

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ МАКРОЛИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ *IN VITRO*

© 2018 г. И. Л. Батурина¹, А. Ю. Савочкина¹, К. Г. Громакова^{1,2},
К. В. Никушкина¹, И. В. Емельянов^{1,2}, М. А. Зотова¹, Е. А. Мезенцева¹

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства
Здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 22.04.2018. Принята: 17.06.2018

Дозозависимые эффекты антибиотиков и их влияние на иммунокомпетентные клетки организма, в частности нейтрофильные гранулоциты, до сих пор остаются малоизученными. Методом проточной цитометрии была определена минимальная действующая доза (МДД) хемомицина путем оценки дегрануляции нейтрофильных гранулоцитов. Было установлено, что при действии МДД хемомицина нейтрофилы образуют нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ), являющиеся одним из механизмов адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: хемомицин (азитромицин), NETs, нейтрофильные гранулоциты, дегрануляция, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210002384-7

Адрес: 454092 Челябинск, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «Научно-исследовательский институт иммунологии», Батурина Ирина Леонидовна
Тел.: +79089773601.

Е-mail: irisha_baturina@mail.ru

Авторы:

Батурина И. Л., к. м. н., с. н. с., ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия;

Савочкина А. Ю., д. м. н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, г. н. с., ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия;

Громакова К. Г., старший лаборант, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия;

Никушкина К. В., к. м. н., в. н. с., ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия;

Емельянов И. В., старший лаборант, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия;

Зотова М. А., к. б. н., научный сотрудник, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия;

Мезенцева Е. А., к. м. н., с. н. с., ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В апреле 2014 года Всемирная организация здравоохранения опубликовала доклад, в котором ее эксперты еще раз предупреди-

ли о грозящей человечеству опасности: отсутствие действенных антибиотиков делает весьма сложными, либо вообще невозможными многие стандартные медицинские вмешательства, такие как хирургические операции, химиотерапия, трансплантация органов и даже лечение мелких травм и ожогов [1]. Речь идет о так называемом «кризисе антибиотикотерапии». Доступность и дешевизна антибиотиков способствовали нерациональному использованию, выходящему за рамки строгих показаний, дозировки и длительности курсов. Это привело к снижению их эффективности за счет появления штаммов болезнетворных бактерий, устойчивых даже к самым сильным препаратам [1, 3].

Фундаментальной характеристикой действия антибиотиков на клетки макроорганизма является наличие определенного дозозависимого эффекта, который, как правило, возрастает до определенного максимального уровня, а затем по мере увеличения концентрации препарата снижается и может, в ряде случаев, измениться на противоположный (колоколообразная зависимость). С другой стороны, действие анти-

биотиков на клетки макроорганизма во многом зависит от их исходного функционального состояния на той или иной стадии воспалительного процесса. Таким образом, конечный результат действия антибиотиков на клетки определяется как локальной концентрацией препарата в очаге воспаления и в клетке, так и функциональным состоянием клетки-эффектора [2].

Разумеется, оценка указанных параметров в очаге воспаления *in vivo* весьма затруднительна. Поэтому прогноз влияния антибиотиков на стадии воспалительного процесса строится на сегодняшней день лишь на основании косвенных экспериментальных данных, в большинстве своем полученных в экспериментах *in vitro* при дискретном, хотя и достаточно широком, наборе концентраций препарата [4].

Несмотря на указанные методологические трудности, к настоящему времени получены данные о важной регуляторной роли антибиотиков в воспалительных реакциях организма [4].

Известно, что антибиотикотерапия может оказывать влияние на функциональные способности клеток иммунной системы как на местном, так и системном уровнях [3].

Изучение влияния антибиотиков на иммунную систему в последние годы проводилось многими исследователями как *in vitro*, так и *in vivo* [5], а также с использованием экспериментальных моделей линейных животных [6]. Однако результаты, полученные различными группами исследователей в ряде случаев противоречивы и неоднозначны, в связи с чем представления об эффектах влияния антибиотикотерапии на функции клеток иммунной системы требуют обоснования и подкрепления фактическими данными [5].

В настоящее время для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний в общеклинической практике используются антибиотики широкого спектра действия, в основном защищенные пенициллины и макролиды [2].

Ренессанс макролидов, который мы наблюдали в конце XX века, вызванный вышеуказанными причинами, сделал эти препараты (прежде всего так называемые «новые» макролиды, с улучшенными фармакокинетическими свойствами) одними из наиболее широко применяемых в амбулаторной практике.

Открытие и внедрение в клиническую практику антибиотиков группы макролидов стало одним из крупнейших достижений в истории антимикробной терапии. Оно пришлось на пе-

риод, когда в арсенале клиницистов имелось крайне ограниченное число препаратов. Среди макролидов лидирующие позиции занимает азитромицин, входящий в число самых широко используемых в мире антимикробных средств [1]. Азитромицин выгодно отличается от других макролидов по созданию высоких концентраций в очагах инфекций — в 30–50, а по некоторым данным в 100 раз больше, чем в сыворотке. Создание высоких концентраций в тканях и длительный $T_{1/2}$ обусловлены невысоким связыванием азитромицина с белками плазмы крови (от 37 до 50%), а также его способностью проникать в клетки и концентрироваться в среде с низким рН, характерным для воспалительного очага инфекции. Азитромицин оказывает двухфазное действие, проявляющиеся в первой фазе стимуляцией дегрануляции нейтрофилов и оксидативного взрыва и во второй — после достижения эрадикации возбудителей — уменьшением продукции интерлейкина-8 и стимуляцией апоптоза нейтрофилов, что сопровождается уменьшением выраженности реакции воспаления. В ряде исследований показано отсроченное влияние азитромицина на иммунную систему и воспаление. Так, спустя 28 дней после приема последней дозы концентрация хемокинов и интерлейкина-8 в сыворотке крови была снижена, при этом имело место усиление апоптоза нейтрофилов [2–4].

Нейтрофильные гранулоциты — самые многочисленные иммунные клетки в человеческой периферической крови, играющие важную роль во врожденном иммунитете, защищая организм от инфекционных агентов. Они осуществляют защитную функцию макроорганизма несколькими стратегиями: дегрануляция, фагоцитоз, выработка высокоактивных кислородсодержащих форм, и, недавно обнаруженный, выброс нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil Extracellular Traps — NETs), названный NETosis. NETs — хрупкие волокна деконденсированного хроматина, усыпанные антимикробными белками и гистонами [5]. Эти нуклеиновые структуры выпущены от клетки для того, чтобы сформировать физический барьер для инфекционных агентов, который ограничивает их распространение по всему организму. Несмотря на их полезную роль, NETs могут способствовать развитию некоторых заболеваний таких как системные, онкологические и тромботические [6]. Поэтому изучение влияния тех или иных препаратов, в частности антибио-

тиков, на функциональную активность нейтрофилов, а именно пути развития защитной реакции (дегрануляция, NETosis, фагоцитоз и т.д.) чрезвычайно важно, поскольку это может помочь разработать новые терапевтические стратегии лечения. Доказаны иммуномодулирующие свойства макролидов, которые были описаны вскоре после их введения в 1950-х [7, 8]. К не антибактериальным эффектам азитромицина относят противовоспалительное, иммуномодулирующее и мукорегулирующее действие. Вышеперечисленные свойства связаны с модулирующим влиянием макролидов на фагоцитоз, хемотаксис, киллинг, апоптоз нейтрофилов [9].

Учитывая вышеизложенное остаются малоизученными дозозависимые механизмы функциональной активности нейтрофилов, в частности, NETosis, что и определило цель нашего исследования.

Цель: Изучение влияния хемомицина (азитромицин) на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек в периферической крови *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе НИИ иммунологии ГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ г. Челябинска в 2018 г. было проведено иммунологическое исследование 20 условно-здоровых доноров (10 мужчин, 10 женщин). Средний возраст обследованных составил 21 ± 1 год. Все женщины были взяты в I фазу менструального цикла и не имели отклонений в гормональном статусе. Условно-здоровые доноры были разделены на 2 группы по гендерному признаку: группа 1 – женщины ($n=10$); группа 2 – мужчины ($n=10$). Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пунктации периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с гепарином («C. D. Rich», Китай). Все исследования проводились в день взятия крови.

Для оценки эффектов влияния макролидов на образование NETs использовали Хемомицин (азитромицин), флаконы 500 мг, («Хемофарм», Сербия). Для подбора минимальной действующей дозы антибиотика (МДД) в гепаринизированную периферическую кровь и чистую культуру клеток вносили предварительно разведенную концентрацию раствора хемомицина (100 мг/мл и 10 мг/мл). В контрольные образцы ничего не добавляли. Время инкубации со стимуляторами составляло 30, 60 минут при 37°C

(время подбиралось из учета максимального действия препарата указанного в инструкции). При завершении инкубации образцы окрашивались смесью антител (производства «BectonCoulter», США) в составе: CD66b-FITC, CD16-Per-PC-7.0. Оценка дегрануляции клеток проводилась по уровню экспрессии маркеров дегрануляции (результаты выражали в геометрической средней интенсивности флуоресцентного сигнала (Geo-Mean) [12]. Из полученных результатов мы сделали вывод о минимально действующей дозе хемомицина (азитромицина) приводящей к дегрануляции нейтрофилов.

Следующим этапом нашего исследования была оценка воздействия МДД хемомицина (азитромицина) на образование нейтрофильных внеклеточных ловушек нейтрофильными гранулоцитами. Из гепарин-стабилизированной периферической крови выделяли мононуклеары на градиенте плотности стерильных растворов фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя – $1,075-1,077$ г/см³, нижнего – $1,093-1,095$ г/см³. Через 40 минут центрифугирования при 1500 об/мин на границе градиентов образовывалось кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, мононуклеары составляли 2% или отсутствовали, а на границе между $1,077$ градиентом и кровью – кольцо мононуклеаров. Кольцо нейтрофилов собирали, переносили в стерильную пробирку. Клетки трижды отмывали от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия центрифугированием при 1500 об/мин 7 минут. Чистую фракцию нейтрофильных гранулоцитов довели до концентрации 5×10^6 клеток/мл.

Для обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек 100 мкл тестируемой взвеси нейтрофилов инкубировали при температуре 37°C с добавлением рабочего раствора акридинового оранжевого в течение 30 и 60 минут в присутствии хемомицина (азитромицина). Для контроля использовали взвесь нейтрофилов, инкубируемых в тех же условиях, но без активаторов. После инкубации клеточную взвесь наносили на стекло и готовили препарат «раздавленная капля». Учет проводили с помощью люминесцентного микроскопа, используя фильтры, обеспечивающие возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм. При таком способе окраски ядра нейтрофилов окрашиваются в ярко-зеленый цвет, цитоплазма гранулоцитов не окрашивается, нейтрофильные ловушки представлены тон-

кими ярко-зелеными нитями, занимающими пространство, в 2–3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила.

Результаты исследования обрабатывались с использованием пакета прикладных программ статистической обработки Microsoft Excel, STATISTICA v.10.0, Past v.3.17.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась стандартными методами, с определением средней арифметической вариационного ряда (M), среднеквадратичного отклонения (σ) и ошибки средней арифметической (m).

О достоверности различий средних величин судили по критерию Стьюдента (t). Во всех случаях различия и зависимости считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$, незначимыми – при $P > 0,10$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке дегрануляции нейтрофильных гранулоцитов было установлено, что нейтрофилы дегранулировали через 60 минут после воздействия хемомицина (азитромицина) в дозе 10 мкг/мл, как в цельной крови (Geo-Mean=11.6), так и в чистой культуре клеток (Geo-Mean=12.6), тогда как при воздействии 100 мкг/мл интенсивность флуоресценции сигнала практически не изменялась и приближалась к значениям группы контроля (таблица 1). Данный факт свидетельствует о том, что хемомицин (азитромицин) изначально вызывает дегрануляцию клеток именно через 1 час после воздействия антибиотика на клетки, что подтверждает действие данного антибиотика на механизм дегрануляции нейтрофилов и максимальное дей-

Таблица 1. Оценка дегрануляции нейтрофилов в ответ на различные дозы хемомицина в разные интервалы времени, (Geo-Mean)

Доза хемомицина	Группа контроля		Хемомицин			
	нейтрофилы	кровь	нейтрофилы		кровь	
	0 минут	0 минут	30 минут	60 минут	30 минут	60 минут
Без активатора, 0 мкг/мл	4,4	2,8	-	-	-	-
10 мкг/мл	3,8	2,9	4,0	12,6	5,8	11,6
100 мкг/мл	2,7	3,0	2,9	3,8	4,4	8,7

Примечание: Geo-Mean – геометрическая средняя интенсивность флуоресцентного сигнала.

Таблица 2. Спонтанное образование НВЛ в группах мужчин и женщин в разные интервалы времени. ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Образование НВЛ без активатора	
	30 минут	60 минут
Женщины (группа 1)	6,7±0,8	12,9±0,8* $P_{1-2}=0,001$
Мужчины (группа 2)	3,8±0,7	14,3±1,0* $P_{1-2}=0,0001$

Примечание: * – статистически значимые различия $p < 0,05$, P_{1-2} – достоверные отличия между группой 1 и группой 2.

Таблица 3. Образование НВЛ в группах мужчин и женщин в ответ на воздействие хемомицина через 60 минут ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Образование НВЛ без активатора	Образование НВЛ при действии хемомицина
Женщины (группа 1)	12,9±0,8	32,8±2,2* $P_{1-2}=0,001$
Мужчины (группа 2)	14,3±1,0	25,7±3,7* $P_{1-2}=0,0001$

Примечание: * – статистически значимые различия $p < 0,05$, P_{1-2} – достоверные отличия между группой 1 и группой 2.

ствие препарата именно через 1 час после его воздействия [12].

С учетом установленной нами МДД хемомицина (азитромицина), следующим этапом нашего исследования явилась оценка процесса ловушкообразования в чистой фракции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии антибиотика. В результате проведения сравнения было установлено, что спонтанное образование ловушек максимально наблюдалось через 60 мин. и было одинаковым как в группе женщин (гр.1), так и в группе мужчин (гр.2) (**таблица 2**). Полученные данные согласуются с данными литературы о времени образования НВЛ в периферической крови [13]. При воздействии хемомицина (азитромицина), установлено что образование НВЛ достоверно увеличилось через 60 мин в 2 и более раз по сравнению с группой контроля в обеих группах (**таблица 3**). В группах 1 и 2 достоверных различий найдено не было, что подтверждает данные об отсутствии гендерных отличий в образовании НВЛ [13, 14, 15]

Учитывая вышеизложенное, мы пришли к выводу, что:

1. Подбор минимальной действующей дозы препаратов, в частности азитромицина, наиболее эффективно проводить методом проточной цитометрии с учетом известного действия лекарственного вещества на механизм дегрануляции клеток.

2. Минимально действующая доза хемомицина (азитромицина) приводила к увеличению процессов образования внеклеточных ловушек в 2 и более раз.

3. Вероятно выброс экстрацеллюлярных сетей нейтрофилов возможно является еще одним механизмом воздействия хемомицина (азитромицина) на адаптивного иммунный ответ и подтверждает влияние данного антибиотика на иммунологическую реактивность организма.

Таким образом, изучение дозозависимых эффектов антибиотиков, а именно хемомицина (азитромицина), на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов является перспективным направлением исследований и требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Peters D. H., Friedel H. A., McTavish D.* Azithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drug* 1992;44:750–799.
2. *Labro M. T.* Antibiotics as anti-inflammatory drugs. *Curr. Op. Investig. Drugs.* 2002; 3, 61–68.
3. *Tamaoki J.* The effects of macrolides on inflammatory cells. *Chest.* 2004; 125, Suppl., 41S – 51S.
4. *Lai P. C., Schibler M. R., Walters J. D.* Azithromycin enhances phagocytic killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 by human neutrophils. *J. Periodontol.* 2015, 86, 155–161.
5. *Branzk N.; Papayannopoulos V.* Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin. Immunopathol.* 2013, 35, 513–530.
6. *Zuckerman J. M.* Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. *Infect Dis Clin North Am*(2004) 18(3):621–49.
7. *Ho W., Eubank T., Leblebicioglu B., Marsh C., Walters J.* Azithromycin decreases crevicular fluid volume and mediator content. *J Dent Res* (2010) 89(8):831–5.
8. *Woo P. C., Lau S. K., Yuen K. Y.* Macrolides as immunomodulatory agents. *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & Anty-Allergy Agents* 2002; 1:131–41.
9. *Hoeben D.; Dosogne H.; Heyneman R.; Burvenich C.* Effect of antibiotics on the phagocytotic and respiratory burst activity of bovine granulocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, 332, 289–297.
10. *Jerjomiceva N., Seri H., Vollger L., Wang Y., Zeitouni N., Naim H.Y., von Kockritz-Blickwede M.* Enrofloxacin enhances the formation of neutrophil extracellular traps in bovine granulocytes. *J. Innate Immun.* 2014, 6, 706–712.
11. *Schilcher K., Andreoni F., Uchiyama S., Ogawa T., Schuepbach R. A., Zinkernagel A. S.* Increased neutrophil extracellular trap-mediated *Staphylococcus aureus* clearance through inhibition of nuclease activity by clindamycin and immunoglobulin. *J. Infect. Dis.* 2014, 210, 473–482.
12. *Асадуллина И. А., Серебрякова М. К., Кудрявцев И. В.* Роль аденозинтрифосфата в регуляции процессов дегрануляции нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека *in vitro*. *Российский иммунологический журнал*, 2017, 11, 96–96. [*Asadullina I. A., Serebryakova, M. K., Kudryavtsev I. V.* Role of adenosine triphosphate in the regulation of the degranulation process of neutrophils and monocytes of peripheral human blood *in vitro*. *Russian journal of immunology*, 2017, 11, 96–96].
13. *Савочкина А. Ю.* Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль: диссертация доктора медицинских наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2012.— 212 с. [*Savochkina A. Y.* Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, methods of detection, biological role: dissertation of doctor of medical Sciences. Chelyabinsk state Medical Academy.— Chelyabinsk, 2012.— 212 p.].
14. *Смирнова Т. Г.* Влияние женских половых стероидных гормонов на механизмы внутри- и внеклеточной бактерицидности фагоцитирующих клеток: диссертация кандидата биологических наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2014.— 201 с. [*Smirnova T. G.* the influence of female sex steroid hormones on the

mechanisms of intra—and extracellular bactericidal activity of phagocytic cells: thesis candidate of biological sciences. Chelyabinsk state medical Academy.—Chelyabinsk, 2014.— 201 p. Chelyabinsk, 2013].

15. *Маркова В.А.* Сравнительный анализ функциональных свойств нейтрофильных гранулоцитов периферической крови и мукозальных секретов у здоровых мужчин и женщин: диссертация кан-

дидата биологических наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2014.— 136 с. [*Markova V.A.* Comparative analysis of functional properties of neutrophil granulocytes of peripheral blood and mucosal secrets in healthy men and women: thesis of candidate of biological sciences. Chelyabinsk state medical Academy.—Chelyabinsk, 2014.— 136 p.]

PECULIARITIES OF THE EXPOSURE OF THE ANTIBIOTICS OF THE MACROLID GROUP ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD *IN VITRO*

© 2018 **Baturina I. L.¹, Savochkina A. Y.¹, Gromakova K. G.^{1,2}, Nikushkina K. V.¹, Emelyanov I. V.^{1,2}, Zotova M. A.¹, Mezentseva E. A.¹**

¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Received: 22.04.2018 Accepted: 17.06.2018

Dose-dependent effects of antibiotics and their effect on immune cells of the body, in particular neutrophilic granulocytes, are still poorly understood. The method of flow cytometry was determined by the minimum effective dose of chemomycin by assessing the degranulation of neutrophils. It was found that under the action of minimum effective dose chemomycin neutrophils form neutrophil extracellular traps (NETs), which are one of the mechanisms of adaptive immunity. It is noteworthy that the release of NETs in response to the action of chemomycin was not dependent on gender.

Key words: chemomycin (azithromycin), NETs, neutrophil granulocytes, degranulation, flow cytometry

Authors:

Baturina I. L., ✉ PhD, Senior Researcher, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia; 454092, Chelyabinsk, South Ural State Medical University, Research Institute of Immunology. Phone: +79089773601 E-mail: irisha_baturina@mail.ru

Savochkina A. Y., MD, PhD, Professor, Chief Researcher, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia;

Gromakova K. G., Senior Assistant, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia;

Nikushkina K. V., PhD, Leading Researcher, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia;

Emelyanov I. V., Senior Assistant, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia;

Zotova M. A., PhD, Researcher, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia;

Mezentseva E. A., PhD, Senior Researcher, Research Institute of Immunology, Chelyabinsk, Russia.