

А.А.Борздов, В.И.Ефременко, И.Ю.Борздова, О.В.Логвиненко, А.И.Бондаренко

**ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ВВЕДЕНИЯ ИМ ИНТАКТНЫХ ЛИПОСОМ**

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Проведена оценка состояния иммунитета (факторов естественной резистентности, клеточного и гуморального), а также изучена функциональная и ферментативная активность нейтрофилов крови при различных путях введения (пероральное и внутрибрюшинное) экспериментальным животным интактных липосом, сформированных из липидов, выделенных из свиного головного мозга. Показано, что независимо от способа введения, липосомы оказывают длительное стимулирующее действие на иммунокомпетентные клетки, более выраженное при внутрибрюшинном введении препарата.

Ключевые слова: липосомы, естественный иммунитет, фагоцитоз, лимфоциты.

В решении проблемы направленного транспорта биологически активных соединений в отдельные органы, ткани и клетки макроорганизма значительная роль отводится нанокапсулам – липосомам как контейнерам направленного действия для доставки лекарственных средств [1, 3, 14, 21].

Способность липосом обеспечивать доставку лекарств внутрь клетки предопределяет их успешное использование при лечении многих заболеваний, в том числе и инфекционных [5, 8, 11, 12, 18, 21].

При оценке действия различных липосомальных препаратов важно учитывать их способность влиять на клеточные и гуморальные факторы иммунитета макроорганизма, так как липосомы, в первую очередь, имеют тропность к клеткам ретикулоэндотелиальной системы и иммунокомпетентным клеткам [3, 6]. Компоненты бислойной мембраны липосом при нахождении, пероральном и парентеральном путях введения активно взаимодействуют с клеточными системами макроорганизма и включаются в метаболические процессы, вызывая при этом обратимые изменения их функционального состояния, а также биохимических и цитохимических показателей [9, 10].

Однако многие механизмы их влияния на иммунную систему организма до конца еще не изучены и ограничиваются единичными сообщениями [2, 4].

Целью данного исследования явилось изучение некоторых показателей естественного иммунитета у экспериментальных животных при различных путях введения (пероральном и внутрибрюшинном) интактных липосом, мембрана которых была сформирована из фосфолипидов и липидов, выделенных из свиного головного мозга, которые были представлены фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсеринем, фосфатидилинозидом, сфингомиелином, цереброзидом и холестерином.

Липосомы получали методом встряхивания. Формирование липосом, поперечный размер которых достигал 300–800 нм, контролировали при

электронно-микроскопическом исследовании. Концентрация липидов в полученном препарате липосом составила 35 мг в 1 мл фосфатного буфера, рН 7,2.

Для изучения действия липосом на иммунологические показатели использовали беспородных белых мышей обоих полов массой 18–20 г, выращенных в питомнике СтавНИПЧИ. Экспериментальных животных разделили на 4 группы. Животным 1-й и 2-й групп однократно перорально через зонд вводили по 1,0 мл 0,85 % NaCl, рН 7,2 (контрольная группа – 50 мышей) и по 1 мл взвеси липосом (опытная группа – 50 мышей), 3-й и 4-й группам животных (по 50 мышей) вышеуказанные препараты однократно инъецировали внутрибрюшинно по 1 мл.

После декапитации животных исследование иммунологических характеристик крови проводили в динамике на 5, 7, 14, 21, 28-е сутки после введения препаратов. Состояние естественного иммунитета оценивали по уровню общего комплемента, фагоцитарной активности нейтрофилов крови и изучению кластеров дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Реакцию комплемента проводили в 1 % агарозном геле с использованием коммерческого комплемента, нативных эритроцитов барана и коммерческой гемолитической сыворотки. Диаметр кольца лизиса эритроцитов барана учитывали при помощи линейки для серологических реакций. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин [15, 19]. При определении клеток, экспрессирующих CD⁺ антиген, использовали Fits conjugate производства Coltag laboratories.

Для изучения фагоцитарной активности макрофагов крови животных использовали тест, основанный на регистрации количества клеток, способных к поглощению объектов фагоцитоза. Учитывались все типы фагоцитирующих клеток (нейтрофилы, эозинофилы, моноциты). В качестве объекта фагоцитоза использовали пекарские дрожжи, предварительно

тщательно отмытые в 0,85 % растворе NaCl, pH 7,2. Реакцию проводили в спонтанном и индуцированном состояниях. Для стимуляции полиморфно-ядерных лейкоцитов использовали пирогенал коммерческий. Приготовленные мазки фиксировали в метиловом спирте и окрашивали методом Романовского-Гимза, подсчет проводили в 100 клетках.

При выявлении в нейтрофилах крови лизосомальных катионных белков (КБ) использовали методику В.Е.Пигаревского [16]. В местах наличия КБ отмечалось окрашивание гранул в зеленый цвет. Миелопероксидазу (МПО) в этих же клетках крови определяли по методу Р.Лилли [7]. Активность пероксидазы выявлялась в клетках миелоидного ряда в виде желтовато-коричневых гранул.

Содержание КБ и МПО определяли полуколичественным методом с последующим определением среднего цитохимического показателя. Основой метода является определение степени интенсивности реакции по количеству окрашенного вещества цитоплазмы.

Полученные данные обрабатывали статистически по методике И.А.Ойвина [13] с определением показателей М (средних величин), m (их ошибок) и достоверности различий. Последний определяли с помощью критерия Стьюдента. При уровне статистической значимости $P < 0,05$ результаты считались достоверными.

Нам представлялось интересным проследить динамику изменения фагоцитарной активности нейтрофилов, так как нарушение функций нейтрофильных гранулоцитов крови, являющихся активными фагоцитами, является одной из причин летального исхода при бактериальных инфекциях. Наоборот, благоприятный исход при многих заболеваниях наблюдается в результате выраженного фагоцитарного ответа. Зависимость фагоцитоза от физического состояния организма представляет собой реальную основу для использования фагоцитарных реакций в качестве ин-

дикатора для оценки состояния естественного иммунитета организма.

В эксперименте изучали факторы естественной резистентности организма, включающие фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов при пероральном и внутривнутрибрюшинном введении экспериментальным животным липосом. В ходе проведенных исследований было показано, что уровень фагоцитарной активности нейтрофилов крови белых мышей в спонтанном и индуцированном состояниях при пероральном и внутривнутрибрюшинном введении интактных липосом был достоверно выше, чем в группах контрольных животных ($P < 0,05$).

Увеличение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов (рис. 1) как в спонтанном, так и в индуцированном состоянии у экспериментальных животных, по сравнению с показателями контрольных групп, отмечали уже на 5-е сутки наблюдения: при пероральном введении индуцированный фагоцитоз составил $(93,0 \pm 1,4) \%$; спонтанный – $(90,0 \pm 0,4) \%$; контрольные показатели – $(91,0 \pm 0,4) \%$ и $(82,0 \pm 2) \%$ соответственно; при внутривнутрибрюшинном введении индуцированный фагоцитоз соответствовал $(95,0 \pm 0,8) \%$; спонтанный – $(94,0 \pm 0,8) \%$; контроль – $(92,0 \pm 0,4) \%$ и $(84,0 \pm 2) \%$ соответственно.

На 14-е сутки исследования фагоцитарная активность нейтрофилов во всех группах животных достигала максимальных значений: при пероральном введении липосом в спонтанном состоянии – $(94,0 \pm 1,3) \%$; в индуцированном – $(98,0 \pm 1,5) \%$; у контрольной группы – $(86,0 \pm 2) \%$ и $(90,0 \pm 3,7) \%$ соответственно. При внутривнутрибрюшинном введении липидных везикул в спонтанном состоянии – $(95,0 \pm 0,8) \%$; в индуцированном – $(99,0 \pm 2) \%$; контрольная группа в спонтанном состоянии – $(87,0 \pm 3) \%$; в индуцированном – $(92,0 \pm 0,6) \%$.

К 21–28-м суткам наблюдения во всех группах животных отмечали незначительное снижение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов. Однако, по сравнению с величинами контрольных групп, показатели были выше: при пероральном введении липосом показатель индуцированного фагоцитоза соответствовал $(95,0 \pm 1,8) \%$; спонтанного – $(92,0 \pm 1,1) \%$; показатели контроля – $(92,0 \pm 2,5) \%$ и $(85,0 \pm 3) \%$ соответственно. При внутривнутрибрюшинном введении липосом – $(96,0 \pm 0,4) \%$ (индуцированный фагоцитоз), $(92,0 \pm 0,1) \%$ (спонтанный фагоцитоз). Контрольные группы животных имели показатели – $(92,0 \pm 0,8) \%$ и $(86,0 \pm 2) \%$ соответственно.

В литературе имеются данные об использовании изменений показателей функционально-метаболической активности нейтрофилов для диагностики иммунологического статуса макроорганизма, оценки тяжести протекающих в организме бактериальных и вирусных инфекций [17]. При оценке функционально-метаболических изменений в нейтрофилах крови экспериментальных животных были использованы цитохимические методы исследования и изучены наиболее важные представители микро-

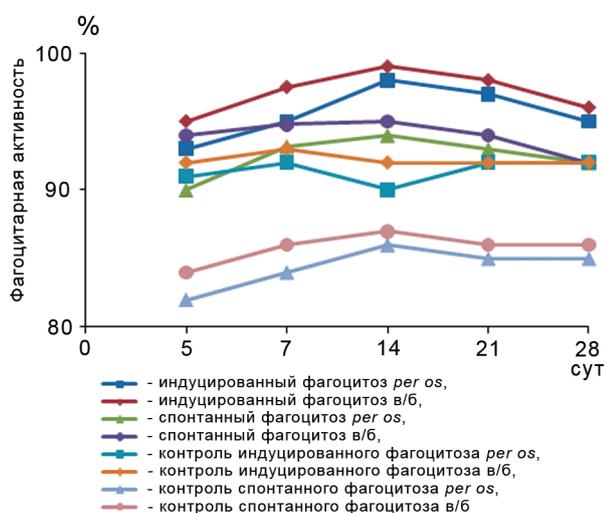


Рис. 1. Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов крови животных при разных путях введения интактных липосом

бицидной системы, непосредственно участвующие в стадии киллинга фагоцитированных объектов – КБ и МПО.

Динамика изменения активности исследуемых цитохимических показателей была следующей (рис. 2). При пероральном и внутрибрюшинном введениях липосомального препарата отмечали достоверное ($P < 0,05$) увеличение количественного содержания КБ и МПО в нейтрофилах крови по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах животных.

При пероральном введении интактных липосом на 5-е сутки наблюдения содержание КБ ($1,12 \pm 0,04$) и активность МПО ($0,99 \pm 0,06$) превышали показатели контрольной группы ($0,81 \pm 0,07$ и $0,94 \pm 0,03$ соответственно). Содержание КБ при пероральном способе введения достоверно повышалось на 7–14-е сутки – $1,18 \pm 0,06$; МПО на 21–28-е сутки – $1,21 \pm 0,12$. При внутрибрюшинном введении препарата максимальное содержание КБ ($1,19 \pm 0,04$) и активность МПО ($1,12 \pm 0,07$) отмечали в ранние сроки наблюдения – на 5-е сутки, что достоверно ($P < 0,05$) превышало данные контрольных групп ($0,85 \pm 0,04$ и $0,96 \pm 0,04$ соответственно). В последующие сроки наблюдения с 7-х до 28-х суток эти показатели в опытных группах имели тенденцию к снижению (КБ – $0,9 \pm 0,03$; МПО – $0,99 \pm 0,03$), однако превышали данные контрольных групп животных.

В эксперименте изучали уровень общего комплемента в сыворотке крови белых мышей. Введение интактных липидных везикул как при пероральном, так и при внутрибрюшинном поступлении в организм сопровождалось повышением уровня общего комплемента в сыворотке крови во все сроки наблюдения по сравнению с показателями у контрольной группы (таблица). Максимальные числовые значения общего комплемента определялись на 5-е сутки после введения липосом при всех путях введения

($298,0 \pm 22$ – пероральное; $240,0 \pm 21$ – внутрибрюшинное). В последующие сроки исследования, начиная с 7-х суток и до конца эксперимента (28-е сутки), прослеживалась тенденция к постепенному снижению уровня исследуемого показателя ($220,0 \pm 22$ – пероральное; $198,0 \pm 11$ – внутрибрюшинное), однако до конца эксперимента искомый показатель статистически значимо превышал данные в контрольной группе ($P < 0,05$).

В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что введение животным интактных липосом сопровождалось увеличением количества клеток, экспрессирующих CD3 антиген. На 5-е сутки наблюдения количество CD3+ клеток при пероральном введении препарата соответствовало ($38,0 \pm 2,6$) %; при внутрибрюшинном – ($42,0 \pm 2,4$) %; контрольные группы – ($38,0 \pm 1,6$) % и ($39,0 \pm 0,8$) % соответственно. Как следует из данных таблицы, максимальные показатели выявлялись на 14-е сутки от начала опыта, затем происходило постепенное снижение до значений ($38,0 \pm 3,8$) % и ($40,0 \pm 1,2$) % соответственно. Через 28 сут от начала введения липидных везикул при разных путях их поступления количество CD3+ клеток достоверно не отличалось от данных контрольных групп животных ($P > 0,05$).

При изучении уровня динамики изменений количества CD4+ клеток в крови животных установлено, что при пероральном введении в их организм липосом колебания показателей CD4+ клеток носили волнообразный характер со снижением их уровня в более отдаленные сроки опыта (28-е сутки) до показателей в контрольной группе животных – ($22,0 \pm 1,9$) % и ($22,0 \pm 1,2$) % соответственно. При внутрибрюшинном введении количество CD4+ клеток имело тенденцию к постепенному снижению к окончанию эксперимента, однако к 28-м суткам контрольные величины оставались ниже по сравнению с данными в опытной группе – ($23,0 \pm 1,4$) % и ($24,0 \pm 1,2$) % соответственно ($P > 0,05$). Максимальное количество CD4+ клеток при пероральном и внутрибрюшинном введениях отмечалось на 5-е сутки от начала опыта – ($32,0 \pm 1,2$) %.

Динамика изменения в крови экспериментальных животных CD8α+ клеток при разных способах введения фосфолипидных везикул носила волнообразный характер. На 5-е сутки исследования показатели имели максимальное значение – ($25,0 \pm 1,5$) % (пероральное введение), ($23,5 \pm 1,2$) % (внутрибрюшинное введение). На 7-е сутки отмечали тенденцию к снижению количества CD8α+ клеток до ($19,0 \pm 1$) % при пероральном способе введения по сравнению с результатами контрольной группы – ($20,0 \pm 1,3$) %. К 14-м суткам наблюдения исследуемые показатели незначительно увеличивались, а к 21-м суткам – понижались вновь. К концу опыта при пероральном введении препаратов в группе контрольных животных количество CD-8α+ клеток в крови было выше – ($20,0 \pm 1,3$) %, чем в опытной – ($19,8 \pm 1,1$) %. При внутрибрюшинном поступлении препарата к окончанию

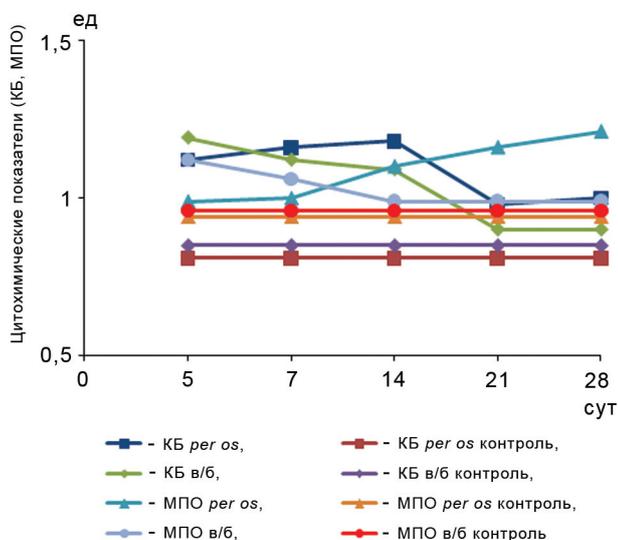


Рис. 2. Динамика цитохимических показателей крови животных при разных путях введения интактных липосом

Динамика показателей клеточных и гуморальных факторов иммунитета у экспериментальных животных при разных путях введения липосом

Показатели	Путь введения	Сроки наблюдения, сут					Фоновое значение показателей
		5-е	7-е	14-е	21-е	28-е	
Комплемент	<i>per os</i>	298,0±22	175,0±15	246,0±25	225,0±23	220,0±22	175,0±15
	в/б	240,0±21	182,0±12	200,0±5	200,0,14	198,0±11	182,0±12
CD-3+	<i>per os</i>	38,0±2,6	38,0±1,6	47,0±,2	46,4±3,9	38,0±3,8	38,0±1,6
	в/б	42,0±2,4	45,0±3	50,0±4	47,0±2,6	40,0±1,2	39,0 ±1,6
CD-4+	<i>per os</i>	32,0±1,2	26,0±1,4	22,4±1,1	24,0±1,8	22,0±1,9	22,0±1,2
	в/б	35,0±1,4	34,0±1,2	28,0±1,4	26,0±1,1	24,0±1,2	23,0±1,4
CD-8α+	<i>per os</i>	25,0±1,5	19,0±1,2	19,6±1,2	19,4±2	19,8±1,1	20,0±1,3
	в/б	23,5±1,2	22,3±1,4	21,5±1,2	20,0±1,2	20,1±0,8	20,0±0,4
CD-19+	<i>per os</i>	14,0±0,4	15,0±0,8	18,1±0,6	18,02±0,8	18,2±0,84	18,0±0,58
	в/б	11,0±0,8	22,0±0,6	20,0±0,4	20,0±0,6	20,0±0,4	19,0±0,6

эксперимента количество CD8α+ клеток значимо не отличалось от данных контрольных групп (таблица). Однако во всех опытных группах введение липидных везикул не сопровождалось достоверным увеличением количества клеток, экспрессирующих CD-8α антиген, по сравнению с контрольными величинами ($P > 0,05$).

Из данных таблицы следует, что при пероральном и внутрибрюшинном введении липосом на 5-е сутки наблюдения отмечали достоверное снижение в крови экспериментальных животных количества CD19+ клеток до (14,0±0,4) % и (11,0±0,8) % по сравнению с результатами, полученными от контрольных групп животных ($P < 0,05$). На 14–28-е сутки наблюдений при пероральном введении препарата уровень исследуемых величин находился в пределах контрольных показателей, при внутрибрюшинном поступлении липосом максимальное количество CD19+ клеток регистрировалось на 7-е сутки опыта – (22,0±0,6) %, в последующие сроки эксперимента полученные результаты недостоверно превышали показатели в контрольной группе. Начиная с 14-х суток, во всех опытных группах цифровые значения CD19+ клеток статистически недостоверно превышали данные контроля ($P > 0,05$).

Таким образом, независимо от способа введения (пероральное и внутрибрюшинное) экспериментальным животным фосфолипидных липосом, они оказывали стимулирующие действие на иммунокомпетентные клетки, регистрируемое до 28-х суток (срок наблюдения). В связи с этим можно предположить, что к этому моменту ферментные системы нейтрофилов оставались в активном состоянии. При этом статистически достоверно увеличивался уровень фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови белых мышей в спонтанном и индуцированном состояниях с одновременным повышением активности микробицидных систем (КБ и МПО) нейтрофилов крови животных, непосредственно участвующих в стадии киллинга фагоцитирующих объектов, что указывает на присутствие иммуномодулирующего эффекта липосом.

В ходе проведенных исследований также показано, что липидные везикулы при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении повышали в крови экспериментальных животных уровень некоторых клеточных (CD3+ и CD4+) и гуморальных (комплемент) факторов иммунитета на длительный срок (28 сут), однако не оказывали заметного влияния на количественный уровень CD8α+ и CD19+ клеток. При внутрибрюшинном введении липосом изменение исследуемых в эксперименте показателей происходило в более ранние сроки, по сравнению с пероральным их поступлением, и носило более выраженный характер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов К.С., Скидан И.Н., Гуляев А.Е., Северин С.Е., Гальперина С.Э. Некоторые аспекты направленного транспорта лекарств в организме с помощью полимерных наночастиц. *Клин. исследования лекарственных средств в России*. 2001; 2:18–21.
2. Борздов А.А., Логвиненко О.В., Борздова И.Ю., Ефременко В.И. Оценка иммуногенности интактных липосом по показателям гуморального и клеточного иммунитета. *Мед. вестник Сев. Кавказа*. 2008; 3(11):6–11.
3. Ефременко В.И. Липосомы (получение, свойства, аспекты). Ставрополь; 1999. 263 с.
4. Ефременко Д.В., Борздов А.А., Борздова И.Ю., Кочарян А.С. Влияние липосом – потенциальных транспортеров лекарственных препаратов на морфологические и иммунологические показатели у экспериментальных животных. *Вестн. Рос. воен.-мед. акад. СПб*; 2008; 2(22) (Приложение):154–5.
5. Исмаилова Г.К., Жилченко Е.Б., Ефременко Д.В., Головченко Т.В., Малецкая О.В., Одинец А.В. и др. Эффективность применения липосомальных форм антибиотиков при лечении некоторых инфекционных заболеваний в эксперименте. *Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та. Волгоград*; 2007; 1:64–7.
6. Кузякова Л.М., Ефременко В.И. Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом. Ставрополь; 2000. 169 с.
7. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
8. Малецкая О.В. Научно-экспериментальное обоснование путей повышения эффективности этиотропной терапии бруцеллеза [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Ростов-н/Д; 2004.
9. Мисетова Е.Н. Метаболические изменения в крови при различных способах введения липосом [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Ростов-н/Д; 2003.
10. Мисетова Е.Н., Ефременко В.И., Таран Т.В., Жилченко Е.Б. Влияние липосом на функциональную активность полиморфноядерных лейкоцитов. В кн.: *Матер. VIII съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. М.*; 2002. Т. 2. С. 205–6.
11. Оверченко В.В. Лечение сибирской язвы у экспериментальных животных свободными и липосомальными формами антибиотиков и иммуномодуляторов [автореф. дис. ... канд. мед.

наук]. Ростов-н/Д; 2002.

12. *Одинец А.В.* Влияние липосомальных форм антибиотиков на патогенные свойства *Treponema pallidum*, паразитирующей в организме экспериментальных животных [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Ставрополь; 2008.

13. *Ойвин И.А.* Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований. Патол. физиология. 1960; 4:76–85.

14. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Уткин Д.В.* Правовые и теоретические предпосылки применения нанотехнологии и наноматериалов в диагностике, профилактике и лечении особо опасных инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 6:93–7.

15. *Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К.* Иммунология (практикум). Киев: Высшая школа; 1989. 302 с.

16. *Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А.* К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике. Лаб. дело. 1981; 10:7–11.

17. *Ракитина Е.Л.* Изучение факторов естественной резистентности у детей и взрослых при различной патологии. В кн.: Здоровье: соц. и мед.-биол. аспекты исслед. Ставрополь; 2005. С. 86–90.

18. *Таран Т.В.* Биотехнология получения лекарственных и иммуногенных липосомальных композиций, используемых в лечении экспериментальных особо опасных инфекций и получения сырья для производства медицинских иммунобиологических препаратов [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Ставрополь; 2004.

19. *Яришин А.А.* Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой ответа. Иммунология. 1999; 1:17–26.

20. *Abra R.M., Bankert R.B., Chen F. et al.* Naocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. J. Liposome Res. 2002; 12:1–3.

21. *Asai T., Shimizu K., Kondo M. et al.* Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels. FEBS Lett. 2002; 520:167–70.

Об авторах:

Борздов А.А., Ефременко В.И., Борздова И.Ю., Логвиненко О.В., Бондаренко А.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

A.A.Borzdov, V.I.Efremenko, I.Yu.Borzdova, O.V.Logvinenko, A.I.Bondarenko

Analysis of Some Immunological Blood Indices of Experimental Animals when Administering Them Intact Liposomes in Different Ways

Stavropol Anti-Plague Research Institute

State of immunity (cellular and humoral, natural resistance factors) was evaluated, functional and enzymatic activity of blood neutrophils was studied in experimental animals under administration of intact liposomes in different ways (*per os* and *intra peritoneum*). The liposomes were formed out of the lipids isolated from porcine brains. The liposomes were shown to produce prolonged stimulating effect upon immunocompetent cells at any way of administration, this effect being more pronounced when preparations were injected *intra peritoneum*.

Key words: liposomes, natural immunity, phagocytosis, lymphocytes.

Authors:

Borzdov A.A., Efremenko V.I., Borzdova I.Yu., Logvinenko O.V., Bondarenko A.I. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 18.05.09.