

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 15, №1

2016



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

УДК 616.988.5-001.18-097-084-085.37:615.37:615.771.7

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАПРОТА, ТРЕКРЕЗАНА И ПОЛИОКСИДОНИЯ И ИХ КОМБИНАЦИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БРОНХОЛЕГОЧНОМ ВОСПАЛЕНИИ У КРЫС© Зарубина И.В.¹, Мокренко Е.В.^{1,2}, Болахан А.В.¹, Шабанов П.Д.^{1,3}¹ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Россия, 194044, Санкт-Петербург, ул. Ак. Лебедева, 6²ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет», Россия, 664003, Иркутск, ул. Карла Маркса, 10³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Ак. Павлова 12

Резюме: в работе сравнивали противовоспалительное и иммуностимулирующее действие метапрота (25 мг/кг), трекрезана (25 мг/кг) и полиоксидония (0,75 мг/кг) при моделировании бронхолегочного воспаления у крыс. При экспериментальной бронхопневмонии, вызванной введением скипидара в бронхи животных, все три препарата при курсовом применении (5 дней) выявили противовоспалительный эффект, заключающийся в повышении выживаемости животных и улучшении морфологической картины легких. Иммуностимулирующее действие также отмечено для всех исследуемых препаратов в тестах реакции торможения миграции лимфоцитов с митогенами фитогемагглютинином и конканавалином А, повышения механизмов неспецифической защиты по показателям фагоцитоза, лизосомально-катионном тесте (ЛКТ) и тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). При монотерапии экспериментальной бронхопневмонии препараты располагаются по возрастанию их иммуностимулирующего действия в следующем порядке: метапрот < трекрезан < полиоксидоний < метапрот + полиоксидоний = метапрот + трекрезан. Кроме того, метапрот, в отличие от трекрезана, полиоксидония и их комбинации с метапротом, усиливал флуоресценцию флавопротеидов и снижал флуоресценцию восстановленных пиридиннуклеотидов в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах крови крыс, что свидетельствует об усилении интенсивности тканевого дыхания клеток.

Ключевые слова: антигипоксанты, иммуномодуляторы, метапрот, трекрезан, полиоксидоний, экспериментальная пневмония, противовоспалительное действие, иммуностимулирующее действие, легкие, лимфоциты, крысы

ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNE STIMULANT ACTIVITY OF METAPROT, TREKREZAN AND POLYOXIDONIUM AND THEIR COMBINATIONS IN BRONCHOPULMONARY INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL RATSZarubina I.V.¹, Mokrenko E.V.^{1,2}, Bolekhan A.V.¹, Shabanov P.D.^{1,3}¹Kirov Military Medical Academy, Russia, 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6²Irkutsk State Medical University, Russia, 664003, Irkutsk, Karl Marx St., 10³Institute of Experimental Medicine, Russia, 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12

Summary: anti-inflammatory and immune stimulant properties of metaprot (25 mg/kg), trekrezan (25 mg/kg) and polyoxidonium (0.75 mg/kg) have been compared with bronchopulmonary inflammation in experimental rats. In bronchopulmonary inflammation due to administration of turpentine into the trachea of the experimental rats, all three drugs following a course of their administration (in 5 days) demonstrated anti-inflammatory effect that performed in survival of rats and in improvement of morphological picture of the pulmonary tissue. Immune stimulating effect was revealed in administration of all drugs studied in reaction of inhibition of lymphocytes migration with mitogens phytohaemagglutinine and concanavalin A, activation of mechanisms of nonspecific defense in phagocytosis indexes, lysosome-cation test and a test of recovery of nitroblue tetrazolium. Monotherapy of induced bronchopulmonary inflammation managed to reveal the following regularity in immune stimulating effect of the drugs: metaprot < trekrezan < polyoxidonium < metaprot + polyoxidonium =

metaprot + trekrezan (in the order of increase). Metaprot contrary to trekrezan, polyoxidonium and their combinations, strengthened fluorescence of flavoproteids and decreased fluorescence of recovered pyridine dinucleotides in alveolar macrophages and blood lymphocytes of rats that indicated an increase of oxidation intensity in cells.

Key words: antihypoxants, immunomodulators, metaprot, trekrezan, polyoxidonium, experimental pneumonia, anti-inflammatory action, immune stimulant action, lungs, lymphocytes, rats

Введение

Арсенал иммуностимулирующих средств в последние годы пополнился эффективными отечественными иммуномодуляторами метапротом, трекрезаном и полиоксидонием [4, 12, 16, 17]. Метапрот (2-этилтиобензимидазола гидробромид; бемитил) является типичным представителем класса антигипоксантов, хорошо изучен и широко применяется при острой и хронической гипоксии, для повышения работоспособности, для активации иммунитета, прежде всего клеточного и фагоцитарного звена [4, 5]. Трекрезан (триэтаноламмониевая соль 2-метилфеноксиуксусной кислоты) представляет собой высокоэффективное фармакологическое средство с широким спектром адаптогенного, иммуностимулирующего и антиоксидантного действия [6, 16, 17]. Трекрезан относится к малотоксичным соединениям (LD_{50} для крыс $> 3,7$ г/кг при внутривентральном и $> 6,5$ г/кг при пероральном введении препарата), оказывает стресспротекторное действие на моделях иммобилизационного и болевого гиподинамического стресса, обладает способностью ускорять репарацию поврежденных тканей (печень, миокард, мышцы), защищает внутренние органы от повреждающего действия токсинов, СВЧ-облучения, инфекционного фактора. Препарат обладает выраженной антиоксидантной активностью и иммуностимулирующими свойствами [6]. Перспективным иммунокорректором рассматривается новый препарат полиоксидоний, представляющий собой сополимер N-окси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазина бромид с молекулярной массой 100 КД. Этот препарат относится к классу водорастворимых производных гетероцепных алифатических полиаминов [7, 12]. Он активизирует неспецифическую резистентность организма, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет.

Одним из основных биологических свойств полиоксидония является способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Полиоксидоний действует на все звенья фагоцитарного процесса: активизирует миграцию фагоцитов, усиливает клиренс чужеродных частиц из кровотока, повышает поглотительную и бактерицидную активность фагоцитов. Наряду с иммуномодулирующими свойствами полиоксидония следует выделить антиоксидантный, антиоксидантный и мембраностабилизирующие эффекты препарата [12]. Эффекты указанных веществ оценивались в разных моделях иммунодефицита в экспериментальных и клинических условиях. Среди наиболее распространенных форм вторичного иммунодефицита следует выделить бронхолегочное воспаление (пневмонию), эффективность лечения которой определяется не только назначением средств антибактериальной терапии, но и состоянием иммунной защиты организма [1, 2, 15]. Это определяет во многом достижение излечения при данном воспалительном процессе или же приводит к затяжному характеру течения болезни и его хронизации [3].

Цель исследования заключалась в сопоставлении противовоспалительного и иммунокорректирующего действия метапрота, трекрезана и полиоксидония, а также их комбинаций при экспериментальном бронхолегочном воспалении у крыс.

Методика

Эксперименты выполнены на 106 крысах самцах Вистар массой 200-250 г., полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область). Животных содержали в виварии в стандартных условиях освещения и питания. Исследования осуществляли в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [14].

Острое бронхолегочное воспаление (бронхопневмонию) моделировали следующим образом: под эфирным наркозом хирургическим путем обнажали трахею и уколком между двумя хрящевыми полукольцами иглой диаметром 0,8 мм в ее просвет вводили 0,1 мл живичного скипидара. Разрез на шее ушивали. Непосредственно сразу после операции и далее на протяжении 5 дней животным опытной группы внутривентрально вводили раствор одного из исследуемых препаратов: метапрота (25 мг/кг; ЗАО «Сотекс», Москва), трекрезана (25 мг/кг; ОАО «Усолье-Сибирский ХФЗ, Иркутская область) или полиоксидония (0,75 мг/кг; ГНЦ «Институт иммунологии» МЗ РФ,

Москва) либо их комбинации, используя те же дозы. Выбор доз определялся на основании проведенных ранее исследований и доказательств действия препаратов именно в этих дозах как иммуномодуляторов. На пятые сутки эксперимента животных декапитировали. Определяли выживаемость крыс на пятые сутки опыта, морфологически исследовали ткань легкого и проводили иммунологические исследования по показателям крови животных. Дополнительно оценивали состояние флавиновых и пиридиновых нуклеотидов в иммунокомпетентных клетках крови методом их прижизненной флуориметрии в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах.

Иммунологические исследования проводили в соответствии с требованиями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [14]. Для изучения клеточного звена иммунитета использовали реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с митогенами. В качестве последних применяли фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Кон А). Состояние механизмов неспецифической защиты организма оценивали по показателям фагоцитоза, лизосомально-катионного теста (ЛКТ), теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест).

РТМЛ с митогенами характеризует функциональное состояние Т-лимфоцитов. РТМЛ основана на способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в специфических реакциях с антигеном *in vitro* выделять биологически активные субстанции или лимфокины, в том числе факторы, ингибирующие миграцию лейкоцитов. РТМЛ выполняли в капиллярах по [13]. Результаты реакции выражали в виде индекса миграции (ИМ; длина зоны миграции в присутствии митогена / длина зоны миграции в контроле) или как процент миграции.

Уровень нейтрофильного фагоцитоза по отношению к микробной тест-культуре изучали по [10]. Поглотительную способность фагоцитов оценивали по фагоцитарному показателю (ФП) – проценту фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов, фагоцитарному числу (ФЧ) – среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом. Для оценки переваривающей функции определяли показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ; общее количество переваренных микробов $\times 100\%$ / общее количество поглощенных микробов (переваренных и непереваренных)), выраженный в процентах.

Степень активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцита оценивали с помощью лизосомально-катионного теста (ЛКТ) [13]. Принцип метода основан на цитохимическом выявлении неферментных лизосомальных катионных белков, относительное содержание которых в исследуемых клетках позволяет судить о представительстве указанных антимикробных систем.

Внутриклеточное содержание катионных белков крови оценивали по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК), вычисляемого по формуле:

$$\text{СЦК} = \frac{3a + 2b + 1,5c + 1d + 0,5e}{100}, \text{ где}$$

a-e – количество однотипных клеток с определенной степенью окрашиваемости цитоплазмы прочным зеленым, а цифры показывают степень выраженности и интенсивности окрашивания.

Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции. Отложение синевioletовых гранул диформаза в фагоцитирующей клетке соответствует локализации НАДФН-оксидазы. При этом размеры диформаза отложений являются показателем суммарной активности НАДФН-оксидазы, инициирующей процесс стимуляции фагоцита. НСТ-тест, таким образом, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита, степень активации глюкозомонофосфатного шунта и связанное с ним образование свободных радикалов кислорода [8, 9].

В НСТ-тесте, в отличие от большинства цитохимических реакций, исследуют живые клетки, которые фиксируют лишь после инкубации с цитохимическим индикатором респираторного взрыва – нитросиним тетразолием. Это выполняется без дополнительной стимуляции (спонтанный НСТ-тест) или при стимуляции нейтрофилов *in vitro* (индуцированный или стимулированный НСТ-тест). Спонтанный НСТ-тест отражает степень функциональной активации клеток *in vivo*, индуцированный – функциональный резерв клетки и позволяет судить о дефектах бактерицидной системы фагоцитов [11].

Индекс активации нейтрофилов (ИАН) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИАН} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}, \text{ где}$$

A – число клеток, не содержащих диформазановых отложений или содержащих их в виде пылевидных немногочисленных включений;

B – число клеток, в которых площадь отложений диформазана не превышает 1/3 площади ядра;

C – число клеток, в которых отложения диформазана занимают от 1/3 до всей величины площади ядра;

D – число клеток с диформазановыми отложениями, по площади превосходящими площадь ядра.

Кровь для проведения прижизненной флуориметрии флавиновых и пиридиновых нуклеотидов исследования забирали из сердца после предварительного внутрибрюшинного введения крысам 0,5 мл 10% раствора тиопентала натрия; в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-урограф (ρ = 1,077 г/мл), рабочая концентрация которых составляла 1×10^6 клеток в 1 мл. Альвеолярные макрофаги получали в бронхоальвеолярных смывах с применением раствора Хенкса (pH 7,4). В работе использовали взвесь альвеолярных макрофагов, содержащую 1×10^6 клеток в 1 мл. Адгезия макрофагов на стекло достигалась 20-минутной инкубацией во влажной камере при 37°C. Состояние флавиновых (Фп) и пиридиновых нуклеотидов в выделенных иммунокомпетентных клетках крови до внесения препаратов и на фоне их действия изучали *in situ* методом люминесцентной микроскопии. Все препараты вносили в среду клеток в объеме 10 мкл в следующих концентрациях: метапрот – 0,1 мМ, трекрезан – 0,1 мМ, полиоксидоний – 500 мкг/мл. При комбинировании препаратов использовали те же концентрации [5]. Метод позволяет одновременно измерять собственную флуоресценцию НАДН и флавопротеидов в реальном времени. Интенсивность собственной флуоресценции нуклеотидов, измеряли с помощью установки, включающей люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-Р8.

Выборка для каждой группы животных составила не менее 10 крыс. Математическую обработку результатов исследования проводили на компьютере с использованием стандартного пакета программ STATISTICA for Windows по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой статистической значимости показателей и различий рассматриваемых выборок по критерию Стьюдента. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне значимости 95% ($p < 0,05$). В тексте и таблицах результаты экспериментов представлены в виде $M \pm m$, где: M – среднее арифметическое, m – среднеквадратичная ошибка среднего арифметического, n – число животных в группах.

Результаты исследования и их обсуждение

Патоморфологические и метаболические изменения при экспериментальном бронхолегочном воспалении у крыс. У животных, получавших интратрахеально скипидар для моделирования острого бронхолегочного воспаления, при морфологическом исследовании макроскопически наблюдалось воспалительное поражение легких с типичной инфильтрацией и точечными кровоизлияниями в ткань. В большинстве случаев патологический процесс локализовался в нижней доле правого легкого. Существенных различий между особями по распространенности патологического процесса и характеру патоморфологических нарушений не наблюдали, что свидетельствовало о воспроизводимости и адекватности выбранной модели.

Микроскопически в легких интактных крыс межальвеолярные перегородки были обычного вида, кровеносные сосуды умеренно полнокровны, альвеолы наполнены воздухом. Введение крысам скипидара вызывало утолщение межальвеолярных перегородок. Кровеносные сосуды перегородок были расширены и полнокровны. Просветы альвеол заполнялись эозинофильной жидкостью с нейтрофильными лейкоцитами, встречались нити фибрина. В легком отмечали наличие экссудата смешанного характера: серозного, фибринозного, фибринозно-гнойного и гнойного. В незначительной части опытов наблюдали некроз легочной ткани. В прилежащих к некрозу альвеолах содержался преимущественно серозно-фибринозный экссудат.

Влияние метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций на выживаемость крыс и структурные изменения в легких при остром бронхолегочном воспалении. Введение в течение 5 дней крысам с острым бронхолегочным воспалением метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций увеличивало выживаемость животных с бронхолегочным воспалением. Так, при бронхолегочном воспалении (контроль) выживаемость крыс в течение 5 дней составила $48 \pm 11\%$,

при лечении полиоксидонием – $58 \pm 10\%$, метапротом – $60 \pm 12\%$, трекрезаном – $65 \pm 11\%$, метапротом + полиоксидонием – $78 \pm 9\%$, метапротом + трекрезаном – $85 \pm 8\%$.

При введении животным с бронхолегочным воспалением метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций изменялась микроскопическая картина ткани легких. На фоне действия метапрота уменьшалось утолщение межальвеолярных перегородок и их полнокровие. Просветы альвеол содержали эозинофильную жидкость с нейтрофильными лейкоцитами и отдельные нити фибрина. В легком присутствовал серозный и фибринозный экссудат. Некротические участки ткани легкого не наблюдались. На фоне действия полиоксидония микроскопическая картина ткани легкого представлена умеренно полнокровными межальвеолярными перегородками, наличием серозно-фибринозного экссудата. Большинство альвеол заполнены воздухом. Применение трекрезана оказывало сходное с полиоксидонием влияние на структуру ткани легких. Микроскопически межальвеолярные перегородки незначительно утолщены и полнокровны. Большинство альвеол наполнены воздухом. Отсутствовали некротические участки ткани. В просветах альвеол отмечали серозно-фибринозный экссудат. При применении комбинации метапрота с полиоксидонием и, в большей степени, с трекрезаном микроскопическая картина ткани легких приближалась к нормальной: межальвеолярные перегородки были обычного вида, кровеносные сосуды их умеренно полнокровны, альвеолы наполнены воздухом.

Влияние метапрота, трекрезана, полиоксидония и их комбинаций на показатели иммунитета при остром бронхолегочном воспалении у крыс. Внутривентральное введение метапрота крысам с острым бронхолегочным воспалением приводило к достоверному повышению лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с Кон-А на 19%, с ФГА – на 10%. Фагоцитарная активность нейтрофилов увеличивалась на 7%, при этом фагоцитарное число, равное среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом, и показатель завершенности фагоцитоза снижались на 10% и 8% соответственно. Применение препаратов сопровождалось изменением кислородзависимых антиинфекционных систем лимфоцитов, характеризующих степень активации гексозомонофосфатного шунта и связанное с этим образование свободных радикалов (табл. 1).

Таблица 1. Влияние метапрота, трекрезана и полиоксидония на иммунологические показатели у крыс при остром бронхолегочном воспалении ($M \pm m$; $n=10$)

Показатели	Группы животных			
	Бронхолегочное воспаление (контроль)	Бронхолегочное воспаление + метапрот	Бронхолегочное воспаление + трекрезан	Бронхолегочное воспаление + полиоксидоний
РТМЛ с КонА, %	$59,00 \pm 1,10$	$70,25 \pm 2,20$	$74,25 \pm 2,00^*$	$76,80 \pm 1,89^*$
РТМЛ с ФГА, %	$41,40 \pm 2,40$	$45,50 \pm 2,50$	$48,90 \pm 3,00^*$	$50,40 \pm 3,25^*$
ФП, %	$80,30 \pm 1,30$	$86,20 \pm 0,85$	$89,75 \pm 0,70^*$	$91,30 \pm 0,90^*$
ФЧ	$18,90 \pm 0,50$	$17,10 \pm 0,41$	$15,96 \pm 0,73^*$	$15,40 \pm 0,40^*$
ПЗФ, %	$30,75 \pm 0,79$	$28,30 \pm 0,9$	$25,38 \pm 0,96^*$	$24,00 \pm 0,80^*$
ЛКТ, усл.ед.	$1,32 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,03^*$	$1,44 \pm 0,01^*$
НСТ спонтанный, усл. ед.	$0,48 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,02^*$	$0,35 \pm 0,03^*$
НСТ стимулированный, усл. ед.	$0,70 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,03^*$	$0,61 \pm 0,03^*$

Примечания: РТМЛ – реакция торможения миграции лейкоцитов; Кон-А – конканавалин А; ФГА – фитогемагглютинин; ПЗФ – показатель завершенности фагоцитоза; ФП – фагоцитарный показатель; ФЧ – фагоцитарное число; ЛКТ – лизосомально-катионный тест; НСТ – тест восстановления нитросинего тетразолия, * – $p < 0,05$ к контролю

При введении метапрота показатели спонтанного НСТ-теста снижались по сравнению с бронхолегочным воспалением на 17%, а стимулированного НСТ-теста – на 6% ($p < 0,05$). Наряду с этим, происходило увеличение активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов на 4%. Применение трекрезана у крыс с бронхолегочным воспалением сопровождалось повышением показателя РТМЛ с КонА на 26% и с ФГА – на 18%. Фагоцитарная активность увеличивалась на 12% на фоне снижения фагоцитарного числа на 16% и показателя завершенности фагоцитоза – на 17% ($p < 0,05$).

Наряду с этим снижались показатели спонтанного НСТ-теста на 25% и стимулированного – на 10%, при этом активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов увеличивалась на 7%. По сравнению с нелечеными крысами, введение животным полиоксидония приводило к достоверному повышению лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в РТМЛ с КонА на 30%, а в РТМЛ с ФГА – на 22%. Наблюдалось увеличение фагоцитарной активности на 14%, при снижении фагоцитарного числа на 19% и показателя завершенности фагоцитоза – на 22% ($p < 0,05$).

Активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов увеличивалась на 9% ($p < 0,05$). Показатели кислородзависимых антиинфекционных систем лимфоцитов, характеризующие степень активации гексозомонофосфатного шунта и связанное с этим образование свободных радикалов, в спонтанном НСТ-тесте снижались на 27%, а стимулированном – на 13% ($p < 0,05$).

Введение крысам с острым бронхолегочным воспалением комбинации метапрота и трекрезана сопровождалось повышением показателей РТМЛ с КонА на 37% и с ФГА – на 26%. Фагоцитарная активность возрастала на 17% на фоне снижения фагоцитарного числа – на 29% и показателя завершенности фагоцитоза – на 25% ($p < 0,05$). Снижались показатели спонтанного НСТ-теста на 40% и стимулированного – на 19%, при этом увеличивалась активность лизосомально-катионного теста на 12%.

Сочетанное применение метапрота и полиоксидония приводило к достоверному повышению лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в РТМЛ с КонА на 38% и с ФГА – на 24%. Наблюдалось увеличение фагоцитарной активности на 17%, при снижении фагоцитарного числа на 30% и показателя завершенности фагоцитоза – на 26% ($p < 0,05$). Активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов увеличивалась на 11% ($p < 0,05$). Показатели спонтанного НСТ-теста достоверно снижались на 42% и стимулированного – на 17% (табл. 2).

Таблица 2. Влияние комбинации метапрота с трекрезаном и полиоксидонием на иммунологические показатели у крыс при остром бронхолегочном воспалении ($M \pm m$; $n=10$)

Показатели	Группы животных		
	Бронхолегочное воспаление (контроль)	Бронхолегочное воспаление + метапрот + трекрезан	Бронхолегочное воспаление + метапрот + полиоксидоний
РТМЛ с КонА, %	59,00±1,10	80,87±2,39	81,13±1,67
РТМЛ с ФГА, %	41,40±2,40	52,40±3,30	51,50±3,70
ФП, %	80,30±1,30	93,75±1,06	94,20±0,85
ФЧ	18,90±0,50	12,50±0,36	12,70±0,48
ПЗФ, %	30,75±0,79	23,00±0,60	22,75±0,86
ЛКТ, усл.ед.	1,32±0,01	1,48±0,01	1,47±0,02
НСТ спонтанный, усл. ед.	0,48±0,02	0,29±0,01	0,28±0,02
НСТ стимулированный, усл. ед.	0,70±0,02	0,57±0,03	0,58±0,04

Примечания: РТМЛ – реакция торможения миграции лейкоцитов; Кон-А – конканавалин А; ФГА – фитогемагглютинин; ПЗФ – показатель завершенности фагоцитоза; ФП – фагоцитарный показатель; ФЧ – фагоцитарное число; ЛКТ – лизосомально-катионный тест; НСТ – тест восстановления нитросинего тетразолия. * – $p < 0,05$ к контролю

Таким образом, применение при остром бронхолегочном воспалении у крыс комбинации антигипоксанта с иммуномодулятором оказывает более выраженное иммуностропное действие, вследствие чего изучаемые иммунологические показатели восстанавливаются до значений, характерных для интактных животных. Исходя из полученных данных, при монотерапии исследуемые препараты можно расположить в ряду по возрастанию их иммуностропных свойств: метапрот < трекрезан < полиоксидоний. Применение комбинированной терапии сопровождалось более выраженным иммуномодулирующим действием. При этом эффекты комбинации метапрота с полиоксидонием или трекрезаном были сопоставимы.

Влияние метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций на флуоресценцию флавиновых и пиридиновых нуклеотидов в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах крови крыс. Внесение в среду альвеолярных макрофагов, выделенных у интактных крыс, метапрота сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции НАДН на 47% и усилением на 32% флуоресценции флавопротеидов (рис. 1).

На фоне действия трекрезана в альвеолярных макрофагах крыс флуоресценция флавопротеидов снижалась на 15% по сравнению с исходным фоном, а флуоресценция НАДН возрастала на 31%. Параметр ξ снижался с 1,65 до 1,07, а показатель R имел отрицательное значение (-0,35).

Внесение в среду альвеолярных макрофагов полиоксидония сопровождалось более значительным снижением флуоресценции флавопротеидов (на 54%) и увеличением флуоресценции НАДН на 49%. Параметр ξ под влиянием полиоксидония снижался с 2,11 до 0,64, а показатель R был ниже, чем на фоне действия трекрезана (-0,69).

При внесении в среду альвеолярных макрофагов комбинации метапрота с трекрезаном или полиоксидонием также наблюдали снижение интенсивности флуоресценции в области спектра флавопротеидов и увеличение свечения в области пиридиннуклеотидов. При этом эффекты метапрота в сочетании с трекрезаном были сопоставимы с его комбинацией с полиоксидонием. Тем не менее, на фоне комбинации трекрезана или полиоксидония с метапротом показатель R был больше, чем при действии трекрезана и полиоксидония.

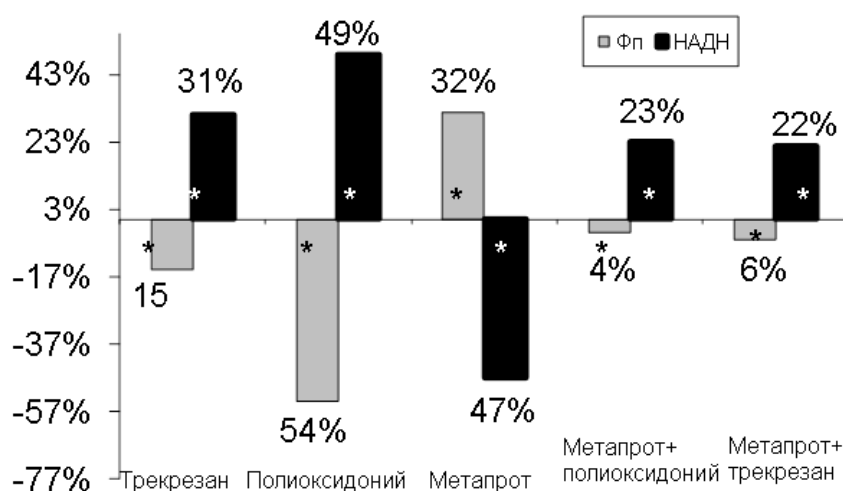


Рис. 1. Влияние метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинации на флуоресценцию флавопротеидов (Фп) и пиридиннуклеотидов (НАДН) в альвеолярных макрофагах крыс.

Примечание: * – $p < 0,05$ к контролю (изолиния)

Характер флуоресценции флавопротеидов и пиридиннуклеотидов в лимфоцитах крови интактных крыс на фоне действия метапрота, трекрезана, полиоксидония и их комбинаций сохранялся. На фоне действия метапрота в лимфоцитах крови крыс интенсивность флуоресценции в области спектра флавопротеидов была на 46% выше фоновой. При этом интенсивность флуоресценции НАДН в лимфоцитах снижалась на 23%. Это сопровождалось увеличением параметра ξ в два раза и положительным значением величины реакции метаболической системы лимфоцитов. На фоне действия трекрезана уровень свечения флавопротеидов снижался на 27% по сравнению с фоновым, а флуоресценция НАДН возрастала на 61%, что приводило к отрицательному значению величины реакции метаболической системы лимфоцитов. Внесение в среду лимфоцитов полиоксидония приводило к большему снижению свечения в области спектра флавопротеидов и увеличению интенсивности флуоресценции НАДН, чем при действии трекрезана. Параметр ξ при действии полиоксидония уменьшался в 2,8 раза по сравнению с фоном, величина реакции метаболической системы лимфоцитов имела отрицательное значение.

При внесении в среду лимфоцитов комбинации метапрота с полиоксидонием интенсивность флуоресценции в области спектра флавопротеидов снижалась на 24% по сравнению с фоном. Свечение в области пиридиннуклеотидов увеличивалось на 22%. Параметр ξ уменьшался в 1,6 раза, а величина реакции метаболической системы лимфоцитов (R) имела отрицательное значение. Сходные эффекты наблюдались при внесении в среду лимфоцитов метапрота в сочетании с

трекрезаном. Однако изменения флуоресценции флавопротеидов и пиридиннуклеотидов на фоне комбинаций препаратов были менее выраженными по сравнению с действием трекрезана и полиоксидония.

Таким образом, при внесении в среду альвеолярных макрофагов и лимфоцитов крови крыс метапрота усиливается флуоресценция флавопротеидов и снижается флуоресценция восстановленных пиридиннуклеотидов, что свидетельствует об усилении интенсивности тканевого дыхания клеток. В отличие от метапрота трекрезан и полиоксидоний уменьшали интенсивность флуоресценции флавопротеидов и увеличивали флуоресценцию восстановленных пиридиннуклеотидов в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах крови крыс. На фоне комбинации трекрезана или полиоксидония с метапротом величина реакции метаболической системы клеток была больше, чем при действии трекрезана и полиоксидония.

Выводы

1. Метапрот, трекрезан, полиоксидоний и их сочетания при курсовом применении у крыс с экспериментальным острым бронхолегочным воспалением облегчают течение воспалительного процесса, что проявляется увеличением процента выживших животных, уменьшением количества экссудата в ткани легких, снижением полнокровности кровеносных сосудов, нормализацией морфологической картины легочной ткани (межальвеолярные перегородки обычного вида, все альвеолы наполнены воздухом).
2. На фоне действия метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций при остром бронхолегочном воспалении у крыс повышается лимфокинпродуцирующая функция лимфоцитов, фагоцитарная активность нейтрофилов, активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов, снижается фагоцитарное число, показатель завершенности фагоцитоза и активность кислородзависимых микробицидных систем фагоцитов.
3. При монотерапии экспериментальной бронхопневмонии препараты располагаются по возрастанию их иммуностимулирующего действия в следующем порядке: метапрот < трекрезан < полиоксидоний < метапрот + полиоксидоний = метапрот + трекрезан.
4. Метапрот, в отличие от трекрезана, полиоксидония и их комбинации с метапротом, усиливает флуоресценцию флавопротеидов и снижает флуоресценцию восстановленных пиридиннуклеотидов в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах крови крыс, что свидетельствует об усилении интенсивности тканевого дыхания клеток.

Литература

1. Бизюкин А.В., Сеодаева С.К. Новый методический подход к изучению метаболизма фагоцитирующих клеток // Пульмонология. – 1995. – №1. – С. 46-49.
2. Вишнякова Л.А., Путов Н.В. Этиология острой пневмонии // Терапевтический архив. – 1990. – Т.62, №3. – С. 15-18.
3. Дангиг И.И., Скипский И.М., Смутьская Г.П. Затяжная пневмония: факторы риска и лечебная тактика // Тер. Архив. – 1999. – № 3. – С. 32 – 35.
4. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Антиоксидантное действие полиоксидония и метапрота при бронхолегочном воспалении у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т.160, №8. – С.200-204.
5. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Молекулярная фармакология антигипоксантов. – СПб.: Н-Л, 2004. – 368 с.
6. Казимировская В.Б., Дьяков В.М., Воронков М.Г., Ковальчук С.Ф. Трекрезан: токсикология, фармакология, результаты клинических испытаний. – Иркутск, 1996. – 224 с.
7. Козлов Ю.А. Полиоксидоний в комплексном лечении гнойно-воспалительных заболеваний // Terra medica nova. – 2005. – №1. – С. 2-5.
8. Маянский А.Н., Галиуллин А.Н. Реактивность нейтрофила. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1984. – 158 с.
9. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. 2-е изд., перераб. и доп. – Новосибирск: Наука, 1989. – 344 с.
10. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований (методы оценки Т- и В-систем иммунитета). – Л., 1980. – 44 с.
11. Оценка иммунного статуса организма в лечебных учреждениях Советской Армии и Военно-морского Флота / Под ред. Е.В. Гембицкого. – М., 1987. – 62 с.
12. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор «полиоксидоний»: механизмы действия и аспекты клинического применения // Медлайн эксперецс. – 2005. – Т.177, №1. – С. 19-23.

13. Потемкина Е.Е., Позднякова Р.З., Манукян Л.М. Пособие по лабораторной клинической иммунологии. – М.: Изд-во РУДН, 2003. – 287 с.
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В.П. Фисенко. – М.: МЗ РФ, 2000. – 398 с.
15. Фомина Т.Д., Походзей И.В. Иммунологическая реактивность организма и клинико-рентгенологическая картина острой пневмонии у взрослых // Терапевтический архив. – 1986. – №4. – С. 108-110.
16. Шабанов П.Д., Зарубина И.В., Мокренко Е.В. Фармакология трекрезана – нового иммуномодулятора и адаптогена // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т.12, №2. – С. 12-27.
17. Шабанов П.Д., Мокренко Е.В. Противовоспалительные и иммуностимулирующие эффекты трекрезана при лечении воспалительно-дегенеративных поражений мягких тканей пародонта // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т.13, №2. – С. 34-42.

Информация об авторах

Зарубина Ирина Викторовна – доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник кафедры фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. E-mail: i.v.zarubina@inbox.ru

Мокренко Евгений Владимирович – кандидат медицинских наук, докторант кафедры фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, ассистент кафедры терапевтической ортодонтии Иркутского государственного медицинского университета. E-mail: pdshabanov@mail.ru

Болехан Анна Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. E-mail: pdshabanov@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины. E-mail: pdshabanov@mail.ru