УДК 612. 017 : 616.24 – 002 – 022.7] – 092.18

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Костюшко А.В., Кондрашова Н.М., Маркелова Е.В.

ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет», Владивосток, e-mail: patphis-vl@mail.ru

Изучено влияние бактерий P. aeruginosa, E. coli, Enterobacter spp., выделенных из бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных с установленным диагнозом нозокомиальной пневмонии, на показатели функционального состояния клеточного иммунного ответа при моделировании пневмонии на экспериментальных животных. При изученных вариантах экспериментальной пневмонии происходит ранняя активация продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10, что не является благоприятным прогностическим признаком. Полученные в эксперименте данные показали, что бактерии обладают различной способностью воздействовать на клеточные иммунные реакции. При пневмонии, ассоциированной с P. aeruginosa, и пневмонии, ассоциированной с Enterobacter spp., преобладает гуморальный тип ответа; при пневмонии, вызванной E. coli, более выражен клеточный тип иммунного ответа.

Ключевые слова: пневмония, бактерии, цитокины, клеточный иммунитет

THE STUDYING OF THE CELLULAR IMMUNE ANSWER ACTIVITY WHILE MODEL OF THE EXPERIMENTAL BACTERIAL PNEUMONIA

Kostyushko A.V., Kondrashova N.M., Markelova E.V.

Vladivostok State Medical University, Vladivostok, e-mail: patphis-vl@mail.ru

It was studied the influence of bacteria P. aeruginosa, E. coli, Enterobacter spp. A secreted from bronchoalveolar lavage fluid of patients with the established diagnosis of nosocomial pneumonia to the indices of the functional condition of the cellular immune answer while modeling pneumonia to the experimental animals. In the study of variations of experimental pneumonia occurs early activation of anti-inflammatory cytokine production of IL-10, which is not a favorable prognostic sign. The information obtained during the experiment showed that bacteria possess various ability to influence on the cellular immune reactions. In the pneumonia associated with P. aeruginosa, and the pneumonia associated with Enterobacter spr. prevails humoral type of response, with the pneumonia caused by E. coli, a more pronounced cellular type of immune response.

Keywords: pneumonia, bacteria, cytokine, cellular immunity

Патогенные и иммуногенные свойства бактериальных агентов играют значительную роль в реализации экссудативно-деструктивного воспалительного процесса, развивающегося в легочной ткани при нозокомиальной пневмонии (НП) [2, 5, 8]. Это обусловлено прямым повреждающим действием микроорганизмов и их токсинов, численностью и функциональной активностью фагоцитирующих клеток в зоне воспаления, а также уровнем синтеза провоспалительных биологически активных веществ [3, 7]. Среди факторов повреждения ткани легкого одно из главных мест отводится липополисахариду (ЛПС), источником которого являются грамотрицательные бактерии. Известно, что ЛПС индуцирует секрецию моноцитами, макрофагами и нейтрофилами провоспалительных цитокинов и факторов хемотаксиса. Компоненты бактерий вызывают активацию макрофагов, которая проявляется повышением экспрессии костимулирующих молекул, скеведжер-рецепторов, индукцией респираторного взрыва с усиленной продукцией нитроксидных радикалов, усилением фагоцитоза и стимуляцией провоспалительного сигналлинга [1, 4, 6].

Целью работы явилось изучение влияния бактерий *P. aeruginosa, E. coli, Enterobacter spp.* на показатели функционального состояния клеточного иммунного ответа при моделировании пневмонии на экспериментальных животных.

Материалы и методы исследования

Штаммы *P. aeruginosa, E. coli, Enterobacter spp.* были выделены из бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных с установленным диагнозом НП. Исследование выполнено на неинбредных белых мышах весом 18–25 грамм. Эксперимент проводился с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН (Протокол № 1, 03.09.2005 г.), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Модель экспериментальной пневмонии получали, интраназально заражая мышей штаммами бактерий в дозе, соответствующей LD_{50}. Забор материала для исследования производился на 1 сутки (через 1, 6, 12, 24 часа от начала эксперимента), а также на 3, 7, 14 сутки эксперимента путем декапитации лабораторных животных под эфирным наркозом. Фагоцитарную активность клеток оценивали по поглощению частиц полистирольного латекса. Бактерицидную активность фагоцитирующих клеток изучали в спонтанном и инду-

цированном НСТ-тесте. Антителообразование было исследовано по уровню антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей по общепринятой методике. Продукцию цитокинов оценивали по их уровню в супернатанте гомогенизата легочной ткани методом ИФА с использованием реактивов «R&D system Inc.» (mouse IFNγ, mouse IL-10). Обработку результатов проводили с использованием модулей «W-критерий Вилкоксона» и «U-критерий Манна-Уитни» статистического пакета SPSS v16.0. Критическое значение уровня значимости W-критерия принималось равным 0,062, U-критерия 0,032 при 0,05 уровне достоверности для численности групп $n_1 = 5$ и $n_2 = 5$.

Результаты исследования и их обсуждение

Функциональная активность фагоцитирующих клеток в группе мышей, зараженных *P. aeruginosa*, была более низкой (43,12 ± 1,07 %, $p_U = 0,032$), чем в других экспериментальных группах и оставалась практически неизменной до 14 суток исследования. Тем не менее, поглотительная способность фагоцитов при синегнойной инфекции была значительно выше, чем в других исследованных группах, особенно в 1 – 3 сутки эксперимента (8,54 ± 0,05, $p_U = 0,027$). В группах мышей, зараженных *E. coli* и *Enterobacter spp.*, активность фагоцитоза в 1 сутки отличалась незначительно (75,29 ± 0,93 и 72,62 ± 1,51 % соответственно), постепенно снижаясь к 14 суткам эксперимента (63,28 ± 0,97 и 65,91 ± 1,03 %). По степени поглощения латекса данные группы также мало отличались между собой.

Изучение влияния бактериальных агентов на спонтанную и индуцированную бактерицидную активность фагоцитирующих клеток показало, что *P. aeruginosa* вызывает максимальную способность клеток к оксидазному взрыву в 1 сутки, при этом наиболее выраженная бактерицидная активность была зафиксирована через 6 часов после заражения мышей (НСТ-тест 3,02 ± 0,05 усл. ед, индекс стимуляции 1,8). При заражении мышей *Enterobacter spp.* максимальный показатель активности в НСТ-тесте также приходился на 1 сутки, однако был ниже, чем при заражении мышей *P. aeruginosa* и *с* меньшей стимулирующей способностью (2,84 ± 0,03 усл. ед., индекс стимуляции 1,3). В группе мышей, зараженных *E. coli*, пик бактерицидной активности наблюдался на 3 сутки эксперимента (2,83 ± 0,04 усл. ед., индекс стимуляции 1,5).

Установлено, что при моделировании пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa*, происходит увеличение массы селезенки более чем в 2,5 раза по сравнению с органами контрольных животных. При заражении мышей *E. coli* и *Enterobacter spp.* также было выявлено увеличение массы селезенки в 2 раза. Показатель АОК селезенки в контрольной группе мышей был достоверно выше, чем в опытных группах (33,64 ± 1,25, $p_U = 0,018$). Число АОК селезенки в опытных группах в первые сутки эксперимента было значительно ниже, особенно в группе мышей, зараженных *Enterobacter spp.* (13,22 ± 1,08, $p_W = 0,058$). Дальнейшие исследования показали, что уровень АОК в опытных группах продолжал снижаться к 7 – 14 суткам эксперимента. Заражение мышей *P. aeruginosa* приводило к выраженной супрессии образования АОК селезенки на 7 сутки эксперимента (5,69 ± 1,26, $p_U = 0,025$). В то же время в модели пневмонии, вызванной *E. coli*, уровень АОК не претерпевал критических сдвигов на всем протяжении эксперимента, оставаясь в пределах 20,65 ± 2,07 ($p_W = 0,062$).

Ранний цитокиновый ответ при заражении мышей возбудителями НП характеризовался преобладанием продукции ИЛ-10 как на 1 сутки, так и на 3 сутки после заражения. При этом максимальные средние концентрации оппозитных цитокинов были зафиксированы у мышей, зараженных *Enterobacter spp.* Достоверная разница в содержании ИФНγ на 1 сутки после заражения была определена между группами мышей с экспериментальной пневмонией, вызванной *Enterobacter spp.* и пневмонией, вызванной *E. coli* (131,92 ± 23,48 пг/мл против 65,93 ± 9,78 пг/мл, $p_U = 0,032$). При заражении экспериментальных животных *P. aeruginosa* происходило самое выраженное снижение содержания ИФНγ в супернатанте легочной ткани (40,45 ± 5,85 пг/мл, $p_U = 0,008$). На 3 сутки с момента заражения локальная продукция ИФНγ при синегнойной пневмонии у мышей снижалась (32,26 ± 4,07 пг/мл, $p_W = 0,080$), при других вариантах экспериментальных пневмоний, напротив, происходило увеличение концентрации ИФНγ. Достоверная разница между показателями была зафиксирована при пневмонии, вызванной *E.coli* (91,35 ± 7,57 пг/мл, $p_W = 0,043$). Увеличение концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-10 через 1 сутки происходило при всех вариантах экспериментальных пневмоний в сравнении с локальным уровнем ИЛ-10 у интактных мышей (85,03 ± 5,08 пг/мл). Максимальная концентрация ИЛ-10 была зарегистрирована в исследовании при энтеробактериальной пневмонии (375,18 ± 68,86 пг/мл). Менее всего изменился уровень ИЛ-10 при пневмонии, вызванной *E. coli* (103,64 ± 8,13 пг/мл). На 3 сутки после заражения уровень ИЛ-10 при экспериментальной пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, оставался высо-

ким (165,95 ± 16,87 пг/мл, $p_U = 0,225$). При пневмонии, вызванной *E. coli*, происходило незначительное снижение уровня ИЛ-10 до 90,88 ± 5,89 пг/мл ($p_U = 0,080$). При экспериментальной пневмонии, вызванной *Enterobacter spp.*, уровень ИЛ-10 на 3 сутки после заражения (261,77 ± 26,93 пг/мл) был достоверно выше, чем при синегнойной пневмонии ($p_U = 0,032$) и при пневмонии, вызванной *E. coli* ($p_U = 0,008$).

Полученные в эксперименте данные показали, что бактерии, вызывающие развитие нозокомиальной пневмонии, обладают различной способностью воздействовать на клеточные иммунные реакции. Показано, что *P. aeruginosa* оказывает выраженное иммуносупрессирующее воздействие как на фагоцитарное звено иммунитета, так и на гуморальный иммунный ответ. По уровню фагоцитарной активности, степени поглощения латекса и бактерицидной способности фагоцитирующих клеток *E. coli* и *Enterobacter spp.* обладают схожими характеристиками.

Имеются достоверные отличия между бактериями изученных штаммов по степени воздействия на локальный цитокиновый ответ при пневмонии: *P. aeruginosa* вызывает выраженное угнетение продукции провоспалительного цитокина ИФНγ. *Enterobacter spp.*, напротив, способствует увеличению ИФНγ. При всех вариантах экспериментальных пневмоний происходит ранняя активация продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10, что не является благоприятным прогностическим признаком, так как ранняя и избыточная продукция противовоспалительных цитокинов изменяет последовательность механизмов противоинфекционной защиты и усугубляет течение воспалительного процесса. При всех изученных этиологических вариантах экспериментальной пневмонии выявлена ранняя локальная гиперпродукция ИЛ-10, сопряженная с недостаточностью фагоцитоза, наиболее значимой при пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa* ($r = 0,7423$, $p = 0,0517$), и при пневмонии, ассоциированной с *Enterobacter spp.* ($r = 0,6321$, $p = 0,0485$). Кроме того, выявлены различия типов иммунного ответа при исследованных вариантах экспериментальной пневмонии: при пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa,* на протяжении всего исследования преобладает гуморальный тип ответа (ИФНγ/ИЛ-10 составлял 0,24 – 0,19 ± 0,028), так же как и пневмонии, ассоциированной с *Enterobacter spp.* (ИФНγ/ИЛ-10 = 0,55–0,35 ± 0,034). При пневмонии, вызванной *E. coli*, в первые сутки после заражения также наблюдалось преобладание гуморальных влияний (ИФНγ/ИЛ-10 = 0,64 ± 0,023), однако в последующем соотношение оппозитных цитокинов менялось, к 14 суткам эксперимента происходила постепенная смена типа иммунного ответа на клеточный (ИФНγ/ИЛ-10 = 1,003 – 1,108 ± 0,035). Таким образом, активность клеточного иммунного ответа при пневмонии зависит от вида возбудителя. Более выраженное угнетение клеточных функций происходит при пневмонии, ассоциированной с *P. aeruginosa* и *Enterobacter spp.,* что необходимо учитывать при назначении иммунотропной терапии. Как один из возможных способов переключения иммунного ответа с гуморального на клеточный представляется проведение селективного удаления избытка продукции ИЛ-10 и назначение заместительной иммуномодулирующей терапии с акцентом на активацию фагоцитарного звена иммунитета.

Список литературы

1. Влияние бактериальных лигандов паттерн-распознающих рецепторов моноцитоподобных клеток ТНП-1 на их трансэндотелиальную миграцию / Э.А. Старикова, Д.И. Соколов, Л.А. Бурова, С.А. Сельков, И.С. Фрейдлин // Мед. иммунология. – 2008. – Т. 10, №6. – С. 571–576.

2. Using local microbiologic data to develop institution-specific guidelines for the treatment of hospital-acquired pneumonia / J.R. Beardsley, J.C. Williamson, J.W. Johnson, C.A. Ohl, T.B. Karchmer, D.L. Bowton // Chest. – 2006. – Vol. 130. – P. 787–793.

3. Earlyand late-onset pneumonia: is this still a useful classification? / P. Gastmeier, D. Sohr, C. Geffers, H. Ruden, R.P. Vonberg, T. Welte // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – P. 2714–2718.

4. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell serface Toll-like receptprs // Semin. Immunol. – 2007. – Vol. 19. – P. 3–10.

5. Clinical practice guidelines for hospitalacquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults / C. Rotstein, G. Evans, A. Born // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 19. – P. 19–53.

6. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? / Ameta-analysis, N. Safdar, J. Handelsman, D.G. Maki // Lancet Infect. Dis. – 2004. – Vol.4. – P. 519–527.

7. Macrophage receptors and immunorecofnition / P.R. Taylor, L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H.H. Lin, G.D. Brown, S. Gordon // Annu. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 23. – P. 901–944.

8. Vinsent J. Nosocomial infections in adult intensive-care units // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 2068–2077.

Рецензенты:

Елисеева Е.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой ГОУ ВПО ВГМУ, г. Владивосток;

Просекова Е.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО ВГМУ, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 08.11.2011.