

С.Н. Серебренникова¹, И.Ж. Семинский¹, И.В. Клименков², Н.В. Семенов¹**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 бромид 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 бромид 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 INFLAMMATIONS.N. Serebrennikova¹, I.Zh. Seminsky¹, I.V. Klimenkov², N.V. Semenov¹¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk² Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk

The regulatory mechanisms of azoximera bromide on the characteristics of cell's phases experimental microbial 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 бромид 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 бромид.

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 бромид 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-1β 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 (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 мкм^2 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 мкм^2 . 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-1β 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-1β согласуется с данными литературы, что факторы вирулентности стафилококка усиливают синтез IL-1β 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-1β 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-1β 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-1β стимулирует образование глюкокортикоидов в организме [1, 4, 10]. В дальнейшие сроки воспалительного процесса наблюдалось одновременное снижение в плазме крови концентраций кортикостерона, IL-1β 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 Р450-зависимых монооксигеназ. Теоретические и прикладные аспекты // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 12–21.
11. Тузанкина И.А., Филimonкова 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» ЛИН 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)