammation of staphylococcus is a chronic process, however azoximera bromide shorten time cell's phases of inflammation, activate functions of inflammatory cells, optimize synthesis of interleukins and corticosterone, preclude from chronization inflammation.

Key words: staphylococcus, inflammation, interleukins, corticosterone, azoximera bromide

В нормальных условиях острое воспаление завершается быстро, но воспалительный процесс может переходить в хроническую форму, если нарушены механизмы его регуляции или если патоген не полностью удален [5]. Некоторые микроорганизмы, в том числе *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), имеют в клеточной оболочке компоненты, обуславливающие резистентность к фагоцитозу [13], что приводит к преобладанию деструктивных форм лейкоцитов в очаге воспаления, незавершенному фагоцитозу и хронизации воспалительного процесса [3]. К патогенным факторам *S. aureus* относятся микрокапсула [14], компоненты клеточной стенки [2], токсины [9] и ферменты [15].

Азоксимера бромид является высокомолекулярным химически чистым иммуномодулятором, полученным с помощью направленного химического синтеза [7, 12], обладающий широким спектром фармакологического действия на организм — иммуномодулирующего, детоксицирующего, антиоксидантного, мембранопротективного [6, 8, 11]. Однако, конкретный механизм действия азоксимера бромида на все фазы воспалительного процесса: лейкоцитарную, макрофагическую и, особенно, фибробластическую, и на регуляторные механизмы, определяющие кооперацию клеток в очаге воспаления на разных стадиях процесса, до конца не изучен.

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования было выявление закономерностей изменения клеточных реакций и механизмов их

регуляции в очаге экспериментального микробного воспаления под влиянием азоксимера бромида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 230 беспородных белых крысах-самцах массой 180 — 220 г. Экспериментальное микробное воспаление у лабораторных крыс (1-я серия) было смоделировано путем введения под кожу бедра диффузионной камеры размером 1 × 3 мм, объемом 2,5 мм³, заполненной водной взвесью 24-часовой культуры *S. aureus* № 25943 (F-49) АТСС в дозе 10⁷ микробных тел на 1 мл, полученной по стандарту мутности. Животным 2-й серии аналогично моделировался микробный воспалительный процесс с последующим внутримышечным введением 0,06 мл иммуномодулятора азоксимера бромида в течение 7 дней. У крыс производился забор образцов тканей с камерами через 12 ч, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60 суток от начала воспаления для количественной оценки клеточных реакций с помощью морфологических методов исследования. В очагах воспаления регистрировали толщину лейкоцитарного вала вокруг стенки камеры, концентрацию клеток в вале, толщину фибробластической капсулы вокруг лейкоцитарного вала, число слоев фибробластов, концентрацию фибробластов в капсуле.

В течение первых 5 суток воспалительного процесса у животных осуществлялся забор крови для определения интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-10 (IL-10), кортикостерона с помощью иммуно-

ферментного метода исследования. Интерлейкины исследовались с помощью тест-наборов «Rat IL-1 β ELISA BMS630» и «Rat IL-10 ELISA BMS629» (Bender MedSystems, Vienna, Austria), кортикостерон — «Reagents for rat corticosterone ELISA» (Sigma, USA). Для определения фагоцитарных числа (ФЧ) и индекса (ФИ) у крыс использовалось содержимое диффузионных камер. Группу сравнения составили 10 здоровых интактных белых крыс-самцов.

Работа проводилась с учетом требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях, и была одобрена этическим комитетом ИГМУ.

Статистический анализ результатов производили с помощью пакета компьютерных программ BioStat, Microsoft Excel 2003, 2007 для Windows XP. Для показателей определялись среднее арифметическое ($\bar{M}$), среднее квадратичное отклонение (s), коэффициенты корреляции (r). Сравнение средних значений независимых выборок при их нормальном распределении осуществляли по t -критерию Стьюдента и F -критерию Фишера. Для проверки соответствия распределения выборочных значений закону нормального распределения применяли критерий Колмогорова — Смирнова. В условиях неподчинения закону нормального распределения применяли U -критерий Манна — Уитни. Различия величин признавали статистически значимыми при критическом уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лейкоцитарная фаза при моделировании микробного воспаления регистрировалась с 1-х по 7-е сутки воспалительного процесса. Толщина лейкоцитарного вала постепенно нарастала с максимумом на срок 3 суток — $349,4 \pm 40,3$ мкм, плотность клеток в вале была 20–25 клеток на 1000 мкм² с преобладанием нейтрофилов, характеризующихся незавершенным фагоцитозом и значительным аутолизом. ФЧ составляло 4–6 микробных тел на клетку, ФИ — 60–70 %. Начиная с 7-х суток от начала воспаления в лейкоцитарном вале начинали преобладать макрофаги, клеточный вал становился менее плотным — $18,9 \pm 0,7$ на 1000 мкм². Толщина вала снижалась до $208,7 \pm 28,4$ мкм. Часть макрофагов подвергалась деградации и аутолизу. Формирующаяся по периферии лейкоцитарного вала фибробластическая капсула имела толщину $245,0 \pm 37,8$ мкм, 4–5 слоев фибробластов образовывали параллельные ряды. В капсуле преобладали малодифференцированные формы фибробластов, синтез коллагена осуществлялся слабо. Только к 20-м суткам воспалительного процесса произошло уменьшение толщины лейкоцитарного вала до $167,5 \pm 46,2$ мкм. Фибробластическая капсула медленно уплотнялась и до 60-х суток оставалась незрелой с толщиной 250–350 мкм, недостаточным количеством коллагена, маленькой плотностью фибробластов, наличием макрофагов.

У крыс этой серии было зарегистрировано интенсивное увеличение концентрации IL-1 β в плазме

крови с максимумом через 2 суток ($28,9 \pm 1,7$ пг/мл) от начала процесса и последующим резким его снижением, но фоновое нулевое значение на 5 сутки достигнуто не было. Полученная динамика IL-1 β согласуется с данными литературы, что факторы вирулентности стафилококка усиливают синтез IL-1 β макрофагами [2]. Со стороны противовоспалительного IL-10 регистрировалось падение его концентрации в плазме крови крыс на срок 12 ч ($4,4 \pm 1,0$ пг/мл) от начала микробного воспаления (фоновое значение IL-10 — $22,9 \pm 4,3$ пг/мл). Далее уровень IL-10 увеличивался с максимальным значением через 2 суток ($50,6 \pm 5,9$ пг/мл) от начала воспаления и последующим снижением вплоть до 5 суток исследования. С 12 часов от начала микробного воспаления оба интерлейкина имели схожую динамику: максимум концентраций в плазме крови через 2 суток с дальнейшим снижением их показателей. Можно предположить, что одновременный пик концентраций IL-1 β и IL-10 ($r = 0,7$; $p \leq 0,05$) связан с цитотоксическим действием факторов вирулентности стафилококка на фагоцитирующие клетки. В процессе повреждения и лизиса нейтрофилов и макрофагов под действием бактериальных токсинов, по-видимому, происходит параллельный выброс ими провоспалительного и противовоспалительного интерлейкинов.

Со стороны кортикостерона отмечено снижение его концентрации в плазме крови крыс, по сравнению с контрольными показателями ($37,2 \pm 3,2$ нмоль/л), на протяжении всех 5 суток определения. Только на срок 2 суток наблюдался незначительный подъем глюкокортикоида практически до контрольного значения на фоне максимального уровня IL-1 β в плазме крови, который, по-видимому, оказал небольшой стимулирующий эффект на выработку кортикостерона ($r = 0,3$; $p \leq 0,05$), так как из литературных данных известно, что IL-1 β стимулирует образование глюкокортикоидов в организме [1, 4, 10]. В дальнейшие сроки воспалительного процесса наблюдалось одновременное снижение в плазме крови концентраций кортикостерона, IL-1 β и IL-10.

Таким образом, по нашему мнению, при стафилококковом воспалении происходит нарушение эффективности и преемственности между про- и противовоспалительными регуляторными механизмами, что способствует формированию неполноценного затяжного воспалительного ответа.

У животных с микробным воспалением с коррекцией азоксимера бромидом, лейкоцитарная фаза воспаления протекала в течение 5 суток. Максимальная толщина лейкоцитарного вала регистрировалась на срок 1 сутки — $340,0 \pm 42,4$ мкм. Среди клеточных форм преобладали нейтрофилы, которые интенсивно фагоцитировали фрагменты разрушенных тканей, клетки стафилококка. Их фагоцитарная активность была выше ($p \leq 0,05$), чем в серии с микробным воспалением (ФЧ = 8–10 микробных тел на клетку; ФИ = 70–75 %). Начиная с 5-х суток, в очаге воспаления преобладали

макрофаги, которые к 15-м суткам от момента введения камер полностью очистили зону повреждения от стафилококка, нейтрофильного детрита, девитализированных тканей, что позволило фибробластам эффективно формировать соединительнотканную капсулу. Фибробластическая фаза воспаления началась с 3-х суток, когда вокруг камер по периферии клеточного вала появилась тонкая фибробластическая капсула, которая закономерно развивалась, достигнув максимальной толщины на 10-е сутки — $318,3 \pm 46,2$ мкм. Начиная с 10-х суток происходило уплотнение фибробластической капсулы, уменьшение ее толщины, снижение синтеза коллагена, трансформация фибробластов в фиброциты, образование новых капилляров.

Пик концентрации провоспалительного IL-1 β зарегистрирован через 1 сутки ($21,2 \pm 2,8$ пг/мл) от начала процесса, при этом значение его было ниже ($p \leq 0,05$), чем в серии с микробным воспалением, с дальнейшим снижением его уровня. Можно предположить, что более низкий уровень провоспалительного цитокина явился результатом протективного эффекта азоксимера бромида на фагоцитирующие клетки в отношении токсинов стафилококка, которые вызывают чрезмерную активацию и цитоллиз этих клеток с выбросом достаточно больших концентраций IL-1 β .

Подъем уровня IL-10 в плазме крови наблюдался через 12 ч после имплантации диффузионных камер крысам в отличие от стафилококкового воспаления ($p \leq 0,05$), где на этот срок регистрировалось снижение IL-10 в крови. Через 1 сутки от начала микробного воспаления с коррекцией азоксимера бромидом концентрация IL-10 снижалась, что соответствовало максимальному значению IL-1 β . Далее следовал пик концентрации IL-10 на 2-е сутки ($84,4 \pm 5,8$ пг/мл) с последующим уменьшением его значения, но, вплоть до 5 суток воспалительного процесса, IL-10 сохранял высокие цифры концентрации. Можно предположить, что азоксимера бромид активирует продукцию и оптимизирует сроки выработки противовоспалительного IL-10, чем способствует более быстрому затуханию воспалительного процесса.

У крыс этой серии наблюдалось увеличение уровня кортикостерона достаточно значительное на протяжении всех 5 суток исследования, по сравнению с фоновыми показателями и уровнями, полученными в серии микробного воспаления без применения иммуномодулятора ($p \leq 0,05$). Максимальная концентрация в плазме крови кортикостерона регистрировалась через 1 сутки от начала процесса ($64,6 \pm 4,7$ нмоль/л), что соответствовало пику IL-1 β ($r = 0,6$; $p \leq 0,05$) и падению уровня IL-10 ($r = -0,8$; $p \leq 0,05$) на этот срок. Далее содержание кортикостерона снижалось на фоне повышения уровня IL-10.

Таким образом, можно предположить, что при микробном воспалении токсины стафилококка привели к хронизации процесса, нарушив механизмы регуляции клеточных реакций. Кор-

ректирующее действие азоксимера бромида на клеточные реакции в очаге микробного воспаления предупредило механизмы хронизации, улучшило его течение и исход. Применение азоксимера бромида сократило течение всех фаз воспаления, оптимизировало выработку и соотношение IL-1 β , IL-10 и кортикостерона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г., Гриневич В.В. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2001. — Т. 131, № 1. — С. 22–33.
2. Белобородов В.Б., Митрохин С.Д. Стафилококковые инфекции // Consilium medicum. — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 21–34.
3. Варюшина Е.А., Москаленко В.В., Симбирцев А.С. Ранозаживляющее и местное иммуностимулирующее действие рекомбинантного IL-1 β человека при применении у больных с длительно незаживающими ранами и трофическими язвами // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 2. — С. 54–62.
4. Василенко А.М., Захарова Л.А. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета // Успехи современ. биологии. — 2000. — Т. 120, № 2. — С. 174–189.
5. Ильина Н.И., Гудима Г.О. Воспаление и иммунитет в общеклинической практике. Общая концепция // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 42–44.
6. Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Посисеева Л.В. Возможности использования полиоксидония в лечении больных миомой матки // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 225–228.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. Полиоксидоний — иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения // Аллергия, астма и клинич. иммунология. — 1999. — № 3. — С. 7–12.
8. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Разживина Н.В. Эффективность применения полиоксидония в комплексном лечении герпетических поражений ротовой полости // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 211–214.
9. Сабирова Е.В., Гординская Н.А., Абрамова Н.В. Антибиотикорезистентность нозокомальных штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных в ожоговом центре в 2002 — 2008 гг. // Клинич. микробиология. и антимикробная химиотерапия. — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 77–81.
10. Сибиряк С.В. Цитокины как регуляторы цитохром P450-зависимых монооксигеназ. Теоретические и прикладные аспекты // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 12–21.
11. Тузанкина И.А., Филимонкова Н.Н., Бердникова Э.Р. Применение полиоксидония в терапии вульгарного псориаза // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 239–243.
12. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 4–7.

13. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии // Иммунология. — 1998. — № 2. — С. 9—13.

14. Cunnion K.M., Lee J.C., Frank M.M. Capsule production and growth phase influence binding of

complement to *Staphylococcus aureus* // Infect Immun. — 2001. — Vol. 69. — P. 6796—6803.

15. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* // Clinical Microbiology Reviews. — 2000. — Vol. 13, № 1. — P. 16—34.

Сведения об авторах

Серебренникова Светлана Николаевна – ассистент кафедры патологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ИГМУ (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: (3952) 24-07-65, сот. тел.: 89086476376; e-mail:)

Семинский Игорь Жанович – заведующий кафедрой патологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ИГМУ, доктор медицинских наук, профессор (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: (3952) 24-07-65; e-mail: igorsemin59@mail.ru)

Клименков Игорь Викторович – старший научный сотрудник отдела «Ультраструктуры клетки» ЛИИ СО РАН, кандидат биологических наук, доцент (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел.: (3952) 42-32-80; e-mail: iklimen@mail.ru)

Семенов Николай Владимирович – старший преподаватель кафедры нормальной физиологии ИГМУ, кандидат медицинских наук, доцент (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 3; тел.: (3952) 24-07-72)