

МЕСТНЫЙ ИММУНИТЕТ И МИКРОФЛОРА КИШЕЧНИКА ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОМ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЬСТВЕ И ПОДХОДЫ К ЕГО САНАЦИИ

Чайникова И.Н.¹, Смолягин А.И.¹, Скачков М.В.¹,
Калинина Т.Н.¹, Бухарин О.В.²

¹ Оренбургская государственная медицинская академия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, г. Оренбург

Резюме. Исследовано состояние местного иммунитета у больных сальмонеллезом в периоде реконвалесценции как без формирования бактерионосительства, так и у реконвалесцентных бактерионосителей (РБН). У РБН, по сравнению с реконвалесцентами неносителями, обнаружены нарушения микробиоценоза кишечника, выявлен местный дефицит антимикробных факторов защиты: лактоферрина, лизоцима, секреторного IgA, свободного секреторного компонента, антител к О-антигену сальмонелл, IgA, и, напротив, высокий уровень IgM, IgG (за счет IgG1 и IgG4), цитокинов (IL-6, IL-8, IFN γ , IL-4). Установлено, что дефицит sIgA и IgA связан с недостаточностью их местного синтеза, а выявленное увеличение концентрации IgM, IgG оказалось следствием повышения локального синтеза. Применение полиоксидония (ПО) у РБН приводило к улучшению микроэкологического состояния кишечника, что проявлялось в снижении уровня обсемененности условно-патогенной флорой, исчезновении протей, грибов рода *Candida* и восстановлении у 92% РБН индигенной анаэробной флоры. Положительная динамика показателей местного иммунитета под влиянием ПО выразилась в восстановлении концентраций общего IgA, sIgA за счет увеличения местного синтеза, свободного SC, титра антител к О-антигену сальмонелл и изменении содержания цитокинов с восстановлением баланса Th1- и Th2-цитокинов. В условиях *in vitro* выявлено подавление ПО антикомплементарной активности сальмонелл, что способствовало положительному эффекту препарата ПО в отношении симбионтов в системе «паразит-хозяин» при сальмонеллезной инфекции, сокращая сроки бактериоудаления у РБН.

Ключевые слова: местный иммунитет, сальмонеллез, бактерионосители, полиоксидоний.

Chainikova I.N., Smoliagin A.I., Skachkov M.V., Kalinina T.N., Bukharin O.V.

LOCAL IMMUNITY AND GUT MICROFLORA IN THE SALMONELLA CARRIERS AND APPROACHES TO ITS TREATMENT

Abstract. Features of local immunity were studied in the patients with Salmonella infection at reconvalescence, both without carriership, and in reconvalescent carriers of microbial flora (RCM). In RCMs, as compared to non-carriers, some alterations in gut microbiocenosis were revealed, along with local deficiency of antimicrobial defense factors, i.e., lactoferrin, lysozyme, secretory IgA, free secretory component, antibodies to Salmonella O-antigen, IgA, as opposed to high levels of IgM, IgG (due to IgG1 and IgG4), cytokines (IL-6, IL-8, IFN γ , IL-4). It was shown that sIgA and IgA deficiency are connected with their mangling local production, whereas the revealed increase in IgM and IgG concentrations proved to be a consequence of increased local synthesis. Application of polyoxidonium (PO) in RCMs lead to improvement in the gut microenvironment, thus

Адрес для переписки:

Чайникова Ирина Николаевна

460024, г. Оренбург, ул. Б. Хмельницкого, 16, кв. 10.

ОрГМА, проблемная лаборатория.

Тел.: 8 (3532) 77-71-72.

Факс: 8 (3532) 77-24-59.

E-mail: probllab@mail.orenburg.ru

reflected by decreased contamination with facultative flora, disappearance of *Proteus*, *Candida spp.* and recovery of indigenous anaerobic flora in 92 per cent of cases. Positive dynamics of local immunity associated with PO treatment was justified by restoration of total IgA and sIgA concentrations, due to enhanced local synthesis, increase in free secretory component, higher titers of antibodies to Salmonella O-antigen, and changes in cytokine contents, with restoration of Th1/Th2 cytokine balance. Under *in vitro* conditions, a PO-associated suppression of anti-complement Salmonella activity was registered, thus rendering positive effects of the drug towards symbionts in the «host-parasite» system, and shortening the terms of microbial excretion in Salmonella carriers. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 35-42)

Введение

Течение и исход любого инфекционного процесса определяется как биологическими свойствами возбудителя, так и взаимодействием механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Анализ этих важнейших составляющих инфекционного процесса, их взаимосвязей является основой инфектологического подхода, используемого для характеристики инфекции независимо от ее этиологии. Одной из форм сальмонеллезной инфекции является реконвалесцентное бактерионосительство (РБН), в развитии которого могут играть определенную роль нарушения колонизационной резистентности; факторы, способствующие внутриклеточному паразитированию сальмонелл: экспрессия генов, определяющих внутриклеточное выживание [23], персистентные характеристики сальмонелл [3], резистентность к антимикробным факторам [25] и их супрессия [24]. Традиционные методы санации бактерионосителей (ферментные, витаминные препараты, пробиотики, бактериофаги) не всегда оказываются эффективными в отношении сокращения сроков бактериовыделения. Открытым остается вопрос о целесообразности использования препаратов бинарного действия, обладающих способностью корректировать нарушения в системе иммунитета и влиять на способность сальмонелл выживать в организме человека, ускоряя их элиминацию. Для апробации препарата с возможным saniрующим эффектом был выбран полиоксидоний (ПО), являющийся физиологически активным высокомолекулярным соединением, обладающим выраженной иммуномодулирующей активностью [15].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния местного иммунитета и микробиоценоза кишечника у реконвалесцентных сальмонеллезных бактерионосителей и оценка saniрующего эффекта препарата полиоксидония.

Материалы и методы

Первая группа была представлена 30 здоровыми лицами. 2 группа обследованных включала 40 пациентов, перенесших сальмонеллез, вызванный *Salmonella enteritidis* и находящихся в периоде ранней реконвалесценции (3-5 дни после полного исчезновения клинических про-

явлений), у которых контрольные бактериологические исследования фекалий на высеваемость сальмонелл были отрицательными. 3 группа обследуемых была представлена 44 реконвалесцентами, у которых перед выпиской из стационара в контрольных посевах фекалий была выделена *S. enteritidis*. По основным характеристикам (возрастная структура, пол, длительность заболевания) достоверных отличий в рассматриваемых группах не выявлено. У всех заболевших была зарегистрирована гастроинтестинальная форма сальмонеллеза средней тяжести; на долю гастроэнтеритического варианта у пациентов 2 и 3 групп приходилось 78% и 82%, а на долю гастроэнтероколитического варианта — 22% и 18% соответственно.

Реконвалесцентные бактерионосители (третья группа) методом случайной выборки были разделены на две сопоставимые по возрасту, полу, форме и тяжести заболевания подгруппы. Обследуемые 3А подгруппы (22 человека, группа сравнения) получали традиционную терапию пробиотиком (жидкий бифидумбактерин, содержащий бифидобактерии 10^8 КОЕ/г, по 10 доз 3 раза в день); пациенты 3Б подгруппы (22 человека) на фоне традиционной терапии получали внутримышечные инъекции ПО (ООО «Иммафарма», Москва) в дозе 6 мг через день. Через 10 дней проводилось контрольное бактериологическое исследование фекалий. У лиц, продолжающих выделять сальмонеллы, лечение было продолжено еще в течение 10 дней (курс лечения составил 10 инъекций ПО). Бактериологическое обследование пациентов с сохраняющимся бактериовыделением проводилось в последующем с интервалом 7-10 дней до прекращения бактериовыделения. У всех обследуемых РБН до начала лечения и по окончании его было проведено исследование местного иммунитета и состояния микробиоценоза кишечника. С целью верификации сальмонеллеза всем обследуемым проводилось бактериологическое исследование фекалий по стандартным общепринятым методикам с оценкой морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств сальмонелл с использованием коммерческих систем ENTEROtest (Lachema, Чехия). Состав микрофлоры кишечника определяли бактериологическим методом.

Местный иммунитет оценивался по показателям, определяемым в копрофильтратах. Получение копрофильтратов проводилось с поэтапным добавлением ингибиторов протеаз. Супернатант копрофильтратов делили на аликвоты и замораживали при -20°C . В дальнейшем в пробах копрофильтратов определяли: содержание лизоцима — турбидиметрическим методом; количество СЗ компонента комплемента, IgA, IgM, IgG, подклассов IgG1-4, IgE, секреторного IgA (sIgA), свободного секреторного компонента (SC), лактоферрина и цитокинов (IL-4, IL-6, IL-8, IFN γ , gaIL-1) — методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов («Вектор-Бест», Новосибирск; «Полигност», «Цитокин», Санкт-Петербург; «Cytimmune», США). Титр антител (АТ) к О-антигену сальмонеллы (О-АГ) определяли в РПГА с эритроцитарным сальмонеллезным диагностикумом.

Показатели, исследуемые в копрофильтратах, рассчитывались на общий белок или высокомолекулярный белок (ВМБ) [5]. Для оценки проницаемости гистогематического барьера (ГГБ) в сыворотке и копрофильтратах определялась концентрация альбумина колориметрическим методом с бромкрезоловым зеленым («Dia Sys», Германия), и рассчитывался коэффициент проницаемости — Q(Alb). Происхождение иммуноглобулинов (Ig) в копрофильтратах (местный синтез/диффузия) оценивали на основании параллельного определения Ig и альбумина в копрофильтратах и сыворотке крови с расчетом и анализом интегральных показателей (Q(Ig), ОКС, ИС) [11].

Для оценки влияния ПО *in vitro* на персистентные свойства сальмонеллы было проведено исследование действия ПО на антикомплементарную активность (АКА) [3] у 20 штаммов *S. enteritidis*, выделенных от больных сальмонеллезом. В работе использовался препарат «Полиоксидоний» (ООО «Иммафарма», Москва). При оценке влияния препарата *in vitro* на свойства сальмонеллы в питательной среде, содержащей исследуемые суточные культуры микроорганизмов (10^6 КОЕ/мл), создавали среднюю концентрацию ПО 60 мкг/мл, используемую в экспериментах *in vitro* [8].

Для выявления статистически значимых различий в сравниваемых группах наблюдений использовали параметрический критерий Стьюдента—Фишера и непараметрический метод — критерий Вилкоксона.

Результаты

При бактериологическом обследовании больных сальмонеллезом ранее выявлено [6], что бактерионосительство в периоде реконвалесценции формируется у 9,8% больных. При исследовании микробиоценоза кишечника было установ-

лено, что у 87% реконвалесцентов выявляются выраженные микрoэкологические нарушения со значительным дефицитом анаэробной флоры (у 48,5% больных снижение количества бифидобактерий было до 10^7 , а у 6% — ниже 10^7 КОЕ/г). При дефиците бифидофлоры до уровня $\leq 10^7$ КОЕ/г в микробиоценозе присутствовали грибы рода *Candida* ($\chi^2 > 3,84$). Нарушения в аэробной флоре характеризовались увеличением гемолитических штаммов условно-патогенных энтеробактерий (УПЭБ). Наиболее глубокие изменения микробиоценоза толстого кишечника отмечались у РБН. У 70% бактерионосителей выявлялось снижение бифидобактерий до 10^7 , а у 20% — ниже 10^7 КОЕ/г. Изменения аэробной флоры у СРБН выражались в увеличении частоты обнаружения и уровня обсемененности (ПМО) кишечной палочки, не ферментирующей лактозу, других УПЭБ (в основном, за счет бактерий рода *Proteus*) и в возрастании частоты обнаружения *S. aureus* и грибов рода *Candida*.

В копрофильтратах у здоровых людей определялись все исследуемые показатели, кроме gaIL-1 и IFN γ , содержание которых было ниже порога чувствительности используемых ИФА-тест систем (табл. 1). У здоровых лиц количественное соотношение классов Ig в копрофильтратах было ранжировано в ряду — sIgA > IgA > IgG > IgM > IgE. Тем самым установлено преобладание в копрофильтратах секреторной формы IgA и общего IgA над всеми остальными классами Ig. Соотношение подклассов IgG в копрофильтратах у здоровых людей составляло: IgG1 $\approx$ IgG2 > IgG3 > IgG4.

В стадию реконвалесценции, когда практически отсутствовали клинические признаки сальмонеллеза, большинство показателей местного иммунитета, определяемых в копрофильтратах, было достоверно повышенным по сравнению с их уровнем у здоровых лиц. Суммарная концентрация Ig была в 9 раз выше, чем у здоровых лиц, особенно за счет роста количества IgM, sIgA, IgA. Количественное соотношение классов Ig в копрофильтратах по отношению к показателям у здоровых изменялось и составляло: sIgA > IgA > IgM > IgG > IgE. Среди подклассов IgG в копрофильтратах наибольший рост количества отмечен для IgG1 и IgG4, что приводило к изменению количественных соотношений IgG1-4 по сравнению со здоровыми: IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4 (против IgG1 $\approx$ IgG2 > IgG3 > IgG4 у здоровых лиц). У реконвалесцентов выявлялся значительный рост локального уровня IL-4, а содержание IL-6 и IL-8 не отличалось от нормы. Обращает внимание появление в копрофильтратах у реконвалесцентов цитокинов gaIL-1 и IFN γ в отличие от здоровых лиц, у которых они не выявлялись. Вместе с тем, уровень IFN γ был значительно ниже, чем IL-4.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ В КОПРОФИЛЬТРАТАХ У ЛЮДЕЙ ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

Обследуемые Показатель	Здоровые лица (n = 30)	Реконвалесценты			
		неносители (n = 40)	бактерионосители		
			до лечения ПО (n = 44)	после лечения ПО (n = 22)	без лечения ПО (n = 22)
Белок, мг	0,10±0,07	0,15±0,01	0,10±0,01**	0,10±0,02	0,10±0,01
Белок, ВМБ	0,08±0,01	0,12±0,02	0,08±0,01	0,08±0,02	0,08±0,01
АТ к О-АГ, Ig	0,13±0,02	1,05±0,09*	0,17±0,06**	0,69±0,09***	0,28±0,03***
IgA, мг/г ВМБ	30,4±6,45	47,1±5,12*	23,0±2,54**	59,6±7,62***	29,4±3,26****
sIgA, г/г ВМБ	0,25±0,02	0,91±0,10*	0,38±0,04* **	1,22±0,24***	0,45±0,08****
SC, г/г ВМБ	0,08±0,01	0,19±0,02*	0,10±0,01**	0,27±0,01***	0,14±0,06***
IgM, мг/г ВМБ	0,44±0,05	16,8±1,39*	27,9±1,25* **	26,6±3,22	27,6±4,36
IgG, мг/г ВМБ	3,45±0,23	8,44±2,02*	12,5±1,25**	9,34±0,96	11,7±1,62
IgG1, мг/г ВМБ	1,37±0,41	3,79±0,56*	8,89±1,09* **	5,01±0,41***	6,64±0,84
IgG2, мг/г ВМБ	1,26±0,11	2,48±0,49*	3,86±0,64*	3,24±0,22	4,06±0,76
IgG3, мг/г ВМБ	0,50±0,09	0,97±0,17*	1,05±0,24*	0,91±0,06	1,13±0,19
IgG4, мг/г ВМБ	0,20±0,09	0,67±0,09*	1,14±0,21* **	0,05±0,01***	0,99±0,20****
IgE, МЕ/мгВМБ	54,5±3,91	48,6±5,26*	48,1±8,81	50,2±7,36	52,0±6,42
С3 компонент компле- мента, мг/г белка	31,0±4,17	36,1±6,84	27,9±3,36	26,3±2,24	29,4±3,11
Лизоцим, мг/г белка	16,3±1,29	16,8±3,08	9,36±0,59* **	21,3±1,23***	14,9±1,12*** ****
Лактоферрин, мг/г белка	2,04±0,34	8,98±1,96*	3,84±0,31* **	5,01±0,56	3,65±0,41
IL-4, пг/мг белка	464±11	1667±101*	2377±228* **	1670±180***	1889±243
IL-6, пг/мг белка	66±18	76±14	275±88* **	115±11	196±34
IL-8, пг/мг белка	1033±85	1053±103	2746±193* **	2120±163***	2434±268
raIL-1, пг/мг белка	не выявлялся	5464±452*	4039±302* **	6431±720	4210±830****
IFNγ, пг/мг белка	не выявлялся	626±42*	1100±89* **	760±62	953±112

Примечание:* – $p < 0,05$ для различий с показателями здоровых;** – $p < 0,05$ для различий с показателями РБН и реконвалесцентов без бактериовыделения;*** – $p < 0,05$ для различий показателей до и после лечения РБН;**** – $p < 0,05$ для различий показателей у РБН лечившихся ПО и без применения ПО.

Исследование состояния местного иммунитета у РБН показало, что у них выявляется уменьшение суммарной концентрации Ig (176 ± 13 против 387 ± 30 мг/л у лиц 2 группы, $p < 0,05$), преимущественно за счет снижения количества IgA и sIgA, а также дефицит содержания свободного SC, лактоферрина, лизоцима, специфических копроантител (табл. 1). Цитокиновый профиль у РБН (оцениваемый по уровню концентрации цитокинов в копрофильтратах) характеризовался более низким, по сравнению с реконвалесцентами без бактериовыделения, содержанием противовоспалительного цитокина raIL-1 и, напротив, повышенным уровнем провоспалительных – IL-8, IL-6, а также оппозитных цитокинов IL-4 и IFNγ.

Для оценки проницаемости гистогематического барьера и последующей возможности интерпретации причин изменения местного содержания Ig определяли интегральные показатели

(Q, ОКС, ИС) для различных классов Ig и Q альбумина. Альбумин в копрофильтратах у здоровых лиц определялся в концентрации $6,25 \pm 0,41$ г/л, и Q для альбумина составляло $109 \pm 7,9$. В копрофильтратах здоровых лиц ОКС для sIgA и IgE имел значения > 1 , а ИС характеризовался «+» значениями, что свидетельствовало о местном синтезе sIgA и IgE клетками слизистого и подслизистого слоя кишечника (табл. 2). Все остальные классы и подклассы IgG, определяемые в копрофильтратах, преимущественно происходили из сосудистого русла (имели значения ОКС < 1 и «—» значения ИС). У реконвалесцентов, по сравнению с нормой, отмечено увеличение в копрофильтратах концентрации альбумина (соответственно $7,5 \pm 0,71$ против $5,1 \pm 0,41$ г/л, $p < 0,05$) и Q(Alb) (соответственно $147 \pm 12,9$ против $109 \pm 7,9$, $p < 0,05$), что свидетельствовало о повышении ГГБ кишечника. Выявленная высокая концентрация Ig в копрофильтратах реконвалесцентов

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ КОПРОФИЛЬТРАТОВ У ЛЮДЕЙ ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

Показатель	Коэффициенты иммуноглобулинов копрофильтратов у людей обследуемых групп									
	Q					ОКС				
	1	2	3	3 «Б»	1	2	3	3 «Б»	1	2
IgA	1,28 ±0,31	7,08 ±2,37*	1,61 ±0,18**	3,74 ±0,62***	0,02 ±0,001	0,17 ±0,04*	0,117 ±0,023	0,220 ±0,043***	(-0,033) ±0,004	(-0,0321) ±0,004
sIgA	2456 ±266	15395 ±2183*	7213 ±1370**	16903 ±1204**	29,6 ±1,78	229 ±35*	123 ±24,6**	669 ±35***	0,002 ±0,0004	0,01 ±0,0001*
IgM	0,022 ±0,0002	0,85 ±0,12*	0,85 ±0,04	1,19 ±0,28	0,0003 ±0,00001	0,020 ±0,004*	0,036 ±0,005**	0,089 ±0,002***	(-0,058) ±0,009	(-0,040) ±0,005*
IgG	0,048 ±0,008	0,08 ±0,011*	0,08 ±0,002	0,05 ±0,003	0,0006 ±0,00003	0,002 ±0,0004*	0,004 ±0,001**	0,005 ±0,001	(-0,165) ±0,029	(-0,133) ±0,025
IgG1	0,072 ±0,004	0,12 ±0,02*	0,162 ±0,007**	0,016 ±0,001***	0,002 ±0,0004	0,002 ±0,0001	0,002 ±0,0004	0,0005 ±0,0001***	(-0,069) ±0,008	(-0,083) ±0,006
IgG2	0,028 ±0,003	0,127 ±0,016*	0,158 ±0,02	0,029 ±0,001	0,001 ±0,00003	0,001 ±0,0001	0,002 ±0,0004	0,001 ±0,0004	(-0,504) ±0,014	(-0,077) ±0,016*
IgG3	0,112 ±0,013	0,186 ±0,021	0,240 ±0,017**	0,015 ±0,002***	0,003 ±0,00003	0,002 ±0,0001*	0,009 ±0,002**	0,001 ±0,0002***	(-0,007) ±0,0001	(-0,018) ±0,004*
IgG4	0,05 ±0,01	0,129 ±0,029*	0,19 ±0,01**	0,031 ±0,001***	0,001 ±0,0002	0,004 ±0,0002*	0,005 ±0,001**	0,001 ±0,0001	(-0,014) ±0,002	(-0,007) ±0,001*
IgE	142 ±24	182 ±60,3	115 ±31	114 ±11	1,30 ±0,36	1,52 ±0,007	1,77 ±0,11**	1,02 ±0,033	0,386 ±0,048	0,413 ±0,011
									0,533 ±0,060	0,47 ±0,028

Примечания. 1 группа – здоровые лица; 2 группа – реконвалесценты; 3 группа – РБН без применения ПО; 3 «Б» группа – РБН после применения ПО. * – $p < 0,05$ для различий с показателями здоровых; ** – $p < 0,05$ для различий показателей у реконвалесцентов и СРБН; *** – $p < 0,05$ для различий показателей до и после лечения ПО.

(за исключением IgE) связана как с усилением локального синтеза (повышенные, по сравнению с нормой, интегральные показатели местного синтеза Ig), так и с диффузией Ig из периферического кровотока (высокая концентрация альбумина и Q (Alb)). Для IgE отмечено повышение ОКС, что наряду с высоким уровнем альбумина и Q (Alb) свидетельствовало о превосходстве локального синтеза IgE по сравнению с диффузией из периферического кровотока (табл. 2). Вместе с тем это не влияло на уровень концентрации IgE в копрофильтратах в периоде реконвалесценции, т.е. сохранялось нормальное функционирование местной иммунной системы, ассоциированной с ЖКТ.

В отличие от реконвалесцентов не-носителей, у РБН отмечено снижение проницаемости ГГБ, что отражено в уменьшении концентрации альбумина (соответственно $3,26 \pm 0,42$ против $7,5 \pm 0,71$ г/л, $p < 0,05$) и Q (Alb) (соответственно $58,1 \pm 9,48$ против $147 \pm 12,9$, $p < 0,05$). Низкие значения интегральных показателей Ig в копрофильтратах у СРБН объясняют вероятную причину дефицита Ig – ослабление локального синтеза и уменьшение диффузии из кровотока.

Учитывая существенный вклад персистентных свойств бактерий в механизм выживания их в организме хозяина [3], были проведены исследования по влиянию *in vitro* препарата ПО на АКА сальмонелл с учетом высокой информативности этого персистентного признака для прогнозирования развития РБН [18]. При оценке влияния ПО *in vitro* на АКА сальмонелл было установлено снижение уровня АКА у 70% исследуемых культур сальмонелл.

Применение ПО у РБН приводило к сокращению сроков бактериовыделения. У 20 из 22 носителей (90,9%), не получавших ПО, на 10-й день обследования продолжалось выделение возбудителя, и только у двух РБН бактериовыделение прекратилось, тогда как среди лиц, получавших ПО, у 6 (27,3%) из 22 обследуемых после 5 инъекций иммуномодулятора сальмонеллы из фекалий не выделялись. У оставшихся 16 человек этой группы продолжалось выделение *S. enteritidis* из фекалий

и им было продолжено лечение ПО (общий курс — 10 инъекций). После проведенного курса терапии ПО на 21 день обследования у всех оставшихся носителей, получавших данный иммуномодулятор, бактериовыделение прекратилось. У носителей, получавших только бифидумбактерин, к этому сроку выделение сальмонелл сохранялось у 13 человек (59,1%), и при последующем наблюдении бактериовыделение продолжалось: на 28-й день — у 9 (40,9%), на 35 день — у 2 бактерионосителей (9,1%). Прекращение выделения сальмонелл из фекалий у 2 оставшихся РБН данной группы отмечалось на 42 день. В целом использование ПО у РБН приводило к сокращению сроков бактериовыделения по сравнению с лицами, в санации которых он не использовался.

Анализ состояния местного иммунитета у РБН после применения ПО показал выраженный корректирующий эффект препарата в отношении большинства измененных параметров, определяемых в копрофильтратах (см. табл. 1). У 85% бактерионосителей ПО оказал стимулирующий эффект на сниженное содержание специфических антител, лизоцима, лактоферрина, IgA, sIgA, свободного SC и способствовал снижению повышенного уровня IgG, включая его подклассы IgG1, IgG3, IgG4. Увеличение уровня общего IgA, sIgA в копрофильтратах у РБН после применения ПО связано с усилением локального синтеза, о чем свидетельствует достоверный рост значений интегральных показателей (Q, ОКС, ИС). Снижение под влиянием ПО уровня IgG (см. табл. 2) связано с подавлением местного синтеза (снижение значений Q, ИС для IgG, Q, ОКС, ИС — для IgG1, IgG3 и IgG4). Использование ПО оказывало влияние и на локальную продукцию цитокинов, что выражалось в повышении исходно сниженного уровня gaIL-1 и понижении исходно высокого уровня оппозитных цитокинов IL-4, IFN γ с восстановлением локального цитокинового баланса (преобладание содержания IL-4 по отношению к IFN γ). Использование традиционной терапии также приводило к коррекции параметров местного иммунитета, но если ПО способствовал выравниванию 14 параметров, то у бактерионосителей, не получавших данный препарат, выявлен корректирующий эффект лишь для 3 показателей местной защиты (см. табл. 1).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ПО — препарат с бинарным эффектом, проявляющий как иммуотропную активность, так и способствующий подавлению персистентных характеристик возбудителя, что оказалось эффективным при санации РБН (сокращение сроков бактериовыделения и нормализация микробиоценоза кишечника).

Обсуждение

Сдвиги в видовом, количественном и качественном составе облигатной и факультативной микрофлоры кишечника являются одним из условий, способствующих развитию сальмонеллеза [1]. Не исключено, что выявленные нами у бактерионосителей микрoэкологические нарушения, значительно более выраженные, чем у реконвалесцентов неносителей, способствуют формированию РБН.

Результаты исследования показателей местного иммунитета (включая и маркеры воспаления) свидетельствуют о длительном сохранении местной воспалительной реакции в кишечнике после перенесенного сальмонеллеза. В периоде реконвалесценции, когда уже отсутствовали клинические симптомы заболевания, в копрофильтратах выявлялся высокий уровень большинства исследованных показателей, особенно — лактоферрина, IgM, sIgA, специфических копроантител, свободного SC. С результатами нашего исследования согласуются данные других авторов [10], показавших наличие в кишечном содержимом высокого уровня лактоферрина, оксид азота, миелопероксидазы в течение длительного времени после перенесенной острой кишечной инфекции. Вместе с тем выявленные нами у реконвалесцентов высокие титры копроантител можно рассматривать как результат адекватного локального иммунного ответа, обеспечивающего блокаду растворимых микробных антигенов в кишечнике, уменьшая поступление их в кровь [13].

Индукция воспалительного ответа происходит не только вследствие прямой трансэпителиальной инвазии микроорганизмов, но и посредством определенных сигналов через функционально интактный эпителий, в том числе при участии хемокинов и других цитокинов [22]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о значительных изменениях в уровне локально продуцируемых (определяемых в копрофильтратах) про- и противовоспалительных цитокинов. Увеличение в период реконвалесценции содержания IL-6, одной из функций которого является индукция острофазовых белков, сопутствующих воспалению [16, 17], свидетельствуют о сохраняющейся воспалительной реакции в кишечнике в стадии выздоровления после сальмонеллеза. Не исключено и участие в увеличении уровня данного цитокина активированных эпителиальных клеток кишечника, экспрессирующих молекулы MHC 1 и 2 классов, рецепторы для цитокинов IL-1 β , IL-6 и GM-CSF, а также непосредственно продуцирующих различные цитокины, включая IL-6 [14]. Обнаруженные нами изменения локального цитокинового статуса у реконвалесцентов, с одной стороны, отражают сохраняющуюся направленность иммунного ответа на слизистых в сторону

преобладания Th2-зависимых реакций (высокий уровень IL-4), с другой стороны, появление IFN γ в копрофилтратх может свидетельствовать об активации патогеном «барьерных популяций» Т-клеток [20] и усилении клеточных реакций, участвующих в элиминации сальмонелл.

Определенную защитную функцию, сдерживающую развитие местной воспалительной реакции, играет и выявленное в период выздоровления многократное увеличение в копрофилтратх уровня противовоспалительного цитокина — рецепторного антагониста IL-1, который наряду с другими цитокинами (IL-4, IL-10, TNF β) обладает антифлогенным эффектом, ограничивая интенсивность воспалительной реакции [16, 17, 21]. Подобный противовоспалительный эффект отмечен и у IL-6, который опосредованно стимулирует продукцию raIL-1 [27].

Обнаруженное у РБН низкое содержание sIgA, IgA, специфических копроантител объясняется (по нашим данным) ослаблением их локального синтеза и диффузии из кровотока. Дефицит лактоферрина, лизоцима, также выявленный у РБН, наряду с низким содержанием sIgA, вероятно, способствует недостаточности механизмов, предотвращающих персистенцию сальмонелл в организме хозяина. Полифункциональность лактоферрина, как и лизоцима, является основой его биологической роли как эффективного неспецифического протектора клеток [2, 4].

Нарушение иммунорегуляторных процессов, связанных с участием цитокинов, можно рассматривать как одну из причин неэффективности защитных механизмов, обеспечивающих элиминацию сальмонелл из организма хозяина. Одновременное присутствие высоких концентраций в копрофилтратх РБН альтернативных цитокинов IL-4 и IFN γ может тормозить проявление всех форм иммунного ответа, а сохраняющийся высокий уровень провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8) способствует угнетению трансэпителиального переноса IgA [9], что приводит, в частности, к нарушению образования sIgA — важнейшего фактора местного иммунитета. Обобщая результаты исследования состояния местного иммунитета у РБН, необходимо отметить, что рассматривать выявленный локальный дефицит важнейших факторов местного иммунитета и изменения цитокиновой регуляции (как одни из возможных механизмов формирования РБН) следует с позиции их синергидного участия в обеспечении антимикробной защиты [7, 10, 12].

Для разработки рационального способа санации РБН использовался препарат ПО, который помимо иммуномодулирующих свойств, обладает мембранопротекторными и антиоксидантными свойствами [15]. Выбор ПО определялся также имеющимися в литературе данными

о способности препаратов антиоксидантного типа подавлять персистентный потенциал бактериальных патогенов [3, 19]. Результаты наших исследований по влиянию *in vitro* ПО на АКА сальмонелл выявили подавление персистентных свойств сальмонелл под действием препарата, что способствовало ускорению элиминации возбудителя из организма бактерионосителя. Сокращение сроков бактериовыделения у РБН, получавших ПО, коррелировало с улучшением микрoэкологического состояния кишечника, положительной динамикой показателей местного иммунитета, изменением соотношения про- (снижение уровня IL-6, IL-8) и противовоспалительных цитокинов (повышение количества raIL-1), восстановлением локального баланса Th1- и Th2-цитокинов в сторону преобладания последних.

Полученные результаты подавления полиоксидонием персистентных свойств сальмонелл и его корригирующее влияние на состояние колонизационной резистентности кишечника у РБН позволяют оценивать ПО как препарат бинарного действия, т.е. влияющий как на иммунную систему человека, так и на свойства возбудителя. Конечный результат суммарного влияния вышеуказанных положительных эффектов ПО в отношении симбионтов системы «паразит-хозяин» при сальмонеллезной инфекции проявился в значительном сокращении сроков бактериовыделения.

Таким образом, на основе использования инфектологического подхода разработан эффективный способ лекарственной санации сальмонеллезных бактерионосителей препаратом бинарного действия — полиоксидонием, влияющим на свойства возбудителя и механизмы локальной антимикробной защиты. Проведение курса санации полиоксидонием в комплексной терапии приводит к ускорению элиминации сальмонелл, положительной динамике местного иммунитета и микробиоценоза кишечника.

Список литературы

1. Акимкин В.Г. Дисбактериоз кишечника как фактор риска заболевания нозокомиальным сальмонеллезом // Журн. микробиол. — 1997. — № 3. — С. 105-106.
2. Бабина С.Е., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н., Невиский Г.А. Лактоферрин — дезоксирибонуклеаза человеческого молока // Биохимия. — 2004. — Т. 69, Вып. 9. — С. 1239-1250.
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. — М.: Медицина, 1999. — 365 с.
4. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. — Томск, 1974. — 280 с.
5. Исследование иммуноглобулинов и других белков в секретах человека // Методические рекомендации МЗ РФ — М., 1987. — 34 с.

6. Калинина Т.Н. Эпидемиологические особенности сальмонеллезов в промышленном городе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2005. — 23 с.
7. Кокряков В.Н., Ковальчук Л.В., Алешина Г.М. и др. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность // Журн. микробиол. — 2006. — № 2. — С. 98-105.
8. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Механизм действия и клинические аспекты применения иммуномодулятора полиоксидония // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии. — М., 2001. — Т. 1. — С. 334-348.
9. Полевщиков А.В., Гордиенко Е.В. Состав изоформ секреторных антител у детей с различными формами риносинуситов // Иммунология Урала. — 2002. — № 1 (2). — С. 96.
10. Титов В.Н. С-реактивный белок: гетерогенность и функциональная связь с окислительным стрессом как с маркером воспаления // Клинич. лаб. диагностика. — 2004. — № 7. — С. 3-11.
11. Тотолян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний // Мед. иммунология. — 1999. — Т. 1, № 1-2. — С. 75-108.
12. Тотолян А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 7-15.
13. Хазенсон Л.Б., Чайка Н.А. Иммунологические основы диагностики и эпидемиологического анализа кишечных инфекций — М.: Медицина, 1987. — 112 с.
14. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. — М.: ВИНТИ РАН, 2001. — 224 с.
15. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о механизме действия полиоксидония // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 197-200.
16. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 4-7.
17. Фрейдлин И.С., Назаров П.Г. Регуляторные функции провоспалительных цитокинов и острофазных белков // Вестник РАМН. — 1999. — № 5. — С. 28-32.
18. Чайникова И.Н. Информативность иммунологических показателей и биологических свойств сальмонелл для прогнозирования исхода сальмонеллезной инфекции // Вестник ОГУ. — 2006. — № 1. — С. 58-62.
19. Чернова О.Л. Антилизозимная активность стафилококков, выделенных при бактерионосительстве: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Челябинск, 1989. — 17 с.
20. Ярилин А.А. Взаимодействие эпителиальных и лимфоидных клеток барьерных тканей в норме и при патологии // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии. — М., 2001. — Т. 1. — С. 261-298.
21. Arend W.P., Guthridge C.J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms // Ann. Rheum. Dis. — 2000. — Vol. 59, N 1. — P. 60-64.
22. Brandtzaeg P., Farstad I., Haraldsen N. Regional specialization in mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track // Immunol. Today. — 1999. — Vol. 20 — P. 267-278.
23. Hisert K., MacCoss M., Shiloh M.U., Darwin K.H., Shaneen S., Jones Roger A., Ehrt S., Zhang Z., Gaffney B.L., Gandotra S., Holden D.W., Murray D., Nathan C. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of Salmonella controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: Role of cyclic diGMP // Mol. Microbiol. — 2005. — Vol. 56, N 5. — P. 1234-1245.
24. Mattsby-Baltzer I., Ahlstrom B., Edebo L., de Man-P. Susceptibility of lipopolysaccharide-responsive and hyporesponsive ItyS mice to infection with rough mutants of Salmonella typhimurium // Infect. Immun. — 1996. — Vol. 64, N 4. — P. 1321-1327.
25. Nishio M., Okada N., Miki T., Haneda T., Danbara H. Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in Salmonella enterica serovar Choleraesuis // Microbiology. — 2005. — Vol. 151, N 3. — P. 863-873.
26. Tilg H., Dinarello C.A., Mier J.W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators // Immunol. Today. — 1997. — Vol. 18, N 9. — P. 428-32.
- поступила в редакцию 28.06.2007
принята к печати 13.09.2007