

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

СРАВНЕНИЕ ЭНЕРГОСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ И ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ТРЕКРЕЗАНА И ПОЛИОКСИДОНИЯ ПРИ БРОНХОЛЕГОЧНОМ ВОСПАЛЕНИИ У КРЫС

И. В. Зарубина, А. В. Болехан, П. Д. Шабанов¹

Сравнивали энергостабилизирующее и иммуностропное действие иммуномодуляторов 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, оба препарата проявили энергостабилизирующий эффект, что проявлялось снижением уровня лактата, продуктов гидролиза АТФ — АДФ и АМФ, а также увеличением содержания пирувата и АТФ в лимфоцитах крови и ткани легких крыс. Энергостабилизирующее действие полиоксидония было более выражено в тканях легких, по направленности эффектов сопоставимо с действием трекрезана, по силе уступало ему. В параллельных исследованиях показано, что трекрезан и полиоксидоний нормализуют иммунный статус лимфоцитов у крыс с острым бронхолегочным воспалением.

Ключевые слова: иммуномодуляторы, трекрезан, полиоксидоний, экспериментальная пневмония, энергетический обмен, лимфоциты, крысы

ВВЕДЕНИЕ

Разработка средств этиотропной терапии вторичных иммунодефицитных состояний вследствие острых бронхолегочных заболеваний, в частности пневмоний, до настоящего времени сохраняет приоритетное значение [2]. Однако традиционные средства антибактериальной терапии становятся все менее эффективными в отношении широкого спектра возбудителей пневмоний, что приводит к увеличению частоты затяжного характера течения заболевания и его хронизации [3]. Попытки выделить какой-то один ведущий механизм развития острой пневмонии не увенчались успехом [10, 11]. Однако наиболее специфические различия, обусловленные этиологическим фактором, на клеточном уровне теряют свою специфику вследствие общности механизмов клеточных повреждений. Такими универсальными процессами при острых бронхолегочных заболеваниях являются нарушение кислородного режима и изменение иммунного ответа.

В каскаде метаболических изменений при кислородной недостаточности центральным звеном является так называемая биоэнергетическая гипоксия, в основе которой лежат последовательные изменения свойств митохондриального ферментного комплекса, приводящие к нарушениям энергосинтезирующей функции дыхательной цепи [5]. Все стадии биоэнергетической гипоксии коррелируют с изменениями содержания АТФ в ведущих энергозависимых процессах в

клетках. В связи с этим уровень адениннуклеотидов и, особенно, величина энергетического заряда адениловой системы являются информативными при гипоксических состояниях вследствие бронхолегочных воспалений.

Иммунный статус относится к важнейшим факторам, определяющим исход воспалительного процесса в легких наряду с длительностью персистенции бактериальной, вирусной или микоплазменной инфекции. Характеристики процесса легочного воспаления тесно связаны с иммунным статусом, поэтому выявление функционального состояния Т- и В-лимфоцитов и фагоцитирующих клеток при острых бронхолегочных воспалениях дает возможность использовать иммунологические исследования в качестве дополнительных методов диагностики и прогнозирования течения указанных заболеваний, оценивать активность и направленность воспалительного процесса, полноту выздоровления.

Учитывая комплексный характер нарушений, которые возникают в организме при бронхолегочных воспалениях, связь их с механизмами неспецифической резистентности, системой снабжения организма кислородом, процессами энергообеспечения метаболизма и состоянием иммунной системы, представляется целесообразным использовать лечебные средства с широким спектром фармакологической активности, способные воздействовать на базальные клеточные процессы и стимулировать адаптационные возможности организма, в комплексной терапии острых бронхолегочных воспалений.

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинской академии МО РФ, Санкт-Петербург, 194044, ул. Лебедева, 6.

В значительной степени этим требованиям отвечают недавно появившиеся препараты трекрезан и полиоксидоний. Трекрезан — триэтаноламмониевая соль 2-метилфеноксикусусной кислоты — эффективное средство с выраженным адаптогенным и иммуностимулирующим действием. Препарат создан в Иркутском институте органической химии СО РАН, прошел доклинические и клинические испытания и с 1994 г. разрешен Фармакологическим комитетом МЗ РФ к широкому применению (рег. № 94/151/7).

Трекрезан относится к малотоксичным соединениям (ЛД₅₀ для крыс > 3700 мг/кг при внутривентральном и > 6500 мг/кг при введении препарата внутрь), оказывает стресспротекторное действие на моделях иммобилизационного и болевого гиподинамического стресса, способен 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].

Одним из перспективных иммунокорректоров является полиоксидоний [7]. Препарат оказывает активирующее действие на 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: активирует миграцию фагоцитов, усиливает клиренс чужеродных частиц из кровотока, повышает поглотительную и бактерицидную активность фагоцитов. Известно, что бактерицидность фагоцитов обусловлена кислороднезависимыми и кислородзависимыми механизмами. Оказалось, что полиоксидоний подавляет спонтанное образование внеклеточных, но стимулирует образование внутриклеточных активных форм кислорода. В отношении индукции синтеза цитокинов полиоксидоний выступа-

ет как истинный иммуномодулятор, стимулируя их спонтанный и индуцированный синтез. Наряду с иммуномодулирующими свойствами полиоксидония следует выделить антиоксидантный, антиоксидантный и мембранотропный эффекты [8]. Следует отметить, что энергостабилизирующие эффекты полиоксидония не известны.

Цель исследования заключалась в сравнительном изучении энергостабилизирующего и иммуностропного действия трекрезана и полиоксидония при экспериментальном бронхолегочном воспалении у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 126 крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г, полученных из питомника Рапполово РАМН (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” [9].

В первой серии опытов изучали изменение энергетического обмена и иммунологических показателей в лимфоцитах и ткани легких при остром бронхолегочном воспалении у крыс. Во второй серии опытов исследовали влияние трекрезана и полиоксидония на показатели энергетического обмена и иммунологических показателей в лимфоцитах и ткани легких при остром бронхолегочном воспалении у крыс.

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 вводили в ее просвет 0,1 мл живичного скипидара. Разрез на шее ушивали. Непосредственно после операции и далее на протяжении 5 дней животным опытной группы внутривентрально вводили раствор трекрезана (25 мг/кг) или полиоксидония

Таблица 1. Влияние полиоксидония и трекрезана на показатели энергетического обмена крыс при остром бронхолегочном воспалении

Группа животных	Лактат, мкмоль/г ткани	Пируват, мкмоль/г ткани	АТФ, мкмоль/г ткани	АДФ, мкмоль/г ткани	АМФ, мкмоль/г ткани	Энергетический заряд
<i>В лимфоцитах крови</i>						
Интактные	3,12 ± 0,04	0,26 ± 0,01	2,84 ± 0,04	0,71 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,870 ± 0,03
С пневмонией	7,50 ± 0,11 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	1,30 ± 0,06 ^a	1,2 ± 0,04 ^a	0,82 ± 0,03 ^a	0,568 ± 0,01 ^a
Пневмония + полиоксидоний	5,43 ± 0,10 ^b	0,12 ± 0,01 ^b	1,83 ± 0,03 ^b	1,01 ± 0,05 ^b	0,72 ± 0,02 ^b	0,683 ± 0,01 ^b
Пневмония + трекрезан	4,51 ± 0,14 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	2,11 ± 0,04 ^b	0,97 ± 0,06 ^b	0,71 ± 0,02 ^b	0,808 ± 0,02 ^b
<i>В легких</i>						
Интактные	2,81 ± 0,6	0,37 ± 0,01	3,51 ± 0,09	0,57 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,870 ± 0,03
С пневмонией	8,55 ± 0,11 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	1,08 ± 0,03 ^a	1,19 ± 0,02 ^a	0,68 ± 0,05 ^a	0,568 ± 0,01 ^a
Пневмония + полиоксидоний	5,93 ± 0,09 ^b	0,12 ± 0,01 ^b	1,83 ± 0,01 ^b	0,81 ± 0,01 ^b	0,63 ± 0,01 ^b	0,683 ± 0,01 ^b
Пневмония + трекрезан	4,35 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,01	2,14 ± 0,04 ^b	0,71 ± 0,04 ^b	0,53 ± 0,01 ^b	0,808 ± 0,02 ^b

Примечание: Здесь и в табл. 2 различия достоверны ($p < 0,05$) при сравнении с: ^a – интактными животными, ^b – группой с пневмонией.

(0,75 мг/кг). На 5-е сутки эксперимента животных декапировали и брали материал для исследования.

Легкие гомогенизировали в жидком азоте и в них и выделенных из крови лимфоцитах определяли биохимические показатели, характеризующие энергетический обмен. Содержание молочной и пировиноградной кислот определяли в 10 % гомогенате ткани мозга, приготовленном на 6 н. хлорной кислоте, энзиматическим методом [15]. Свободные адениннуклеотиды определяли с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах “силуфол” и последующим сканированием на спектрофлуориметре MPF-4 “Hitachi” [4]. Интегративной величиной, объединяющей три компонента адениловой системы в единую формулу и позволяющей судить о направленности обменных процессов в ткани, служит энергетический заряд [14]. Величину энергетического заряда адениловой системы рассчитывали по формуле: $АТФ + 0,5АДФ/АТФ + АДФ + АМФ$.

Для иммунологических исследований лимфоциты выделяли из цельной крови крыс в градиенте плотности фико-л-уротраст. В работе использовали взвесь лимфоцитов, содержащую $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл при контроле на их жизнеспособность. Исследование клеточного звена иммунитета включало определение реакции торможения миграции лимфоцитов с конканавалином А (Кон А) и фитогемагглютинином, характеризующее функциональное состояние субпопуляции Т-лимфоцитов [13]. Состояние механизмов неспецифической защиты организма оценивалось по уровню нейтрофильного фагоцитоза по отношению к микробной тест-культуре после их совместной инкубации. Определяли показатель завершенности фагоцитоза, фагоцитарный показатель — процент фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов, фагоцитарное число — среднее число микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом. Степень активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцита оценивали с помощью лизосомально-катионного теста. Кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцитов определяли в тесте восстановления нитросинего тетразолия.

Выборка для каждой группы животных составила не менее 10 крыс. Математическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере Pentium III 1700 МГц с использованием стандартного пакета программ STATISTICA for Windows методами вариационной статистики (*t*-критерий Стьюдента) при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Энергостабилизирующие эффекты трекрезана и полиоксидония при экспериментальном остром бронхолегочном воспалении. Острое бронхолегочное воспаление у крыс сопровождалось увеличением в лимфоцитах и ткани легких содержания лактата, АДФ и АМФ на фоне снижения содержания пирувата и АТФ. При этом более выраженные метаболические изменения наблюдались в тканях легких. Так, в лимфоцитах крыс с бронхолегочным воспалением содержание лактата достоверно возрастало на 140 %, АДФ — на 69 % и АМФ на 86 % (табл. 1). Содержание пирувата снижалось на 81 % и АТФ — на 54 % ($p < 0,05$). В легких содержание лактата увеличивалось на 204 %, АДФ — на 109 % и АМФ на 143 %. Наряду с этим достоверно снижалось содержание пирувата на 92 % и АТФ на 69 %. Изменения в адениннуклеотидном пуле приводили к снижению величины энергетического заряда адениннуклеотидов, что свидетельствует о развитии энергодифицита в лимфоцитах и тканях легких крыс при остром бронхолегочном воспалении (табл. 1).

Введение животным полиоксидония приводило к достоверному увеличению в лимфоцитах содержания пирувата на 140 %, АТФ на 41 % и снижению уровня лактата на 28 %, АДФ на 16 % и АМФ на 12 %. В тканях легких полиоксидоний в большей степени влиял на показатели энергетического обмена, чем в лимфоцитах. На фоне введения полиоксидония содержание лактата в легких снижалось на 31 %, АДФ на 32 % и АМФ на 22 % ($p < 0,05$). Наряду с этим содержание пирувата увеличивалось в три раза и АТФ — на 69 %, а также значение энергетического заряда адениннуклеотидов.

Таблица 2. Влияние полиоксидония и трекрезана на иммунологические показатели в лимфоцитах крыс при остром бронхолегочном воспалении

Группа животных	РТМЛ Кон А, %	РТМЛ ФГА, %	ФП, %	ФЧ, %	ПЗФ	ЛКТ, %	НСТ базовая	НСТ стимулируемая
Интактные	84 ± 2,0	54,6 ± 3,4	94,5 ± 0,1	13,4 ± 0,5	22,5 ± 1,4	1,44 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,61 ± 0,02
С пневмонией	59 ± 1,1 ^a	41,4 ± 2,4 ^a	80,3 ± 1,3 ^a	18,9 ± 0,5 ^a	28,3 ± 0,9	1,36 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,02 ^a	0,70 ± 0,01
Пневмония + полиоксидоний	80 ± 1,8 ^b	51,3 ± 3,3 ^b	93,6 ± 0,9 ^b	14,9 ± 0,4 ^b	22,6 ± 0,8	1,43 ± 0,01 ^b	0,33 ± 0,03 ^b	0,64 ± 0,05
Пневмония + трекрезан	68 ± 2,0 ^b	50,1 ± 3,0 ^b	94,5 ± 0,7 ^b	13,8 ± 1,2 ^b	22,6 ± 1,1	1,44 ± 0,03 ^b	0,32 ± 0,02 ^b	0,61 ± 0,02

Примечание. РТМЛ — реакция торможения миграции лимфоцитов; Кон-А — конканавалин-А; ФГА — фитогемагглютинин; ПЗФ — показатель завершенности фагоцитоза; ФП — фагоцитарный показатель; ФЧ — фагоцитарное число; ЛКТ — лизосомально-катионный тест; НТС — тест восстановления нитросинего тетразолия.

Трекрезан снижал в лимфоцитах крыс содержание лактата на 40 %, АДФ на 19 % и АМФ на 16 % ($p < 0,05$). Содержание пирувата возрастало в три раза и АТФ на 62 %. В тканях легких при действии трекрезана уровень лактата снижался на 49 %, АДФ на 40 % и АМФ на 22 % на фоне увеличения содержания пирувата в пять раз и АТФ на 98 % ($p < 0,05$). Изменения содержания адениннуклеотидов сопровождались увеличением их энергетического заряда в лимфоцитах крови и тканях легких крыс.

Влияние трекрезана и полиоксидония на иммунологические показатели в лимфоцитах крови крыс при экспериментальном остром бронхолегочном воспалении. Многие бронхолегочные заболевания сопровождаются развитием вторичной иммунологической недостаточности. Нарушения со стороны иммунной системы могут быть вызваны отрицательным влиянием причинного микроорганизма на состояние защитных сил организма, а также иметь ятрогенное происхождение [12]. Состояние иммунного статуса сложным образом взаимосвязано с рядом характеристик процесса легочного воспаления: степенью тяжести пневмонии, вариантом течения и исхода заболевания. Комплекс повреждающих факторов бактериального воспаления с увеличением тяжести пневмонии способен оказывать все более выраженное влияние на механизмы клеточной и гуморальной защиты организма. В случае развития затяжной пневмонии в ответ на бактериальную инфекцию выявляется более резкое, чем при острой пневмонии, увеличение Т-клеточного звена иммунитета уже на 1–2-й неделе болезни, уменьшаются субпопуляции индукторов хелперных клеток, обеспечивающих пролиферацию и дифференцировку фагоцитирующих и антителообразующих клеток. В свою очередь состояние иммунной системы существенным образом влияет на характер течения острой пневмонии. Тяжелая и длительно текущая пневмония возникает на фоне угнетения систем комплемента, фагоцитоза и функциональной недостаточности клеточного звена иммунитета.

В развитии легочного воспаления особая роль принадлежит системе фагоцитирующих клеток. Состояние нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов во многом определяет возникновение, течение и исход патологического процесса бронхолегочной системы. Особенно актуально это в настоящее время, когда значительно изменился характер иммунного ответа организма пациента при острой пневмонии. Обусловлено это в первую очередь широким применением антибактериальных средств при этом заболевании. Абсолютное и относительное количество лейкоцитов и нейтрофилов повышается существенно лишь при средней степени тяжести и тяжелой острой пневмонии.

Моделируемое острое бронхолегочное воспаление у крыс сопровождалось повышенной фагоцитарной активностью лимфоцитов, угнетением Т-лимфоцитарной функции и активности кислороднезависимых

микробицидных систем фагоцитов (табл. 2). Известно, что степень снижения показателей фагоцитоза зависит от характера процесса, его течения и тяжести, при этом степень снижения показателей фагоцитоза находится в прямой корреляции со степенью тяжести бронхолегочного воспаления.

Введение трекрезана и полиоксидония крысам с острым бронхолегочным воспалением приводило к восстановлению показателей иммунитета до значений, характерных для интактных животных. При этом оба препарата проявили сопоставимое действие.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что трекрезан и полиоксидоний эффективны при терапии экспериментального острого бронхолегочного воспаления у крыс. Эффекты трекрезана и полиоксидония на показатели иммунной защиты были сходными и отличались лишь по одному показателю — реакции торможения миграции лимфоцитов, стимулируемой Кон-А. По-видимому, действие полиоксидония, более выраженное в легких, обусловлено его большей биодоступностью в тканях легкого по сравнению с лимфоцитами. Известно, что полиоксидоний взаимодействует с мембраной лимфоцитов, но в цитоплазме лимфоцитов обнаруживается в малых количествах [8]. Учитывая тесную связь между нарушениями энергетического обмена и активаций перекисного окисления липидов, можно предположить, что стабилизация энергетического обмена на фоне применения трекрезана и полиоксидония обусловлена их антиоксидантными свойствами. Однако механизмы энергостабилизирующего действия трекрезана и полиоксидония при воспалительных бронхолегочных заболеваниях требуют дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальной бронхопневмонии трекрезан и полиоксидоний оказывают энергостабилизирующее действие, что проявляется в снижении уровня лактата, продуктов гидролиза АТФ — АДФ и АМФ, в увеличении содержания пирувата и АТФ в лимфоцитах крови и ткани легких крыс.

2. Энергостабилизирующее действие полиоксидония более выражено в тканях легких, по направленности эффектов сопоставимо с действием трекрезана, по силе уступает ему.

3. Введение трекрезана и полиоксидония животным с острым бронхолегочным воспалением приводит к нормализации иммунного статуса лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Бизюкин, С. К. Сеодаева, *Пульмонология*, № 1, 46 – 49 (1995).
2. Л. А. Вишнякова, Н. В. Путов, *Тер. архив*, 62(3), 15 – 18 (1990).
3. И. И. Дангиг, И. М. Скипский, Г. П. Смульская, *Тер. архив*, № 3, 32 – 35 (1999).
4. И. В. Зарубина, Б. И. Криворучко, *Укр. биохим. ж.*, 54(4), 437 – 439 (1982).

5. И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, *Молекулярная фармакология антигипоксантов*, Н-Л, Санкт-Петербург (2004).
6. В. Б. Казимировская, В. М. Дьяков, М. Г. Воронков, С. Ф. Ковальчук, *Трекрезан: токсикология, фармакология, результаты клинических испытаний*, Иркутск (1996).
7. Ю. А. Козлов, *Terra medica nova*, № 1, 2 – 5 (2005).
8. Б. В. Пинегин, А. В. Некрасов, Р. М. Хаитов, *Медлайн экспресс*, № 1(177), 19 – 23 (2005).
9. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, В. П. Фисенко (ред.), Москва (2000).
10. А. Г. Чучалин, *Пневмонии*, Москва (1997).
11. А. Г. Чучалин, В. Е. Ноников, *Клин. мед.*, № 1, 71 – 74 (1991).
12. Т. Д. Фомина, И. В. Походзей, *Тер. архив*, № 4, 108 – 110 (1986).
13. В. Х. Хавинсон, В. Т. Морозов, *Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований (методы оценки Т- и В-систем иммунитета)*, Ленинград (1980).
14. D. Atkinson, *Biochemistry*, 7(10), 4030 – 4034 (1968).
15. E. P. Marbach and M. H. Weil, *Clin. Chem.*, 13, 314 – 325 (1967).

Поступила 05.10.05

COMPARATIVE STUDY OF THE ENERGY-STABILIZING AND IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF TREKREZAN AND POLYOXIDON ON A BRONCHOPULMONARY INFLAMMATION MODEL IN RATS

I. V. Zarubina, A. V. Bolekhan, and P. D. Shabanov

Department of Pharmacology, Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

The energy-stabilizing and immunotropic action of immunomodulants trekrezan (25 mg/kg) and polyoxidon (0.75 mg/kg) was compared in rats with a model bronchopulmonary inflammation induced by the introduction of turpentine into trachea. Both drugs exhibited an energy-stabilizing effect, which was manifested by a decrease in the levels of lactate and the ATP-ADP and AMP hydrolysis products and by an increase in the level of pyruvate and ATP in blood lymphocytes and lung tissues. The energy-stabilizing action of polyoxidon was more pronounced in the lung tissue. The action of this drug was generally the same, but less pronounced than the effect of trekrezan. The parallel experiments showed that trekrezan and polyoxidon normalized the immune status of lymphocytes in rats with the model acute bronchopulmonary inflammation.