

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА МОДЕЛЯХ АСЕПТИЧЕСКОГО ЛИМФАДЕНИТА И ПНЕВМОКОККОВОЙ ПНЕВМОНИИ *IN VIVO*

Крышень К.Л.¹, Кухаренко А.Е.², Вичаре А.С.³, Гайдай Е.А.⁴,
Крышень А.А.⁴, Гущин Я.А.¹, Калюжин О.В.⁵, Макарова М.Н.¹,
Макаров В.Г.⁴, Махадеван Б.³

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

² ООО «Эбботт Лэбораториз», Москва, Россия

³ Abbott Healthcare Pvt. Ltd, промышленный район Марол, Восточный Андхери, Мумбаи, Индия

⁴ ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Бактериальные лизаты могут оказывать иммунорегуляторные эффекты при воспалительных заболеваниях, не связанных непосредственно с инфекцией, а также стимулировать иммунный ответ против патогенов, не входящих в комплексный состав лизата. При этом влияние препарата Имудон[®], представляющего собой поливалентный бактериальный лизат в форме таблеток для рассасывания, на асептическое воспаление и иммунную защиту от инфекционных агентов, компоненты которых не содержатся в этом лекарственном средстве, ранее не изучалось. Цель работы — определить противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты препарата Имудон[®] на моделях асептического лимфаденита (у крыс Wistar) и пневмококковой пневмонии (у мышей линии Balb/c). Лимфаденит воспроизводили у крыс путем введения раствора λ-карагинана в шейный лимфатический узел через операционный доступ. При моделировании пневмонии мышам вводили суспензию *Streptococcus pneumoniae* интраназально. Выбор пневмококка обусловлен тем, что Имудон[®] не содержит антигены этого возбудителя и не является непосредственным индуктором адаптивного иммунного ответа против него. Имудон[®] вводили внутривентрикулярно в виде суспензии таблеточной массы по лечебно-профилактической схеме ежедневно в течение 14 дней до индукции воспаления и 3 (лимфаденит) или 5 дней (пневмония) после индукции в трех дозах. На модели лимфаденита Имудон[®] проявлял как системное, так и местное противовоспалительное действие, которое выражалось в снижении количества лейкоцитов и уровня TNFα крови, а также гистологических признаков воспалительной ре-

Адрес для переписки:

Кухаренко Андрей Евгеньевич
ООО «Эбботт Лэбораториз»
125171, Россия, Москва, Ленинградское шоссе,
16а, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 258-42-80.
Факс: 8 (495) 258-42-81.
E-mail: ekaterina.kovaleva@abbott.com

Address for correspondence:

Kukharevko Andrey E.
Abbott Laboratories LLC
125171, Russian Federation, Moscow, Leningrad highway,
16a, bldg 1.
Phone: 7 (495) 258-42-80.
Fax: 7 (495) 258-42-81.
E-mail: ekaterina.kovaleva@abbott.com

Образец цитирования:

К.Л. Крышень, А.Е. Кухаренко, А.С. Вичаре,
Е.А. Гайдай, А.А. Крышень, Я.А. Гущин, О.В. Калюжин,
М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, Б. Махадеван
«Противовоспалительные и иммуномодулирующие
эффекты бактериального лизата на моделях
асептического лимфаденита и пневмококковой
пневмонии *in vivo*» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 1. С. 111-122.
doi: 10.15789/1563-0625-AAI-1758
© Крышень К.Л. и соавт., 2020

For citation:

K.L. Kryshen, A.E. Kukharevko, A.S. Vichare, E.A. Gaidai,
A.A. Kryshen, Ya.A. Gushchin, O.V. Kalyuzhin,
M.N. Makarova, V.G. Makarov, B. Mahadevan “Anti-
inflammatory and immunomodulating effects of the bacterial
lysate in the *in vivo* models of aseptic lymphadenitis and
pneumococcal pneumonia”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1,
pp. 111-122.
doi: 10.15789/1563-0625-AAI-1758
DOI: 10.15789/1563-0625-AAI-1758

акции в пораженном лимфоузле. Наиболее значимый противовоспалительный эффект выявлен при использовании тестируемого препарата в дозах 2,2 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на крысу) и 6,6 мг/кг по вышеперечисленным показателям. На модели пневмонии при применении препарата Имудон® в дозах 4,44 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на мышшь) и 13,32 мг/кг обнаруживалась тенденция к увеличению выживаемости в сравнении с контролем. На 5-й день после заражения установлено статистически значимое снижение выраженности воспаления и титра бактерий в легких на фоне применения препарата Имудон® в дозах 4,44 и 13,32 мг/кг. В бронхоальвеолярном лаваже на 5-е сутки после инфицирования наблюдали увеличение титра антипневмококковых иммуноглобулинов А при использовании препарата Имудон® в дозе 13,32 мг/кг в сравнении с контролем. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой противовоспалительной и иммуномодулирующей активности препарата Имудон® и уточняют механизмы ранее описанных клинических эффектов этого препарата при воспалительных заболеваниях различной природы.

Ключевые слова: бактериальные лизаты, Имудон®, иммуностимуляция, иммунорегуляция, асептический лимфаденит, воспаление, фактор некроза опухоли, *Streptococcus pneumoniae*, пневмония, иммуноглобулин А

ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATING EFFECTS OF THE BACTERIAL LYSATE IN THE *IN VIVO* MODELS OF ASEPTIC LYMPHADENITIS AND PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA

Kryshen K.L.^a, Kukharenko A.E.^b, Vichare A.S.^c, Gaidai E.A.^d,
Kryshen A.A.^d, Gushchin Ya.A.^a, Kalyuzhin O.V.^e, Makarova M.N.^a,
Makarov V.G.^d, Mahadevan B.^c

^a Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

^b Abbott Laboratories LLC, Moscow, Russian Federation

^c Abbott Healthcare Pvt. Ltd, Marol Industrial Area, Andheri East, Mumbai, India

^d Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

^e I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Bacterial lysates may produce immunoregulatory effects in the inflammatory diseases that are not directly caused by infectious agents; they may also stimulate the immune response against pathogens which are not a part of the lysate composition. Imudon® is a polyvalent bacterial lysate that is available in orodispersible tablets. However, the influence of this drug product on aseptic inflammation and immune defense against the infectious agents, the antigens of which are not contained in this preparation have not been studied so far. The aim of this study, therefore, was to determine the anti-inflammatory and immunomodulating effects of Imudon® using the models of aseptic lymphadenitis (in Wistar rats) and pneumococcal pneumonia (in Balb/c mice), i.e., the conditions not related to the specific components of the bacterial lysate. Lymphadenitis was induced in rats by administration of λ -carrageenan into a cervical lymph node via an open operative approach. Whereas pneumonia was induced in mice by administering *Streptococcus pneumoniae* suspension intranasally. The choice of pneumococcus was determined by the absence of pneumococcal antigens in Imudon®, i.e., it cannot be a direct inducer of adaptive immune response against pneumococcal infection. Imudon® was administered intragastrically as a crushed tablet suspension following a therapeutic-preventive regimen (for 14 days daily until the induction of inflammation and for 3 [in the lymphadenitis model] or 5 days [in the model of pneumonia] in three doses thereafter). In the lymphadenitis model, Imudon® demonstrated both local and systemic anti-inflammatory responses manifested in the reduced number of circulating leucocytes and lower TNF α levels and by ameliorated histological features of inflammation in the operated lymph node. In rats, the anti-inflammatory effect was most pronounced when the product was administered at a dose of 2.2 mg/kg (equivalent to a human therapeutic dose) and 6.6 mg/kg. In the model of pneumonia, administration of Imudon® at 4.44 mg/kg (equivalent to a human therapeutic dose) and 13.32 mg/kg demonstrated a trend

towards increased survival rate as compared to the control group. On Day 5 after infection Imudon® (4.44 and 13.32 mg/kg) decreased significantly the severity of inflammation and bacterial titer in the lungs. The titer of anti-pneumococcal immunoglobulins A in the bronchoalveolar lavage fluid were found to be higher in the Imudon® treated group (13.32 mg/kg) compared to control group. The results of this study showed high anti-inflammatory and immunomodulatory activities of Imudon® and provided an insight into the mechanisms that underlie the clinical effects of this drug in various inflammatory diseases.

Keywords: bacterial lysates, Imudon®, immunostimulation, immunoregulation, aseptic lymphadenitis, inflammation, tumor necrosis factor, Streptococcus pneumoniae, pneumonia, immunoglobulin A

Введение

Для профилактики острых респираторных инфекций, обострений хронических заболеваний дыхательных путей достаточно широко применяются иммуномодулирующие лекарственные средства, среди которых особое место по степени изученности механизмов действия и доказательности клинической эффективности занимают бактериальные лизаты. У лиц с клиническими проявлениями недостаточности противоинфекционной защиты прием бактериальных лизатов целесообразен не только на разных этапах профилактики (сезонной, внутриочаговой и пост-контактной) инфекций дыхательных путей и ЛОР-органов, но и в комплексном лечении этих заболеваний [3].

Препараты на основе бактериальных лизатов можно разделить на две подгруппы: 1) с системным действием, например ОМ-85 (Бронхо-Мунал® и Бронхо-Ваксом®) и 2) с преимущественно топическим действием, например Имудон® для рассасывания в полости рта и ИРС® 19 для интраназального применения. Доказано, что при разных путях доставки в организм бактериальные лизаты индуцируют альтернативные и в большинстве случаев взаимодополняющие локальные и системные механизмы, в конечном итоге приводящие к увеличению продукции в дыхательных путях и/или полости рта секреторных иммуноглобулинов А (IgA) – ключевого компонента мукозальной противомикробной защиты. Фармакологические эффекты системных и топических бактериальных лизатов определяются стимуляцией не только адаптивного иммунного ответа против входящих в их состав антигенов (АГ) патогенов, но и врожденных защитных механизмов под влиянием ассоциированных с микробами молекулярных паттернов (ММП) [1, 4].

Бактериальные лизаты способны проявлять противовоспалительную и иммунорегуляторную активность при заболеваниях, не связанных непосредственно с бактериальной инфекцией [13, 16], потенцировать врожденные механизмы защиты от патогенов, не входящих в комплексный

состав лизата [4, 9, 18]. Вместе с тем влияние препарата Имудон® на асептическое воспаление и иммунный ответ против инфекционных агентов, АГ которых не содержатся в составе этого препарата, ранее детально не изучалось.

Цель работы – определить противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты препарата Имудон® на моделях асептического шейного лимфаденита у крыс и пневмонии у мышей, вызванной бактериями, компоненты которых не входят в состав исследуемого иммуномодулятора. Для индукции лимфаденита выбран небактериальный триггер λ-каррагинан – комплекс сульфатированных полисахаридов из красных водорослей, способный вызывать асептическое воспаление за счет стимуляции рецепторов TLR2/6 и TLR4/6 [15]. При моделировании пневмонии животных заражали суспензией *Streptococcus pneumoniae*, так как, с одной стороны, эта бактерия является одним из наиболее частых возбудителей внебольничной пневмонии и инфекций ЛОР-органов, а с другой – Имудон® не содержит АГ пневмококка и не является непосредственным индуктором адаптивного иммунного ответа против этого патогена.

Материалы и методы

Исследуемый объект

Объектом исследования служил препарат Имудон® в таблетках для рассасывания (ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия), содержащих 2,7 мг лизатов бактерий (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus pyogenes* groupe A, *Streptococcus sangius* groupe H, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *fusiforme*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*) и грибов (*Candida albicans*), переданный для исследований ООО «Эбботт Лэбораториз».

Животные

В эксперименте по оценке противовоспалительного потенциала препарата Имудон® на модели каррагинан-индуцированного шейного лимфаденита использовали самок крыс линии

Wistar в возрасте 12-14 недель (6 групп по 10 животных; $n = 60$). Пневмококковую пневмонию моделировали на самцах мышей линии Balb/c категории SPF (specific pathogen free) в возрасте 12-14 недель (5 групп по 10 животных; $n = 50$). Проведение всех опытов *in vivo* было одобрено биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Всех животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [2]. Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты. Полнорационный гранулированный комбикорм и воду давали животным *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Крыс содержали в поликарбонатных конвенциональных клетках. Самцов мышей линии Balb/c содержали в специализированной зоне лаборатории микробиологии ООО «Институт доклинических исследований» (лицензия № 47.01.05.001.Л.000001.04.18), в индивидуально-вентилируемых клетках Shanghai Pretty Industries Co., Ltd (Китай) группами по 10 особей. Корм, воду и подстил (кукурузные гранулы) предварительно автоклавировали.

Моделирование шейного лимфаденита у крыс

Индукция шейного лимфаденита была выполнена путем однократного введения через операционный доступ в правый шейный лимфатический узел 1% раствора λ -карагинана (Sigma-Aldrich, США) в объеме 20 мкл/животное (независимо от массы тела) [7]. λ -карагинан представляет собой группу неразветвленных сульфатированных полисахаридов, молекулы которых построены из остатков производных D-галактопиранозы со строгим чередованием α -1,3- и β -1,4-связей между ними.

Для исключения возможного влияния анестезии или оперативного вмешательства на исследуемые параметры в эксперимент была включена группа ложнооперированных животных, которым проводили операцию с доступом к лимфатическим узлам и последующим ушиванием раны без введения индуктора воспаления.

Выраженность воспалительной реакции у животных регистрировали через 72 часа после индукции. Для этого проводили гематологический анализ крови с помощью анализатора Mythic 18 Vet (Orphee, Швейцария), определяли уровень фактора некроза опухоли (TNF α) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА, Cloud-Clone Corp., США) и оценивали гистологически выраженность воспаления в шейных лимфатических узлах. Эвтаназию животных проводили в CO₂-камере в условиях постепенно-

го заполнения камеры диоксидом углерода с последующим обескровливанием из полостей сердца [2].

Имудон® вводили внутривенно с помощью металлического зонда в виде суспензии таблеточной массы, приготовленной в дистиллированной воде, по лечебно-профилактической схеме ежедневно в течение 14 дней до индукции лимфаденита и 3 дней после индукции (всего 17 дней) в трех дозах: 0,73; 2,2 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на крысу) и 6,6 мг/кг в одинаковом объеме 5 мл/кг для всех доз. В контрольной группе животные получали внутривенно дистиллированную воду в аналогичном объеме.

Моделирование пневмококковой пневмонии у мышей

В качестве возбудителя пневмонии использовали *S. pneumoniae* тип 3 (ATCC 6303, США). Индукцию пневмонии выполняли путем однократного интраназального введения с помощью шприца Гамильтона 1710RN 100 мкл (Hamilton Company Inc., США) суспензии бактерий *S. pneumoniae* в дозе 5×10^5 бактерий/животное в 50 мкл фосфатно-солевого буфера.

Имудон® вводили внутривенно с помощью металлического зонда в виде суспензии таблеточной массы, приготовленной в дистиллированной воде, ежедневно в течение 14 дней до заражения и 5 дней после него (всего 19 дней) в трех дозах: 1,48; 4,44 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на мышшь) и 13,32 мг/кг. Все дозы вводили животным в одинаковом объеме 6,6 мл/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в аналогичном объеме.

Оценку защитного действия препарата Имудон® и его влияния на специфический иммунный ответ проводили через 5 суток после заражения по выживаемости животных, выраженных в процентах, титру специфических IgA в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и титру *S. pneumoniae* в гомогенате легких. Также был проведен гистологический анализ легких.

Через пять суток после заражения животных вводили в наркоз путем внутримышечной инъекции смеси Золетила (20-40 мг/кг) и Ксилазина (6-9 мг/кг). Отбор БАЛ осуществляли из левого легкого в стерильные пробирки. После отбора БАЛ животные были эвтаназированы путем обескровливания из полостей сердца. Правое легкое забирали для дальнейшего гистологического анализа и определения бактериальной нагрузки. Образцы БАЛ центрифугировали при 300 г в течение 15 минут при комнатной температуре. Супернатант замораживали и хранили

при температуре -80°C для дальнейшей оценки титра IgA.

Титр специфических IgA определяли с помощью иммуноферментного анализа [14]. Планшеты покрывали суспензией термически инактивированных (при температуре 56°C в течение 30 минут) *S. pneumoniae* тип 3 (10^7 КОЕ/мл) и оставляли на ночь при температуре 4°C . После блокирования неспецифических сайтов связывания фосфатно-солевым буфером, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина, в лунки планшетов вносили образцы БАЛ в двукратных разведениях. Планшеты с образцами инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C . После отмывки в лунки планшетов вносили вторичные козы антитела против IgA мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Novus, США). После инкубации с антителами в течение 1 часа планшеты промывали и во все лунки добавляли субстрат тетраметилбензидин (Thermo Scientific, США). По окончании инкубации вносили $0,1\text{ M H}_2\text{SO}_4$. Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного спектрофотометра xMark (BioRad, США) при длине волны 450 nm . Вычисляли предел обнаружения (ПО) методики. За титр принимали то разведение образцов, при котором полученное значение ближе всего к ПО, а следующее за ним разведение было ниже ПО.

Для оценки титра *S. pneumoniae* образец левого легкого гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора Даунса в 1 мл фосфатно-солевого буфера. Из полученного нативного препарата готовили десятикратные разведения. Далее из нативного препарата и полученных разведений делали высевы на чашки Петри с Колумбийским агаром с добавлением 5% дефибрированной бараньей крови. Рост колоний оценивали через 48 часов.

Гистологический анализ

Материал для гистологического исследования фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего заливали в парафин [5]. Затем изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили с помощью светооптического микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) при увеличении $50\times$, $100\times$, $200\times$ и $400\times$. Микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью цифровой фотокамеры AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

С целью оценки развития шейного лимфаденита у крыс и влияния тестируемого препарата на микроструктуру лимфатических узлов про-

водили морфометрические измерения диаметра герминативных центров лимфоидных фолликулов и толщины капсулы лимфоузлов. Измерения проводили вручную, не менее чем в 5 полях зрения для всех показателей каждого образца. Лимфоидные фолликулы овальной формы измерялись по большему диаметру. Для расчетов использовались максимальные значения, полученные от каждого образца. Также проводили полуколичественную оценку степени и характера повреждений, выраженную в баллах от 0 до 3, по следующим показателям: нарушение структуры (гистиоархитектоники) лимфатического узла, наличие некротических повреждений, расширение и гистиоцитоз мозговых фолликулов [6].

Оценку воспаления легких у мышей, вызванного *S. pneumoniae*, проводили полуколичественно по степени и характеру повреждений, выраженную в баллах от 0 до 3, по следующим показателям: экссудат в просвете легких, гипертрофия эпителия бронхов, гиперплазия эпителия бронхов, некроз эпителия бронхов, экссудат в просвете бронхиол, гипертрофия бронхоальвеолярного эпителия, некроз бронхоальвеолярного эпителия, бронхит, перибронхит, бронхиолит, перибронхиолит, периваскулит, васкулит, интерстициальный инфильтрат, альвеолит, гиперемия альвеолярной перегородки, альвеолярная эмфизема, альвеолярные геморрагии.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для всех данных была применена описательная статистика. Данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением (post hoc) с использованием теста Тьюки (post hoc Tukey's). Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, для попарного сравнения экспериментальных групп использовали тест Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Модель лимфаденита у крыс, вызванная введением λ -каррагинана в шейный лимфатический узел, характеризовалась значимым увеличением общего количества лейкоцитов и гранулоцитов в крови (рис. 1), а также увеличением уровня про-

воспалительного цитокина TNF α в сравнении с ложнооперированными животными (рис. 2).

Внутрижелудочное введение Имудон[®] приводило к статистически значимому снижению уровня гранулоцитов крови по сравнению с контрольной группой животных. Так, тестируемый препарат в дозе 6,6 мг/кг снижал число гранулоцитов на 52% по сравнению с контролем, а в дозах 0,73 и 2,2 мг/кг (доза, эквивалентная терапевтической дозе для человека) – на 41 и 44% соответственно (рис. 1). Имудон[®] дозозависимым образом уменьшал концентрацию TNF α в сыворотке крови, при этом в дозах 2,2 и 6,6 мг/кг иммуномодулятор снижал уровень этого провоспалительного цитокина на 75 и 77% соответственно (рис. 2).

Местная воспалительная реакция после введения λ -каррагинана характеризовалась увеличением толщины капсулы пораженных лимфоузлов (рис. 3), а также нарушением гистиоархитектоники лимфатического узла, наличием некротических повреждений, расширением и гистиоцитозом мозговых фолликулов. Результаты полуколичественного анализа повреждений представлены на рисунке 4 в виде суммы баллов от каждого анализируемого признака. В некоторых случаях у оперированных крыс наблюдалось утолщение капсулы интактных лимфоузлов в основном за счет умеренной мононуклеарной инфильтрации, что обусловлено общей воспалительной реакцией прилежащих к операционному полю тканей. Диаметр герминативных центров лимфоидных фолликулов пораженного и интактного лимфоузла значимо не изменялся после введения λ -каррагинана. Имудон[®] дозозависимо снижал степень выраженности местной воспали-

тельной реакции, подавлял развитие лимфаденита и способствовал сохранению структуры и размеров лимфоидных фолликулов лимфатических узлов крыс (рис. 3).

Таким образом, Имудон[®] проявлял противовоспалительную активность на модели асептического шейного лимфаденита у крыс, которая выражалась в снижении общего числа лейкоцитов и гранулоцитов в крови, уровня TNF α в сыворотке крови и гистологических признаках местной воспалительной реакции.

Интраназальное введение суспензии *S. pneumoniae* в дозе 5×10^5 бактерий/животное приводило к развитию летальной пневмонии. Гибель мышей начали регистрировать на 3-и сутки после индукции патологии. В контрольной группе животных была зафиксирована гибель 60% животных через 5 дней (табл. 1). Среди мышей, получавших Имудон[®] в дозе 1,48 мг/кг, наблюдали смертность на уровне контрольной группы. Снижение уровня смертности в два раза наблюдали у животных, получавших тестируемый препарат в дозах 4,44 мг/кг (доза, эквивалентная терапевтической дозе для человека) и 13,32 мг/кг.

В группах животных, получавших Имудон[®] в дозах 4,44 и 13,32 мг/кг, отмечали статистически значимое снижение бактериальной нагрузки в легких по сравнению с контрольной группой (рис. 4), что согласуется с данными по снижению уровня гибели животных при введении иммуномодулятора в этих дозах.

У мышей контрольной группы с модельной патологией после введения суспензии бактерий отмечали микроскопическую картину воспаления в легких, вызванного заражением *S. pneumoniae*. Среди основных патологических

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА ЛЕТАЛЬНОСТЬ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ *S. PNEUMONIAE*

TABLE 1. MORTALITY IN ANIMALS AFTER *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* INFECTION

Группа Group	Характеристика группы Group characteristics	Сутки после заражения Days after infection					Всего павших животных Total non-surviving animals
		1	2	3	4	5	
1	Интактная Healthy control	–	–	–	–	–	–
2	Контрольная группа Control	–	–	–	2	4	6 из 10 6 out of 10
3	Имудон [®] 1,48 мг/кг Imudon [®] 1.48 mg/kg	–	–	–	3	3	6 из 10 6 out of 10
4	Имудон [®] 4,44 мг/кг Imudon [®] 4.44 mg/kg	–	–	1	2	–	3 из 10 3 out of 10
5	Имудон [®] 13,32 мг/кг Imudon [®] 13.32 mg/kg	–	–	1	2	–	3 из 10 3 out of 10

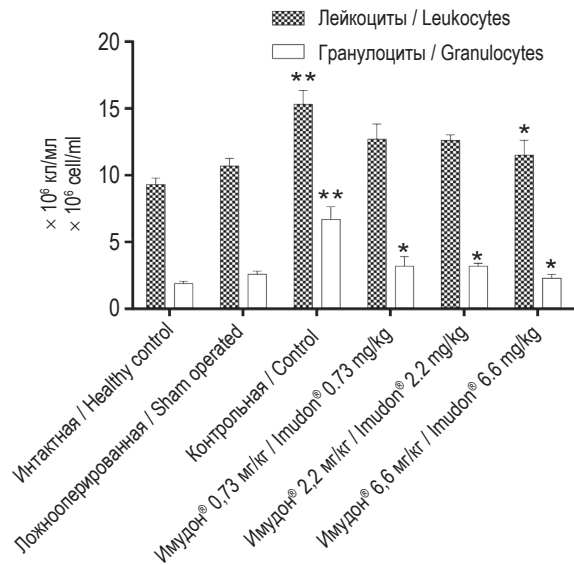


Рисунок 1. Влияние бактериального лизата на число лейкоцитов и гранулоцитов в крови через 3 дня после введения λ-каррагинана в шейный лимфатический узел крыс

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ при сравнении с группой ложнопериоперированных животных.

Figure 1. Total leucocyte blood count and total granulocyte blood count in rats 3 days after the injection of λ-carrageenan into the right cervical lymph node

Note. *, differences are statistically significant compared to control group ($p < 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the sham surgery group.

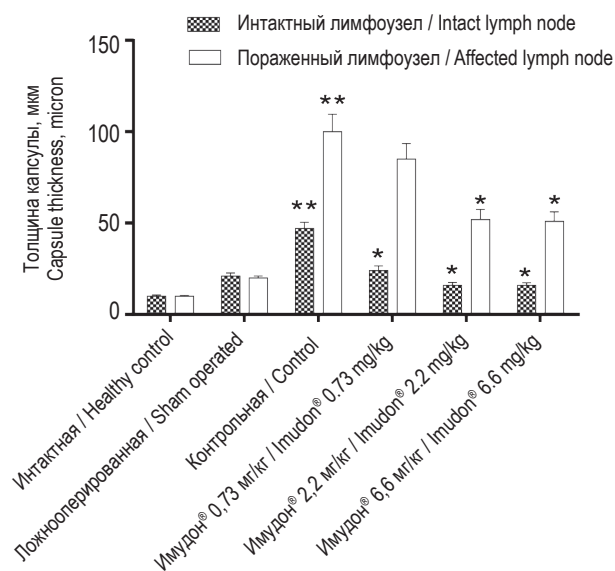


Рисунок 3. Влияние бактериального лизата на толщину капсулы интактного и пораженного лимфоузлов через 3 дня после введения λ-каррагинана

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Results of morphometric measurement of capsule thickness of intact and affected lymph nodes 3 days after the injection of λ-carrageenan

Note. As for Figure 1.

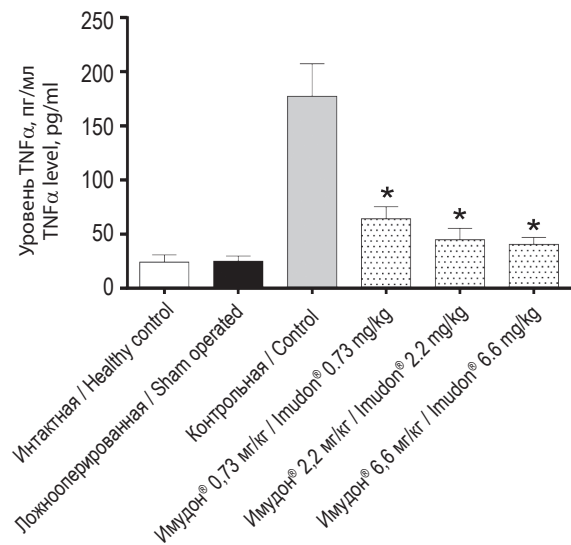


Рисунок 2. Влияние бактериального лизата на уровень TNFα в сыворотке крови через 3 дня после введения λ-каррагинана в шейный лимфатический узел крыс

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. TNFα level in rat serum 3 days after the injection of λ-carrageenan into the right neck lymph node

Note. As for Figure 1.

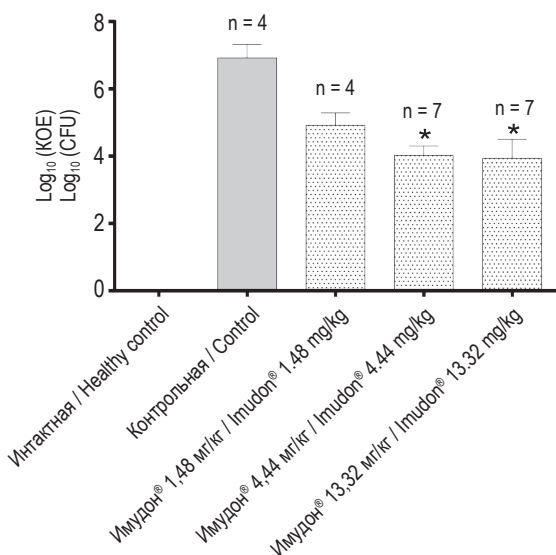


Рисунок 4. Влияние бактериального лизата на титр *S. pneumoniae* в образцах легкого через 5 дней после заражения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. *Streptococcus pneumoniae* titre in right lung samples 5 days after infection

Note. As for Figure 1.

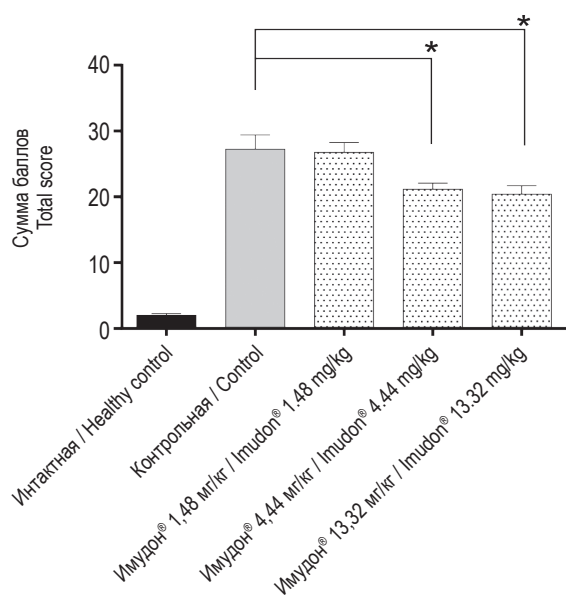


Рисунок 5. Влияние бактериального лизата на выраженность воспалительных изменений в легочной ткани у мышей через 5 дней после заражения *S. pneumoniae*

Примечание. См. примечание к рисунку 1. Данные представлены в виде суммы баллов на каждое животное по всем анализируемым показателям.

Figure 5. Bacterial lysate effects on inflammatory changes severity in the mice lung tissue 5 days after *S. pneumoniae* infection.

Note. As for Figure 1. Presented as the total score for each animal by all parameters.

изменений, выраженность которых оценивали в баллах, в тканях легких инфицированных животных следует выделить гипертрофию эпителия бронхов, гипертрофию бронхоальвеолярного эпителия, бронхит, перибронхит, бронхиолит, перибронхиолит, периваскулит, интерстициальный инфильтрат, альвеолит, гиперемию альвеолярной перегородки, альвеолярные геморрагии и эмфизему. С целью удобства представления данных и получения материала, пригодного для математической обработки, баллы всех показателей для каждого животного суммировали.

Микроскопический анализ легких выявил способность препарата Имудон® в дозах 4,44 и 13,32 мг/кг снижать воспалительный процесс, вызванный введением суспензии *S. pneumoniae* (рис. 5), что согласуется с вышеописанным снижением титра бактерий в легких на фоне применения препарата в этих же дозах.

Курсовое лечебно-профилактическое введение препарата Имудон® увеличивало титр IgA, специфических к *S. pneumoniae*. В группах животных, получавших тестируемый препарат в дозе 13,32 мг/кг, отмечено статистически значимое

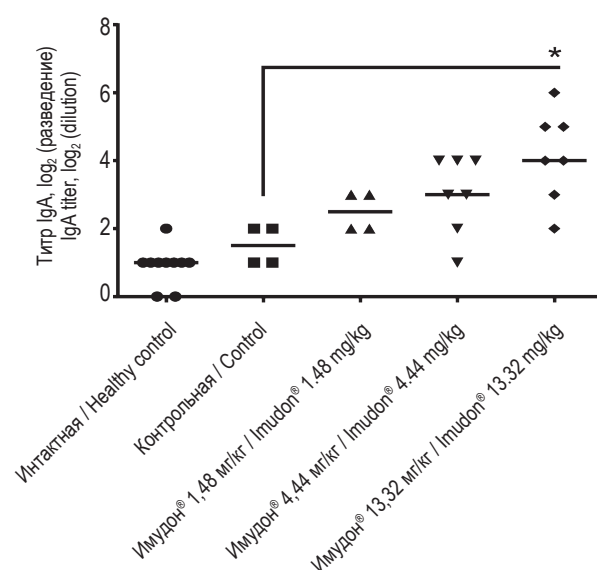


Рисунок 6. Влияние бактериального лизата на титр IgA, специфических к *S. pneumoniae*, у мышей через 5 дней после заражения *S. pneumoniae*

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 6. Bacterial lysate effects on *S. pneumoniae* specific IgA titer in bronchoalveolar lavage of mice 5 days after *S. pneumoniae* infection.

Note. As for Figure 1.

увеличение концентрации антипневмококковых IgA по сравнению с контрольной группой (рис. 6).

Таким образом, на модели воспаления легких, вызванного *S. pneumoniae*, подтверждены протективные свойства Имудон®, отчасти обусловленные стимулированием адаптивного иммунного ответа: увеличением титра специфических IgA.

Обсуждение

В клинической практике таблетки Имудон® рассасывают (не разжевывая) в полости рта. Поскольку у крыс и мышей в эксперименте данный путь введения воспроизвести весьма сложно, а также с учетом того, что значительная часть компонентов препарата в результате рассасывания *a priori* проглатывается вместе со слюной, в данном исследовании был использован внутрижелудочный способ введения Имудон® животным, широко применяемый для оценки фармакологической активности системно действующих бактериальных лизатов [4, 13, 14]. С целью достижения максимальной эффективности в работе выбран лечебно-профилактический способ вве-

дения животным препарата Имудон®. Этот вариант применения иммуномодулятора, во-первых, не противоречит инструкции по медицинскому применению Имудон®, а во-вторых, довольно часто встречается на практике, когда непосредственно на фоне превентивного курса все-таки развивается то или иное воспалительное заболевание, требующее лечения. Дозы для животных выбирали исходя из терапевтической дозы для человека в пересчете на кг массы тела и с учетом общепринятых метаболических коэффициентов [12].

Ключевое значение при пероральном применении лизатов имеет доставка бактериальных АГ и МАМП к М-клеткам пейеровых бляшек кишечника. Именно эти клетки являются первыми клеточными мишенями пероральных лизатов. Далее М-клетки обеспечивают трансцеллюлярный транспорт АГ и паттернов дендритным клеткам пейеровых бляшек, которые, в свою очередь, активируются и представляют бактериальные АГ для Т- и В-лимфоцитов либо в самих бляшках, либо в брыжеечных лимфатических узлах. Миграция АГ-примированных В-клеток и, возможно, нагруженных бактериальными АГ дендритных клеток из кишечника в дыхательные пути приводит к стимуляции выработки секреторных sIgA (иммунная солидарность слизистых) [4, 17].

Для препаратов топического действия механизм иммунной стимуляции является схожим, но происходит непосредственно на месте их первичного введения в организм. В этом отношении бактериальный лизат в форме назального спрея (ИРС® 19) действует в первую очередь на носоглоточную миндалину, а в форме таблеток при рассасывании (Имудон®) – на небные и язычную миндалины, а также протоки слюнных желез, открытые для экзогенных воздействий [4].

Иммуностимулятор, полученный в результате разрушения бактериальных клеток, содержит большое число как АГ, так и МАМП, благодаря чему способен не только индуцировать/активировать адаптивный ответ против бактерий и антигенов, которые входят в состав препарата, но и потенцировать иммунологические механизмы защиты от этих и множества других патогенов, принадлежащих самым разнообразным таксономическим группам. МАМП обладают плейотропным стимулирующим действием в отношении эффекторов врожденного иммунитета (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов врожденного иммунитета) и, кроме того, выполняют роль адъювантов, то есть усиливают адаптивный (АГ-специфический) ответ [4]. Так, например, препарат ОМ-85, содержащий только бактериальные лизаты, был высоко эффективен на модели инфекции, вызванной

вирусом грипп А/PR/8/34H1N1, у мышей [9] и потенцировал действие амоксицилина на модели хронического ринусинусита, вызванного плесневым грибом *Aspergillus fumigatus* [18].

В настоящей работе на модели пневмонии, вызванной *S. pneumoniae* (возбудителем, компоненты которого не содержатся в составе исследуемого бактериального лизата), показаны протективные свойства препарата Имудон®, которые, по крайней мере отчасти можно объяснить установленным в настоящей работе потенцированием выработки антипневмококковых IgA.

При моделировании асептического воспаления шейного лимфатического узла в качестве локального индуктора использовали известный провоспалительный агент небактериальной природы – λ-каррагинан. В результате был воспроизведен не только лимфаденит, но и системный воспалительный ответ. Лимфаденит (острый и хронический) часто сопровождает вирусные инфекции дыхательных путей и ротоглотки, острые и хронические формы бактериальных тонзиллофарингитов, в том числе стрептококковой природы, заболевания зубов и полости рта [8]. В настоящей работе Имудон®, вводимый внутрижелудочно, проявлял противовоспалительное действие как непосредственно в пораженном лимфоузле, так и на системном уровне, снижая концентрацию циркулирующего TNFα и общее количество лейкоцитов в крови.

Эти данные согласуются с результатами зарубежных экспериментальных и клинических исследований, в которых показано, что препараты на основе бактериальных лизатов обладают противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью при заболеваниях, напрямую не связанных с бактериальной инфекцией: например, при астме [19], аллергическом рините [13], атопическом дерматите [10], остром бронхите, который обычно вызывают вирусы [16], а также при таких многофакторных заболеваниях, как хроническая обструктивная болезнь легких [11].

Особенностью препарата Имудон®, отличающей его от других бактериальных лизатов, является то, что он содержит смесь лизатов не только бактерий, наиболее часто вызывающих воспалительные заболевания полости рта и глотки, но и комменсалов – представителей рода *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum*. Вероятно, именно с этим связаны дополнительные противовоспалительные свойства Имудон®, зарегистрированные в ряде клинических исследований, такие как быстрая регрессия боли, гиперемии и других признаков воспаления у пациентов с тонзиллофарингитами и заболеваниями полости рта. Предположительно в терапевтическую и профи-

лактическую эффективность препарата Имудон® вносит вклад синергизм входящих в его состав МАМП бактерий и грибов – агонистов рецепторов врожденного иммунитета [4].

Заключение

На модели асептического лимфаденита у крыс, вызванного λ -каррагинаном, продемонстрирована противовоспалительная активность Имудон®, которая выражалась в снижении общего числа лейкоцитов и гранулоцитов в крови, уровня циркулирующего TNF α и гистологических признаков местной воспалительной реакции. На модели

пневмонии у мышей, вызванной *S. pneumoniae*, подтверждены протективные свойства Имудон® и выявлена его способность увеличивать титр антипневмококковых IgA в БАЛ. Это подтверждает то, что спектр иммуномодулирующего действия препарата Имудон® выходит за рамки тех патогенов, компоненты которых входят в состав этого бактериального лизата. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой противовоспалительной и иммуномодулирующей активности Имудон® и уточняют механизмы ранее описанных клинических эффектов этого препарата при воспалительных заболеваниях различной природы [4].

Список литературы / References

1. Блохин Б.М., Стешин В.Ю. Место лизатов бактерий ОМ-85 (Бронхо-Мунал) в профилактике и лечении респираторных заболеваний у детей // Практическая пульмонология, 2016. № 2. С. 29-34. [Blokhin B.M., Steshin V.Yu. Bacterial lysates OM-85 (Broncho-Munal) for prevention and treatment of respiratory infections in children. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology*, 2016, no. 2, pp. 29-34. (In Russ.)]
2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes].
3. Калюжин О.В. ОМ-85 в профилактике/лечении респираторных инфекций и обострений хронических заболеваний легких: критерии выбора, механизмы и доказательства // Лечащий врач, 2018. № 3. С. 77-82. [Kalyuzhin O.V. OM-85 in the prevention/treatment of respiratory infections and exacerbations of chronic lung diseases: selection criteria, mechanisms and evidence. *Lechashchiy Vrach = Attending Physician*, 2018, no. 3, pp. 77-82. (In Russ.)]
4. Калюжин О.В. Топические бактериальные лизаты в профилактике и лечении респираторных инфекций // Практическая медицина, 2016. № 2 (94). С. 69-74. [Kalyuzhin O.V. Topical bacterial lysates in the prevention and treatment of respiratory infections. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2016, no. 2 (94), pp. 69-74. (In Russ.)]
5. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии, 2014. № 2. С. 103-108. [Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushin Ya.A. Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2014, no. 2, pp. 103-108. (In Russ.)]
6. Мужикян А.А., Ходько С.В., Гушин Я.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Гистологические изменения в лимфатических узлах крыс при моделировании острого шейного лимфаденита // Международный вестник ветеринарии, 2017. № 1. С. 75-83. [Muzhikyan A.A., Khodko S.V., Gushin Ya.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Histological changes in the lymph nodes of rats in modeling acute cervical lymphadenitis. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2017, no. 1, pp. 75-83. (In Russ.)]
7. Тесакова С.В., Самусенко И.А., Карачинская И.В., Крышень К.Л., Абрашова Т.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Экспериментальная модель шейного лимфаденита у крыс для оценки противовоспалительной эффективности препаратов // Профилактическая и клиническая медицина, 2011. № 1 (38). С. 57-62. [Tesakova S.V., Samusenko I.A., Karachinskaya I.V., Kryshen K.L., Abrashova T.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Experimental model of cervical lymphadenitis in rats to evaluate the efficacy of anti-inflammatory medicines. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina = Preventive and Clinical Medicine*, 2011, no. 1 (38), pp. 57-62. (In Russ.)]
8. Челябин Э.А., Завьялов А.Е., Куринский В.В., Важжов И.В. Шейный лимфаденит как междисциплинарная проблема // Научный альманах, 2017. № 1-3. С. 256-260. [Cheliabin E.A., Zavyalov A.E., Kurinsky V.V., Vazhzhov I.V. Cervical lymphadenitis as interdisciplinary problem. *Nauchnyy almanakh = Scientific Almanac*, 2017, no. 1-3, pp. 256-260. (In Russ.)]
9. Bessler W.G., vor dem Esche U., Masihi N. The bacterial extract OM-85 BV protects mice against influenza and Salmonella infection. *Int. Immunopharmacol.*, 2010, Vol. 10, no. 9, pp. 1086-1090.
10. Bodemer C., Guillet G., Cambazard F., Boralevi F., Ballarini S., Milliet C., Bertuccio P., la Vecchia C., Bach J.F., de Prost Y. Adjuvant treatment with the bacterial lysate (OM-85) improves management of atopic dermatitis: A randomized study. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 3, e0161555. doi: 10.1371/journal.pone.0161555.
11. Cazzola M. A new bacterial lysate protects by reducing infectious exacerbations in moderate to very severe COPD: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Trends in Medicine*, 2006, Vol. 6, no. 3, pp. 191-199.

12. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers: Pharmacology and toxicology. 2005. 30 p.
13. Han L., Zheng C.P., Sun Y.Q., Xu G., Wen W., Fu Q.L. A bacterial extract of OM-85 Broncho-Vaxom prevents allergic rhinitis in mice. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 2, pp. 110-116.
14. Hvalbye B.K., Aaberge I.S., Løvik M., Haneberg B. Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection. *Infect. Immun.*, 1999, Vol. 67, no. 9, pp. 4320-4325.
15. Lewandowski A., Christine M.D., Myers M.J. λ -Carrageenan initiates inflammation via activation of heterodimers TLR2/6 and TLR4/6. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, Suppl. 1, 42.12.
16. Orcel B., Delclaux B., Baud M., Derenne J.P. Oral immunization with bacterial extracts for protection against acute bronchitis in elderly institutionalized patients with chronic bronchitis. *Eur. Respir J.*, 1994, Vol. 7, pp. 446-452.
17. Rojy A., Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants-mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2008, Vol. 76, no. 5, pp. 353-359.
18. Tao Y., Yuan T., Li X., Yang S., Zhang F., Shi L. Bacterial extract OM-85 BV protects mice against experimental chronic rhinosinusitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 6, pp. 6800-6806.
19. Zhong H., Wei J., Yao Y., Fu R., Li H., Fu Q., Wen W. A bacterial extract of OM-85 Broncho-Vaxom suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and remodeling in a mouse chronic allergic asthma model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2017, Vol. 10, no. 2, pp. 1149-1157.

Авторы:

Крышень К.Л. — к.б.н., старший научный сотрудник, руководитель исследований АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Кухаренко А.Е. — к.фарм.н., менеджер по доклинической безопасности, отдел глобальных доклинических разработок ООО «Эбботт Лэбораториз», Москва, Россия

Вичаре Абхиджит С. — магистр ветеринарных наук, старший менеджер по токсикологии Abbott Healthcare Pvt. Ltd, промышленный район Марол, Восточный Андхери, Мумбаи, Индия

Гайдай Е.А. — биолог ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Крышень А.А. — руководитель лаборатории микробиологии ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Authors:

Kryshen K.L., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Director, Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Kukharensko A.E., PhD (Pharmacology), Preclinical Safety Manager, Global Preclinical Development Department, Abbott Laboratories LLC, Moscow, Russian Federation

Vichare Abhijit S. — Master (Veterinary Sciences), Senior Toxicology Manager, Abbott Healthcare Pvt. Ltd, Marol Industrial Area, Andheri East, Mumbai, India

Gaidai E.A., Biologist, Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Kryshen A.A., Head, Microbiology Laboratory, Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Гущин Я.А. — руководитель отдела гистологии и патоморфологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмолровский, Ленинградская обл., Россия

Gushchin Ya.A., Head, Department of Histology and Pathology, Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Калюжин О.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Kalyuzhin O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergy, Faculty of Medicine, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Макарова М.Н. — д.м.н., директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмолровский, Ленинградская обл., Россия

Makarova M.N., PhD, MD (Medicine), Director, Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Макаров В.Г. — д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмолровский, Ленинградская обл., Россия

Makarov V.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Махадеван Бринда — к.м.н., старший научный сотрудник департамента глобальных доклинических разработок, Abbott Healthcare Pvt. Ltd, промышленный район Марол, Восточный Андхери, Мумбаи, Индия

Mahadevan Brinda, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Abbott Healthcare Pvt. Ltd, Marol Industrial Area, Andheri East, Mumbai, India

Поступила 25.04.2019

Отправлена на доработку 06.05.2019

Принята к печати 21.05.2019

Received 25.04.2019

Revision received 06.05.2019

Accepted 21.05.2019