

УДК 57.083.3:616.24

ОЦІНКА РІВНЯ ДЕЯКИХ ЦИТОКІНІВ ПРИ ПНЕВМОНІЇ РІЗНОМАНІТНОЇ ЕТІОЛОГІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Коляда Т.І., Бруснік С.В., Михайличенко М.С.,
Агтїков В.Є., Нестеренко А.М., Коляда О.М.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова АМНУ»

Відомо, що цитокіни відіграють ключову роль в патогенезі запальної реакції. Як «гормони» імунної системи, цитокіни мають важливе значення в її адекватному функціонуванні та слугують основою розвитку імунного процесу.

За даними літератури цитокінова реакція розгортається вже в першу годину після інтраназального введення *S. aureus*, де спостерігалось різке підвищення запального білка макрофагів (MIP-2) та хемокіну, що синтезується кератиноцитами (KC). Через 6 годин спостерігається також різке підвищення концентрації IL-1 β , IL-6 та колоніестимулюючого фактора моноцитів та гранулоцитів. На цьому фоні спостерігалось виразне зниження протизапальних цитокінів, а саме IL-10, IL-17, IL-12p70 та IFN- γ . Отже, вже в перші 30 хвилин після інфікування починається активний синтез хемокінів та цитокінів, перш за все направлений на рекрутинг фагоцитуючих клітин до легень. Через 6 годин спостерігається переключення синтезу в бік підвищення вмісту протимікробних пептидів, опсонинів, прозапальних медіаторів та білків коагуляції [1].

Цитокіни, що регулюють активацію макрофагів, грають важливу роль в розвитку протигрибкової активності. Зокрема, найбільш активним та важливим її стимулятором вважається інтерферон- γ , котрий здатен активувати велику кількість киснезалежних та кисненезалежних шляхів кілінгу *C. albicans*, здатен поновлювати активність макрофагів, що зістарілися *in vitro*, а також індукувати морфологічні зміни в моноцитах. Відомо, що у відповідь на інфікування *Candida albicans* поряд із підвищенням рівню IFN- γ спостерігається різке підвищення рівню IL-12, котрий поряд із інтерфероном- γ вважається індуктором реакції по Th1-типу. Також в літературі вказується на участь у розвитку протигрибкової активності IL-1, колоніестимулюючого фактору макрофагів, фактору гранулоцитів та моноцитів [2]. Сьогодні проводяться активні експериментальні дослідження усіх вказаних речовин, оскільки вони можуть слугувати альтернативою існуючій протикандидозній терапії. Зокрема, існують дані щодо можливості корекції цього стану шляхом індукції реакції по Th1-типу, за рахунок синтезу IFN- γ завдяки введенню IL-12 або рекомбінантного IL-12 із розчинним рецептором IL-4 [3].

Матеріали та методи

У якості модельного об'єкту експерименту були обрані самиці мишей лінії Balb/c, середньою вагою 21,5 грами, отримані із виварію ДУ "ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ".

В ході підбору дози інфікування 75 мишей було розподілено на шість дослідних груп (n=10), котрих інфікували інтраназально по 0,1 мл *S. aureus* в дозах 10⁷, 10⁸, 10⁹ КУО та *C. albicans* у тих же дозах та одну контрольну групу (n=5). На сьому добу після інфікування мишей усіх шести груп було виведено із експерименту за для підтвердження наявності інфекційного запалення легень мікробіологічними та гістологічними методами. На основі отриманих результатів вказаних досліджень була підібрана доза *S. aureus* - 10⁸ КУО, що викликає запальний процес у легенях та доза *C. albicans* - 10⁹ КУО.

Для вивчення спільного впливу *S. aureus* та *C. albicans* на імунологічні показники 10 мишам вводили інтраназально по 0,1 мл суспензії обох збудників у наступних дозах: *S. aureus* - 10⁸ КУО та *C. albicans* - 10⁹ КУО.

В експерименті були використані наступні штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 885-653), котрі були отримані з музею мікроорганізмів ДУ "ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ".

Згідно поставленої в експерименті мети було відтворено модель інфекційної пневмонії на мишах [4].

В ході відтворення моделі інфекційного запалення легень 64 миші середньою вагою 22 грами було розподілено на наступні групи (по 8 тварин у кожній):

I група - інфіковані культурою *S. aureus* у дозі 1 \times 10⁸ КУО, виведені із експерименту на третю добу. **II група** - інфіковані культурою *S. aureus* у дозі 1 \times 10⁸ КУО, виведені із експерименту на шосту добу. **III** - інфіковані культурою *C. albicans* у дозі 1 \times 10⁸ КУО, виведені із експерименту на третю добу. **IV група** - інфіковані культурою *C. albicans* у дозі 1 \times 10⁸ КУО, виведені із експерименту на шосту добу. **V група** - тварини, інфіковані суспензією, що містила культури *S. aureus* (10⁸ КУО) та *C. albicans* (10⁹ КУО), виведені із експерименту на третю добу. **VI група** - тварини, інфіковані суспензією, що містила культури *S. aureus* (10⁸ КУО) та *C. albicans* (10⁹ КУО), виведені із експерименту на шосту добу. **VII група** - інтактні тварини, виведені із експерименту на третю добу. **VIII група** - інтактні тварини, що були виведені із експерименту на шосту добу. Всі миші були інфіковані інтраназальним шляхом. Декапітація піддослідних тварин здійснювалось під ефірним наркозом.

Рівень цитокінів ІФН- γ (діапазон вимірювання 0 - 1000 пг/мл; чутливість набору - 5 пг/мл), КС (ІЛ-8 у мишей) (діапазон вимірювання 0 - 250 пг/мл; чутливість набору - 2 пг/мл), ІЛ-4 (діапазон вимірювання: 0 - 100 пг/мл; чутливість - 0,4 пг/мл) в бронхо-альвеолярному лаважі досліджувався методом імуноферментного аналізу на імуноферментному аналізаторі Stat-Fax за допомогою тест-систем фірми "Вектор-БЕСТ" (Росія). Дані по чутливості та діапазону вимірювання наведені згідно інструкцій до зазначених діагностичних наборів.

Таблиця 1– Загибель піддослідних тварин при інфікуванні різноманітними збудниками інфекційної пневмонії

Кількість загиблих тварин	(S. aureus)		(C. albicans)		(S. aureus та C. albicans)		Контроль	
	I група (n=8)	II група (n=8)	III група (n=8)	IV група (n=8)	V група (n=8)	VI група (n=8)	VII група (n=8)	VIII група (n=8)
	3 доба	6 доба	3 доба	6 доба	3 доба	6 доба	3 доба	6 доба
Кількість	0	0	0	2	0	5	0	0
%	0	0	0	20	0	50	0	0

Примітка: n – кількість тварин у групі.

Загибель в результаті інфікування була зареєстрована у наступних групах: у IV групі (C. albicans, 6-та доба) – 2 миші (20 %); у VI групі (мікстинфекція) – 5 мишей (50 %). У групах, що були інфіковані S. aureus летальність тварин була відсутньою.

Таким чином, найбільший відсоток летальності тварин, у котрих за результатами мікробіологічних досліджень було виявлено збудник у легенях, та гістологічним дослідженням підтверджено наявність запального легеневого процесу, становив 50 % у групі із мікстинфекцією у порівнянні з іншими групами.

Щодо досліджуваних показників, то у тварини, що були інфіковані S. aureus, спостерігалось під-

Методи дослідження

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входять в пакет Microsoft Office Professional 2003[®], на персональному комп'ютері у програмі Excel[®] із використанням критерію Ст'юдента. За рівень вірогідності приймалися значення показника між групами (p), які дорівнювали або були меншими за 0,05.

Результати та їх обговорення

В ході експерименту був зареєстрований деякий відсоток загибелі піддослідних тварин.

вищення рівня ІФН- γ на третю добу (I група) перебігу процесу, котрий склав у порівнянні із контролем (VII група) - (58 \pm 2,7) пг/мл та (45,7 \pm 2,0) пг/мл, (p<0,05), (рис. 1). На шосту добу перебігу захворювання (II група) рівень цього показника не відрізнявся від контрольного (VIII група) - (47,3 \pm 2,8) пг/мл та (46,0 \pm 2,2) пг/мл, (рис. 2). В динаміці спостерігається зниження рівня ІФН- γ до контрольного значення.

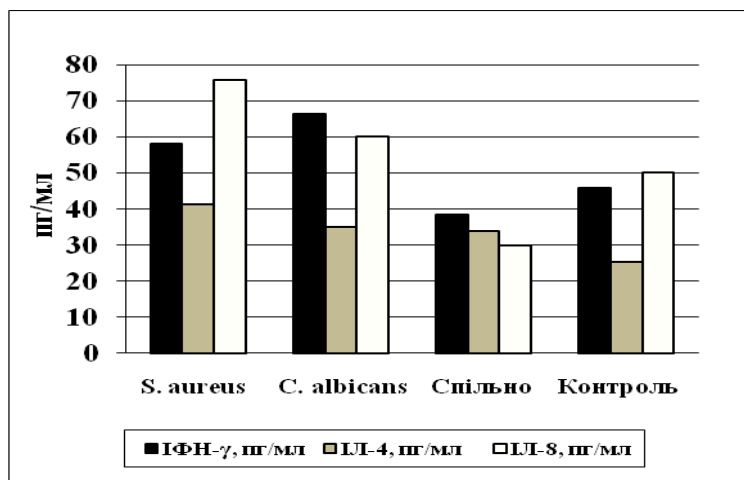


Рис. 1 - Рівень цитокінів на третю добу перебігу інфекційного процесу

Рівень ІЛ-4 у тварин зі стафалокочковою легеневою інфекцією був достовірно підвищеним на третю добу (І група), на шосту ж - (ІІ група) перебігу захворювання спостерігалась тенденція до його підвищення у порівнянні з контролями (VІІ та VІІІ групи) - $(41,4 \pm 2,3)$ пг/мл та $(25,3 \pm 2,3)$ пг/мл, ($p < 0,05$), (рис. 1); $(32,6 \pm 2,5)$ пг/мл та $(24,7 \pm 2,0)$ пг/мл відповідно, ($p < 0,1$), (рис. 2). В динаміці мала місце тенденція до зниження цього показника - $(41,4 \pm 2,3)$ пг/мл у І групі та $(32,6 \pm 2,5)$ пг/мл у ІІ групі тварин, що були інфіковані *S. aureus*.

Щодо рівня ІЛ-8, то у тварин, інфікованих *S. aureus*, на третю та шосту добу він був істотно підвищеним і складав проти контролю - $(75,7 \pm 2,1)$ пг/мл у І групі проти $(50 \pm 2,2)$ пг/мл в VІІ групі, (рис. 1) та $(89,4 \pm 2,5)$ пг/мл в ІІ групі проти $(52,1 \pm 2,1)$ пг/мл в VІІІ групі, (рис. 2). Отже, в динаміці - достовірне підвищення рівня ІЛ-8 на шосту добу перебігу стафілококового інфекційного процесу - $(75,7 \pm 2,1)$ пг/мл (І група) та $(89,4 \pm 2,5)$ пг/мл (ІІ група), ($p < 0,05$). Загальний стан тварин цієї групи к шостій добі перебігу запального процесу був дещо кращим в порівнянні із третьою добою.

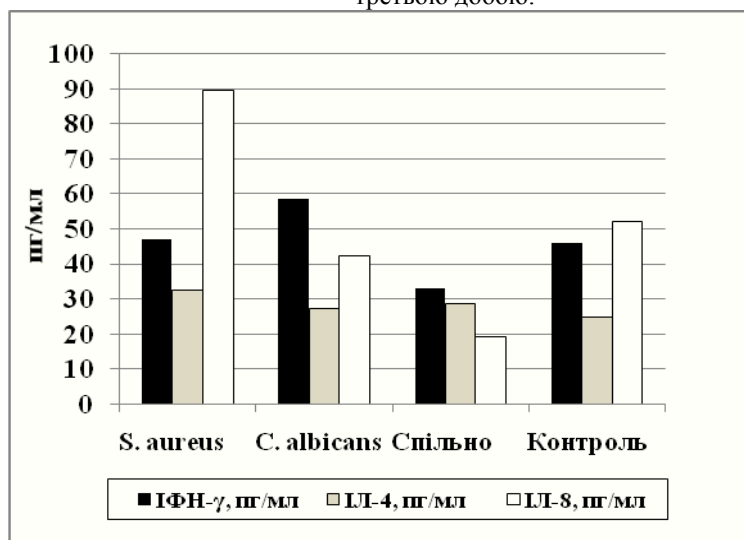


Рис. 2 - Рівень цитокінів на шосту добу перебігу інфекційного процесу.

В групі тварин, що були інфіковані *C. albicans* (ІІІ група), рівень ІФН- γ був істотно підвищеним у порівнянні із контролем (VІІ група) - $(66,4 \pm 2,3)$ пг/мл проти $(45,7 \pm 2,0)$ пг/мл, ($p < 0,05$) на третю добу, (рис. 1), та на шосту (ІV група) зберігався його підвищений рівень в порівнянні із відповідним контролем (VІІІ група) - $(58,7 \pm 2,6)$ пг/мл та $(46,0 \pm 2,2)$ пг/мл, ($p < 0,05$), (рис. 2). Максимальне значення ІФН- γ при кандидозному легеневому процесі зареєстровано на третю добу.

Рівень ІЛ-4 в цій групі на третю добу (ІІІ група) мав тенденцію до підвищення - $(35 \pm 2,9)$ пг/мл проти контролю - VІІ група $(25,3 \pm 2,3)$ пг/мл, ($p < 0,1$), (рис. 1). На шосту добу рівень ІЛ-4 не відрізнявся від рівня цього показника у контролі - $(27,2 \pm 2,0)$ пг/мл проти $(24,7 \pm 2,0)$ пг/мл, (рис. 2). В динаміці кандидозного легеневого процесу спостерігається тенденція до зниження рівня ІЛ-4 к шостій добі - $(35 \pm 2,9)$ пг/мл на третю добу та $(27,2 \pm 2,0)$ пг/мл на шосту, ($p < 0,1$).

Рівень ІЛ-8 на третю добу (ІІІ група) в порівнянні з контролем (VІІ група) був підвищеним - $(60 \pm 3,0)$ пг/мл проти $(50 \pm 2,2)$ пг/мл, на шосту ж (ІV

група) - зниженим ($42,4 \pm 2,1$) пг/мл проти ($52,1 \pm 2,1$) пг/мл, ($p < 0,05$). В динаміці процесу, таким чином, на шосту добу спостерігається зниження рівня ІЛ-8. Значного покращення загального стану тварин інфікованих цим збудником на шосту добу перебігу запального процесу не спостерігалось.

Найбільшу увагу привертають дані, що були отримані для групи тварин, спільно інфікованих *S. albicans* та *S. aureus*. У протилежність контрольним групам, та групам тварин, що були інфіковані тільки одним збудником, у них спостерігалось незначне зниження ІФН- γ у порівнянні із контролем ($38,3 \pm 2,8$) пг/мл в (V група) проти ($45,7 \pm 2,0$) пг/мл (VII група), ($p < 0,05$), на тлі тенденції до підвищення рівня ІЛ-4 ($34 \pm 2,4$) пг/мл проти ($25,3 \pm 2,3$) пг/мл, ($p < 0,1$) на третю добу перебігу запального процесу (рис. 1).

Значення ІЛ-8 у тварин, що були інфіковані обома збудниками запального процесу легень, на третю добу (V група) різко знижувалось в порівнянні з контролем (VII група) - ($30 \pm 2,9$) пг/мл проти ($50 \pm 2,2$) пг/мл, ($p < 0,05$), (рис. 1), при цьому спостерігалось подальше його зниження, і на шосту добу (VI група) воно склало ($19,2 \pm 3,0$) пг/мл в порівнянні з контролем (VIII група) ($52,1 \pm 2,1$) пг/мл, ($p < 0,05$), (рис. 2). Отже, в динаміці відмічено достовірне зниження рівня ІЛ-8 - ($30 \pm 2,9$) пг/мл на третю добу в порівнянні з ($19,2 \pm 3,0$) пг/мл на шосту, ($p < 0,05$).

При інфікуванні *S. aureus* виявлено підвищення ІЛ-8, який має стимулюючий вплив на нейтрофіли як фактор їх міграції до вогнища запалення (NAP-1) й активації та на макрофаги, підвищуючи їх секреторну здатність, що сприяє адекватній боротьбі із інфекційним агентом. При інфікуванні *Candida albicans* відмічалось суттєве підвищення рівня ІФН- γ , котрий зокрема є важливим стимулятором протиканцидної активності як активатор макрофагів. Також показано, що у відповідь на інфікування *S. albicans* поряд із підвищенням рівня ІФН- γ спостерігається підвищення ІЛ-4, який поряд із ІФН- γ вважається індуктором реакції по Th1-типу. В динаміці кандидозного інфекційного процесу має місце зниження рівня ІЛ-8 к шостій добі, що призводить до зниження вмісту нейтрофілів та лімфоцитів. В умовах сумісного інфікування *S. albicans* та *S. aureus* констатовано зниження рівня ІФН- γ та суттєве зниження ІЛ-8 в порівнянні із контролем, що, імовірно, обумовлює зниження відносного вмісту макрофагів й нейтрофілів та їх активності по відношенню до збудників, погіршуючи перебіг запального процесу легень, що відобразилось, зокрема, в незадовільному загальному стані піддослідних тварин.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що запальний легеневий процес, що був викликаний *S. aureus*, супроводжується інтенсивною продукцією прозапальних цитокінів, зокрема, ІФН- γ , ІЛ-4 та ІЛ-8.

2. При інфікуванні *Candida albicans* зареєстровано переважання синтезу ІФН- γ .

3. В групі, що була інфікована обома збудниками (*S. aureus* та *S. albicans*) на третю добу, спостерігалось зниження рівня цитокінів, зокрема, ІЛ-8 що є специфічним по відношенню до нейтрофілів та лімфоцитів, а також зниженням активатора макрофагів та моноцитів ІФН- γ .

4. В динаміці стафілококового запального процесу легень к шостій добі спостерігається зниження до норми запального цитокіну ІФН- γ та зниження ІЛ-4, які обумовлюють гальмування подальшого розвитку запального процесу, що призводить до покращення стану тварин.

5. При кандидозному процесі в легенях у динаміці на шосту добу відмічено зниження ІЛ-8 - активатору моноцитарно-макрофагальної ланки та нейтрофілів. Цей факт, можливо, обумовлює 20 % летальність тварин цієї групи в експерименті.

6. При умові мікстинфекції в динаміці на шосту добу перебігу процесу рівень ІЛ-8 зазнав ще більшого зниження, що може відобразитись на пригніченні стану фагоцитарної активності як фагоцитів крові так і бронхо-альвеолярного лаважу. Ці зміни, можливо, пояснюють 50 % загибель тварин із мікстинфекцією.

Перелік посилань

1. Ventura, C. L. Staphylococcus aureus elicits marked alterations in the airway proteome during early pneumonia/Ventura C. L., Higdon R., Hohmann L., et al. // Infection and immunity. - 2008. - V. 76, № 12. - p. 5862 – 5872.
2. Rotstein, D. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils/Rotstein D., Parodo J., Taneja R., et al. // Shock. - 2000. - V.14 - №3. - p. 278 - 283.
3. Kobayashi, M. Effect of a combination therapy between IL-12 and soluble IL-4 receptor (sIL-4R) on *Candida albicans* and herpes simplex virus type I infections in thermally injured mice/Kobayashi M., Takahashi H., Herndon D. N., et al. // Can. J. Microbiol. - 2002. - V. 48. - № 10. - p.886 - 894.
4. Ventura, C. L. Host Airway Proteins Interact with *Staphylococcus aureus* during arly Pneumonia/Ventura C. L., Higdon R.R., Kolker E., et al. // Infection and immunity. - 2008. - V. 76. - № 3. - p. 888 – 898.

УДК 57.083.3:616.24

ОЦІНКА РІВНЯ ДЕЯКИХ ЦИТОКІНІВ ПРИ ПНЕВМОНІЇ РІЗНОМАНІТНОЇ ЕТІОЛОГІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Коляда Т.І., Бруснік С.В., Михайличенко М.С., Аттіков В.С., Нестеренко А.М., Коляда О.М.

Цитокінам належить ключова роль у розвитку запальної реакції. Рівень синтезу цитокінів має характерні особливості залежно від типу збудника запального процесу в легенях. Для стафілококового запального процесу характерне значне підвищення рівнів прозапальних цитокінів - ІФН- γ , ІЛ-4 та ІЛ-8, бронхоальвеолярного лаважу, кандидозний ж,

характеризується переважанням синтезу ІФН- γ . За умови спільного введення цих збудників спостерігається пригнічення синтезу ІФН- γ та ІЛ-8. У динаміці при стафілококковому процесі відбувається нормалізація досліджуваних показників до рівня норми, в динаміці ж кандидозного процесу спостерігається значне пригнічення синтезу активатора моноцитарно-макрофагальної ланки і нейтрофілів, ІЛ-8.

Ключові слова: інфекційна пневмонія, цитокіни, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

УДК 57.083.3:616.24

ОЦЕНКА УРОВНЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПНЕВМОНИИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Коляда Т.И., Брусник С.В., Михайличенко М.С., Аткиков В.Е., Нестеренко А.М., Коляда О.Н.

Цитокинам принадлежит ключевая роль в развитии воспалительной реакции. Уровень синтеза цитокинов имеет характерные особенности в зависимости от типа возбудителя воспалительного процесса в легких. Для стафилококкового воспалительного процесса характерно значительное повышение уровней провоспалительных цитокинов - ИФН- γ , ИЛ-4 и ИЛ-8, бронхоальвеолярного лаважа, кандидозный же, характеризуется преобладанием синтеза ИФН- γ . При условии совместного введения этих возбудителей наблюдается угнетение синтеза ИФН- γ и ИЛ-8. В динамике при стафилококковом процессе происходит нормализация изучаемых показателей до уровня нормы, в динамике же кандидозного процесса наблюдается значительное угнетение синтеза активатора моноцитарно-макрофагального звена и нейтрофилов, ИЛ-8.

Ключевые слова: инфекционная пневмония, цитокины, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

UDC 57.083.3:616.24

ASSESSMENT OF THE LEVEL OF SOME CYTOKINES IN PNEUMONIA OF DIFFERENT ETIOLOGY IN THE EXPERIMENT

Kolyada T.I., Brusnik S.V., Mikhailichenko M.S., Attikov V.E., Nesterenko A.M., Kolyada O. N.

Cytokines have a key role in inflammatory response development. The cytokine synthesis level has distinct features depending on the type of the pathogen that induces the inflammatory process in the lungs. For inflammatory response, induce by *Staphylococcus*, a significant increase in the levels of proinflammatory cytokines IFN- γ , IL-4 and IL-8 is observed. IFN- γ , IL-4 and IL-8 in bronchoalveolar lavage. *Candida* infection of the lungs is characterized by a dominating increase in IFN- γ . In the case of combined inoculation of the two mentioned above pathogens a decrease in IFN- γ and synthesis is observed. While observing the dynamics, in case of *Staphylococcal* infection it is established that the increased levels of proinflammatory cytokines are gradually decreasing to normal values, as for the *Candida* infection a

significant decrease in IL-8 level, an activator of macrophages and neutrophils, was established.

Keywords: infectious pneumonia, cytokines, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.