

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2018 г. А. И. Смолягин, Б. А. Фролов, Ю. В. Филиппова,
Т. В. Панфилова, А. Д. Железнова, Е. В. Ермолина,
Ю. А. Сарычева, А. А. Токарева

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия

Поступила: 08.05.2018. Принята: 18.06.2018

Проведено сравнительное изучение протективного действия милиацина и галавита при синегнойной инфекции у мышей. Установлено, что милиацин и галавит снижали гибель животных, ограничивали гипоплазию тимуса и костного мозга, уменьшали стимулированную продукцию ИЛ-17.

Ключевые слова: мыши, синегнойная инфекция, милиацин, галавит

DOI: 10.31857/S102872210002423-0

Адрес: 460000 Оренбург, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Смолягин Александр Иванович. Тел.: 8(3532)50 06 06 (доб. 203).
E-mail: probllab.orenbur@mail.ru

Авторы:

Смолягин А. И., д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Фролов Б. А. д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Филиппова Ю. В., научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Панфилова Т. В., к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Железнова А. Д., к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Ермолина Е. В., к.б.н., старший научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Сарычева Ю. А., к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Токарева А. А., к.м.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Данные литературы свидетельствуют о возрастании удельного веса синегнойной палочки как этиологического фактора инфекционных осложнений и самостоятельных нозологических форм заболеваний. При синегнойной инфекции на передний план выступают факторы, влияющие на состояние иммунной системы макроорганизма [1, 2]. Учитывая тот факт, что химиотерапия при данном заболевании сталкивается с трудностями, обусловленными как природой этой инфекции, так и ограниченным числом антибиотиков к которым *Pseudomonas aeruginosa* чувствительна, все большее значение приобретает применение иммуномодуляторов [3].

Одним из направлений, повышающих эффективность патогенетической терапии инфекционных заболеваний и вторичных иммунодефицитных состояний, является использование иммуномодуляторов и разработка адекватных методов направленной иммунокоррекции. В последние годы все большее внимание уделяется использованию отечественного иммуномодулятора — галавита, обладающего противовоспалительным и иммуномодулирующим действием. Данный препарат стимулирует синтез противовоспалительных цитокинов гиперактивирован-

ными макрофагами, повышает уровень и функциональную активность иммуноглобулинов [4].

В настоящее время к числу перспективных иммунокорректоров отнесены тритерпеноиды — вещества, обладающие широким спектром биологического действия, включая способность к стимуляции гуморального и клеточного иммунного ответа. К числу таких веществ относится милиацин — пентациклический тритерпеноид растительного происхождения, показавший иммуностимулирующий эффект в вакцинальном процессе, а также иммунопротекторное влияние в условиях иммунодепрессии, обусловленное в том числе его антиоксидантным действием [5]. Вместе с тем вопрос о защитном влиянии милиацина в отношении инфекционного процесса, вызванного *Pseudomonas aeruginosa*, остается открытым.

Цель работы — сравнительная характеристика протективного действия милиацина и галавита при экспериментальной синегнойной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на мышах-самцах (СВАхС₅₇В1₆) F₁, массой 22–25 г, поставленных из питомника «Столбовая» РАН. Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках при комнатной температуре, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (European Convention, Strasbourg, 1986). Эвтаназию мышей осуществляли дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом.

Модель экспериментальной синегнойной инфекции воспроизводили путем внутрибрюшинного введения клинического штамма *Pseudomonas aeruginosa* в дозе 50×10^6 бактерий на мышь. Исследования были проведены на 4 группах животных: I — интактные (контроль); II — зараженные *P. aeruginosa*; III — зараженные *P. aeruginosa* после предварительного (трехкратного с интервалами в 3 дня между введениями) внутрибрюшинного введения милиацина в дозе 2 мг/кг веса; IV — зараженные *P. aeruginosa* после предварительного (трехкратного с интервалами

в 3 дня между введениями) внутрибрюшинного введения галавита в дозе 5 мг/кг веса. Заражение животных проводили через 24 часа после последнего введения иммунодуляторов. Животных II–IV групп выводили из эксперимента на 5 сутки после заражения. В этот же срок осуществляли эвтаназию интактных мышей. Гибель мышей оценивали на протяжении 5 суток после их заражения.

Массу тимуса и селезенки, а также количество ядросодержащих клеток в тимусе, селезенке и костном мозге оценивали в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных [6].

Продукцию ИЛ-17 спонтанную и индуцированную Кон А (5 мкг/мл) изучали в культурах спленоцитов после 48-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в культуральной среде RPMI-1640 с глутамином и с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США) и 80 мкг/мл гентамицина путем определения содержания ИЛ-17 в супернатантах культур спленоцитов методом ИФА (тест-системы “Bender MedSystems”, Австрия).

Определение фагоцитарных показателей перитонеальных макрофагов (ПМ) проводили после извлечения клеток перитонеального экссудата и инкубирования их в течение 2 часов на пластиковых чашках. Интенсивность фагоцитоза ПМ оценивали по фагоцитарному показателю (ФП) и фагоцитарному индексу (ФИ) в отношении живой тест культуры ($2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) стафилококка (штамм 209-П) через 30 минут инкубации при 37°C. Метаболическую активность ПМ определяли в НСТ-тесте в спонтанном и стимулированном (зимозан) вариантах [6].

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и «STATISTICA 10.0», включая методы непараметрического (U-критерий Манна-Уитни) анализов. Результаты исследований представлены в виде Me (Q25; Q75), где Me медиана, нижний (Q25) и верхний (Q75) квартили. Статистически значимыми считали изменения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что заражение животных вызывало развитие инфекционного процесса, приводящего к гибели 45 из 86 ($52,33 \pm 5,39\%$) мышей в течение 5 суток наблюдения (груп-

па II). Предварительное введение как милиацина, так и галавита оказывало защитный эффект: гибель 8 из 59 ($13,56 \pm 4,46\%$) – группа III, 7 из 37 ($18,92 \pm 6,44\%$) – группа IV). Аналогичный положительный эффект отмечался по показателю микробной обсемененности печени (Me(Q25; Q75), КОЕ/г): 12520 (2360; 71690) – группа II против 1712 (260; 14990) – группа III и 2950 (460; 5446) – группа IV.

Данные весовых и клеточных показателей лимфоидных органов и периферической крови представлены в **таблице 1**. Как следует из данных таблицы, синегнойная инфекция приводила к достоверному снижению как массы тимуса, так и количества тимоцитов у мышей II, III и IV групп по сравнению с контролем. При этом максимальное падение числа тимоцитов было у мышей II группы (на 54%), минимальное – у животных IV группы (на 38%). Аналогичная тенденция отмечена по снижению количества миелокариоцитов у опытных мышей по отношению к контролю. Максимальное падение данных клеток отмечено у животных II группы (на 64%), а наименьшее у мышей III группы (на 33%). Таким образом, синегнойная инфекция приводила к снижению уровня тимоцитов и миелокариоцитов, а использование иммуномодуляторов перед

заражением ослабляло данный эффект. В отличие от изменений весовых и клеточных показателей, регистрируемых в тимусе и костном мозге, не выявлено существенных изменений параметров селезенки и периферической крови у мышей опытных групп по отношению к контролю.

Анализ полученных результатов свидетельствует о снижении тяжести синегнойной инфекции при предварительном введении как милиацина, так и галавита, что подтверждается уменьшением гибели животных и микробной обсемененности печени, а также ограничением гипоплазии тимуса и костного мозга.

Учитывая важную роль, которую фагоциты играют в защите от инфекции, была изучена фагоцитарная и метаболическая активность перитонеальных макрофагов у мышей исследуемых групп. Как видно из данных (**табл. 2**), установлено достоверное увеличение фагоцитарного индекса и стимулированного НСТ-теста у мышей опытных групп по сравнению с контрольной.

Данные о влиянии милиацина и галавита на спонтанную и стимулированную продукцию ИЛ-17 спленоцитами мышей (**табл. 2**) показали отсутствие достоверных отличий уровня спонтанной продукции этого цитокина у исследуемых групп животных по сравнению с I группой.

Таблица 1. Влияние иммуномодуляторов на массу и количество клеток в лимфоидных органах и периферической крови при синегнойной инфекции

| Показатели | | Группы животных | | | |
|--|--|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | | I | II | III | IV |
| Тимус | масса органа, мг (n) | 39,0 (31,5;44,0) (10) | 27,5 (22,5;30,5)* (22) | 31,0 (23,3;37,5)* (28) | 28,5 (24,0; 35,5)* (16) |
| | количество клеток, ($\times 10^6$) (n) | 72,0 (67,0; 74,0) (10) | 33,0 (20,0;39,0)* (15) | 38,0 (29,0;48,0)* (15) | 44,5 (40,5; 51,0)*.***.*** (8) |
| Селезенка | масса органа, мг (n) | 88,0 (78,0;103,0) (10) | 93,5 (83,8;125,3) (20) | 92,5 (85,3;115,3) (30) | 86,5 (77,5;92,8)**.*** (14) |
| | количество клеток, ($\times 10^6$) (n) | 188,0 (169,5;211,0) (10) | 195,0 (178,0;230,0) (15) | 203,0 (146,5;221,5) (21) | 191,0 (167,5;217,5) (13) |
| Костный мозг, количество клеток на бедро ($\times 10^6$) (n) | | 21,0 (12,5;30,0) (10) | 7,5 (6,8;13,3)* (10) | 14,0 (12,0; 15,0)*.*** (13) | 10,0 (8,0; 12,0)*.*** (7) |
| Лейкоциты ($\times 10^9$ /л) (n) | | 4,75 (3,9; 6,7) (10) | 6,9 (5,9; 8,6)* (12) | 6,1 (4,9; 7,6)* (10) | 5,3 (5,0; 6,5)* (10) |

Примечание: В табл. 1 и табл. 2 знаками обозначены достоверные ($p < 0,05$) различия показателей: * – II, III и IV группы по сравнению с группой I, ** – III и IV групп по сравнению с группой II, *** – группа IV по сравнению с группой III.

Таблица 2. Влияние иммуномодуляторов на фагоцитарные показатели и продукцию ИЛ-17 при синегнойной инфекции

| Показатели | | Группы животных | | | |
|-----------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | I | II | III | IV |
| Фагоцитоз | ФП, % (n) | 48,0 (44,0;56,0) (11) | 52,5 (44,5;61,8) (12) | 59,0 (45,0;63,0) (15) | 53,0 (47,5;55,0) (9) |
| | ФИ, ед. (n) | 4,1 (3,3;4,3) (11) | 4,4 (3,73;4,78)* (12) | 4,3 (4,0;4,8)* (15) | 4,8 (4,2;5,1)* (9) |
| НСТ-тест | спонтанный, % (n) | 5,0 (3,8;5,7) (8) | 5,3 (4,5;7,4) (9) | 5,7 (4,9;7,7) (10) | 4,0 (3,4;4,9)*** (8) |
| | стимулированный, % (n) | 16,5 (14,3;25,4) (8) | 31,3 (21,8;36,4)* (9) | 42,9 (36,4;50,2)*.** (10) | 36,8 (35,4;39,6)*** (8) |
| ИЛ-17, пг/мл | спонтанная продукция (n) | 27,4 (17,0; 30,5) (8) | 25,0 (22,85; 28,95) (8) | 20,4 (17,55; 25,85) (8) | 24,6 (19,15;26,9) (8) |
| | стимулированная продукция (n) | 40,6 (33,63; 45,0) (8) | 74,0 (32,2; 112,0) (8) | 52,3 (36,95;72,95) (8) | 36,1 (33,75; 38,8)*** (8) |

Примечание: * – различие с группой I ($p < 0,05$), ** – различие с группой II, ($p < 0,05$), *** – различие с группой IV ($p < 0,05$)

В то же время установлено увеличение стимулированной продукции ИЛ-17 у мышей II группы на 82%. Предварительное введение как милиацина, так и галавита снижало уровень стимулированной продукции цитокина на 29% и 51% соответственно по сравнению с его содержанием у мышей II группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая полученные результаты, необходимо учесть, что как галавит, так и милиацин, обладают противовоспалительным и антиоксидантным действием [4, 5].

В ранее проведенных исследованиях установлено, что милиацин оказывал защитный эффект при экспериментальной сальмонеллезной инфекции, в основе которой лежит снижение гибели животных, уменьшение микробной обсемененности внутренних органов, ограничение гипоплазии костного мозга и тимуса, снижение выраженности эндотоксинемии и продукции оксида азота перитонеальными макрофагами, усиление клеточного иммунного ответа, усиление антиоксидантной активности. Полученные результаты свидетельствуют об односторонности влияния милиацина и галавита при синегнойной инфекции. Учитывая предыдущие

результаты, полученные при влиянии милиацина на сальмонеллезную инфекцию можно предположить аналогичные механизмы защитного влияния милиацина на развитие синегнойной инфекции. Всё вышеизложенное позволяет рекомендовать использование милиацина и галавита для коррекции нарушений иммунной системы на модели синегнойной инфекции. Результаты работы служат экспериментальным обоснованием для клинической апробации милиацина в качестве средства, ослабляющего тяжесть синегнойной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Liu J., Feng Y., Yang K., Li Q., Ye L., Han L., Wan H. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2011, 61, 179–188.
2. Weber A., Zimmermann C., Mausberg A. K., Dehmel T., Kieseier Hans-Peter Hartung B. C., Hofstetter H. H. *Pseudomonas aeruginosa* and Its Bacterial Components Influence the Cytokine Response in Thymocytes and Splenocytes. *Infection and Immunity* 2016, 84 (5), 1413–1423.
3. Нурридинова Н. Р., Гариб Ф. Ю. Иммуноterapia острой синегнойной пневмонии в эксперименте. *Медицинская иммунология* 2004, 6, 1–2, 113–116. [Nuridinova N. R., Gharib F. Yu. Immunotherapy of

- acute *Pseudomonas aeruginosa* in the experiment. *Medical immunology* 2016, 84 (5), 1413–1423].
4. *Латышева Т. В., Щербакова О. А.* Новые возможности направленной иммунологической коррекции на примере отечественного иммуномодулятора «Галавит». *Российский аллергологический журнал* 2004, 1, 77–81. [*Latysheva T. V., Shcherbakova O. A.* New possibilities of directed immunological correction on the example of the domestic immunomodulator “Galavit”. *Russian Allergology Journal* 2004, 1, 77–81].
 5. *Панфилова Т. В., Штиль А. А., Фролов Б. А.* Тритерпеноид милиацин снижает индуцированное стрессом ПОЛ Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006, 141 (6), 633–635. [*Panfilova T. V., Shtil A. A., Frolov B. A.* Triterpenoid miliacin reduces stress-induced LPO. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2006, 141 (6), 633–635].
 6. *Волчегорский И. А., Долгушин И. И., Колесников О. Л.* Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во Челябинского государственного педагогического университета, 2000, 167 с. [*Volchegorsky I. A., Dolgushin I. I., Kolesnikov O. L.* Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism. Chelyabinsk: Publishing house of the Chelyabinsk State Pedagogical University, 2000, 167 p.].

COMPARATIVE EVALUATION OF INFLUENCE OF IMMUNOMODULATORS ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL SYNEGNE INFECTION

© 2018 **A. I. Smolyagin, B. A. Frolov, Y. V. Filippova, T. B. Panfilova,
A. D. Zheleznova, E. V. Ermolina, Y. A. Sarycheva, A. A. Tokareva**

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Received: 08.05.2018. **Accepted:** 18.06.2018

A comparative study of the protective effect of miliacin and galavit in the case of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice was carried out. It was established that miliacin and galavit reduced the death of animals, limited hypoplasia of the thymus and bone marrow, reduced the stimulated production of IL-17.

Key words: mouse, *Pseudomonas* infection, miliacin, galavit

Authors:

Smolyagin A. I., ✉ MD, professor, professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

460000 Orenburg, Orenburg State Medical University. Phone: 8(3532)50 06 06 (add. 203). **E-mail:** problab.orenbur@mail.ru;

Frolov B. A., MD, professor, Head of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Filippova Y. V., researcher of the Problem Research Laboratory, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Panfilova T. V., PhD, associate professor of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Zheleznova A. D., PhD, associate professor of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Ermolina E. V., PhD, senior researcher of the Problem Research Laboratory, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Sarycheva Y. A., PhD, associate professor of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Tokareva A. A., assistant of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia.