Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В. А. Кратасюк
подпись
«_____» _____ 20___г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Фагоцитарная активность моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов в ответ на метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus*

Научный руководитель д.б.н., доцент О. А. Коленчукова
_____
подпись, дата

Выпускник Д. И. Тюменцева
_____
подпись, дата

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Фагоцитарная активность моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов в ответ на метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus*» содержит 55 страниц текстового документа, 38 использованных источников.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ,МОНОЦИТЫ,НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ, АНТИБИОТИКРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, БАКТЕРИИ, ФАГОЦИТОЗ

Цель работы: изучить кислородозависимый и кислородонезависимый фагоцитоз нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при воздействии метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus.*

Проводилась оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови у здоровых людей при воздействии метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных штаммов методами хемилюминесценции и проточной цитометрии.

В ходе исследования было обнаружено, что в зависимости от наличия антибиотикорезистентности, реакция иммунной системы на одни и те же штаммы бактерий значительно варьируется.

Содержание

СОДЕРЖАНИЕ 3

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6

1.1 Хемилюминесценция 6

1.2 Биолюминесценция 11

1.3 Характеристика бактерии Staphylococcus 13

1.4 Характеристика нейтрофильных гранулоцитов 18

1.5 Характеристика моноцитов 22

1.6 Фагоцитоз 26

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 35

2.1 Объекты исследования 35

2.2 Методы исследования 35

2.3Биолюминесцентное определение активности дегидрогеназ 38

2.4 Статистические методы исследования 41

ГЛАВА 3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 42

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 50

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 51

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии являются причиной 90% госпитальных инфекций. В последнее время этиология госпитальных инфекций подвергались значительным изменениям; это является следствием использования новых антибактериальных препаратов обширного спектра действия, а также – появления мультирезистентных штаммов.

Современные данные системы контроля за госпитальными инфекциями свидетельствуют о том, что растет резистентность всех известных возбудителей, это необходимо учитывать при планировании антибиотикотерапии.

В настоящее время основными проблемными микроорганизмами являются β – лактамазы расширенного спектра (БЛРС), к котором относиться и золотистый стафилококк (MRSA) [1].

По результатам исследования микробиологического профиля отделения хирургической реанимации и интенсивной терапии за 2013 год выявлено, что наиболее часто выделяемыми микроорганизмами являются золотистый стафилококк – 18 %. При этом среди всех золотистых стафилококков число метициллинрезистентных равно 81,5 %

Так как нейтрофильные гранулоциты и моноциты являются фагоцитирующими клетками, которые направлены на антибактериальную защиту, актуальным представляется определять функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при воздействии бактерий. “Респираторный взрыв” – механизм противобактериальной защиты, стимулирующий фагоцитоз нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови и основан на окислении и восстановлении НАДФ, в результате этих процессов вырабатываются активные формы кислорода (АФК).Хемилюминесцентный анализ – безопасный и высокочувствительный метод диагностики воспалительных процессов в организме. Метод хемилюминесцентного анализа применяют для оценки и регистрации “респираторного взрыва”.

Таким образом целью исследования является изучение кислородозависимого и кислородонезависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при воздействии метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus.*

Задачи:

1. Исследовать особенности активности НАД- и НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ штаммов *Staphylococcus aureus*, в зависимости от их устойчивости к метициллину.
2. Провести сравнительный анализ кислородозависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови при воздействии мецитиллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных штаммов с помощью люминол- и люцигенин- зависимой хемилюминесценции.
3. Провести сравнительный анализ кислородонезависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови при воздействии мецитиллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных штаммов с помощью метода проточной цитометрии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Хемилюминесценция

Хемилюминесценция (ХЛ) – свечение, сопровождающее химические реакции. Хемилюминесценция обусловлена, реакциями экзотермического типа. ХЛ протекает в три стадии:

1) Восстановление одного из участников реакции (присоединение электрона) и окисление второго (отрыв электрона), что приводит к запасанию химической энергии в системе, которая позднее выделится в виде фотона.

2) Перенос электрона (окислительно-восстановительная реакция) на один из более высоких энергетических уровней и образование продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии.

3) Высвечивание фотона при переходе молекулы из электронно-возбужденного в основное состояние (люминесценция). Обычно химические реакции, сопровождающиеся свечением, протекают через целый ряд промежуточных стадий, но основные этапы образования и испускания энергии сходны [2].

ХЛ метод позволяет регистрировать короткоживущие свободные радикалы, которые можно разделить на четыре группы:

а) СР липидов,

б) свободные радикалы (СР) активных форм кислорода,

в) СР естественных антиоксидантов»

г) СР, осуществляющие ферментативное дыхание в митохондриях

Свободные радикалы хемилюминесценции клеток[3].

Живые клетки - фагоциты (к ним относятся тканевые макрофаги, а также моноциты и гранулоциты крови) сами формируют при стимулировании активные формы кислорода. При этом отмечается хемилюминесценция, особенно выраженная при наличии люцигенина (или люминола). В качестве примера показана хемилюминесценция клеток крови при действии на кровь кратковременных электрических импульсов, вызывающих увеличение проницаемости клеточных мембран и стимуляцию выделения клетками

активных форм кислорода. "Хемилюминесцентные ответы" можно получить, при добавлении к лейкоцитам в кровь изолированные стенки дрожжевых клеток, суспензию бактерий, кристаллы сульфата бария или кварца, а также определенные химические соединения - агенты, а также "стимулы". Функциональное состояние фагоцитов тканей и крови, их способность вырабатывать при необходимости активные формы кислорода (выполнять свою защитную функцию) является важным показателем стимулированной ХЛ. Способность усиливать про образовании в организме очагов воспаления. ХЛ-ответы и активность фагоцитов снижаются при продолжительном недостатке кислорода, связанном с общим ослаблением организма[4].

Уровень ХЛ при фагоцитозе определяет интенсивность "респираторного взрыва" в клетках с продукцией активных форм кислорода, выражающих бактерицидное действие. Первичными метаболитами активированного кислорода являются синглетный кислород (1O2), супероксидный анион-радикал (O2•), гидроксильный радикал (OH•), перекись водорода (H2O2). В качестве основных вторичных метаболитов необходимо отметить гипохлорную кислоту (HOCl), хлорамины и продукты перекисного окисления липидов. Взаимодействие первичных и вторичных оксидантов с высоким энергетическим потенциалом образуют динамический спектр молекул, которые прямо или косвенно включаются в реакции фагоцитов. При этом, Взаимодействие люминесцирующих посредников (люцигенин, люминол и др.) с высокоэнергетическими оксидантами служит источником перехода в электронно-возбужденное состояние, выход из которого сопровождается испусканием кванта света. Регистрация светоизлучения ХЛ реакции производится на хемилюминометрах отечественного или зарубежного производства.

Виды хемилюминесценции:

– Спонтанная - свечение, возникающее без вмешательства извне

1)Митогенетические (190-320 нм)

2)Метаболическое (360-1200нм)

3)Физиологическое свечение (400-700 нм)

–Индуцированная возникает при воздействии различных факторов

1)Фотохемилюминесценция

2)Радиолюминесценция

3)Электролюминесценция

4)Триболюминесценция

5)Термолюминесценция

Интенсивность ХЛ не зависит от реакционной способности радикалов, т.к. при увеличении реактивности радикалов одновременно и в той же мере снижается стационарная концентрация радикалов, их произведение остается постоянным, а вместе с тем не происходит и изменения интенсивности ХЛ. Иными словами, метод ХЛ регистрирует даже самые активные радикалы, концентрация которых в изучаемой системе может быть исчезающее мала, и в этом – его уникальность и преимущество перед другими методами обнаружения радикалов в химических и биологических системах.

Спонтанная хемилюминесценция (СХЛ) имеет два недостатка. Во-первых, из-за низкой интенсивности свечения измерение СХЛ требует не только применения весьма чувствительной, но и большого количество материала для анализа, что для биологии и медицины весьма нежелательно, а часто просто невозможно. Во-вторых, метод мало специфичен, т.к. за сверхслабое свечение в биологических объектах могут отвечать реакции многих активных частиц: радикалов и пероксидов [5].

Значительное распространение получило однако измерение хемилюминесценции в присутствии определенных соединений, получивших название активаторов ХЛ (по-английски, enhancers – усилителей). По механизму действия активаторы распадаются на две четко различающиеся группы, которые можно назвать химическими и физическими активаторами.

Химические активаторы ХЛ–это соединения, вступающие в реакции с АФК или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое

при этом свечение связано с переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов:

Активатор + радикалы → продукт* → продукт + фотон.

Хорошо известными представителями таких активаторов могут служить люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид3-аминофталевой кислоты) илюцигенин (динитрат 10,10'-диметил-9,9'-биакридиния) [6].

Физические активаторы не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но, тем не менее, многократно усиливают интенсивность ХЛ. В основе их действия лежит физический процесс переноса (миграции) энергиис молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор:

Радикалы → продукт* →продукт + фотон 1 (неактивированная *ХЛ*)

Продукт* + активатор →продукт + активатор* →*фотон 2* (активированная *ХЛ*)

Усиление свечения активатором происходит в том случае, есликвантовый выход излучательного перехода (люминесценции) во втором случае выше, чем в первом, при этом квантовый выход люминесценции активатора в идеале приближается к единице.

Люминол-зависимая хемилюминесценция (ЛХЛ) клеток. Измерение люминол-зависимой ХЛ клеток крови широко используется для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета. Появление и взаимодействие чужеродного материала с фагоцитирующей клеткой запускает сложный каскад физиологических иметаболических процессов, начало которого – взаимодействие рецепторов на поверхности клетки с разного рода лигандами, включая иммунные комплексы, а конец – образование супероксидных радикалов при переносе электрона с НАДФН на О2. Метаболизм этих радикалов, разрушение бактериальной клетки и запуск биосинтеза множества физиологически активных соединений в клетке-фагоците. ЛХЛ вызывается окислением люминола активными формами

кислорода и хлора и взаимодействием окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода [7].

В упрощенном виде процесс протекает в три этапа. Первая стадия – это окисление люминола каким-либо сильным оксидантом, например, радикалом или окисленной формой металла переменной валентности:

$$LH_2 \rightleftarrows H^+ + LH^- \xrightarrow[-RH]{+R\cdot} \cdot L^- \underset{-H^+}{\overset{+H^+}{\rightleftarrows}} \cdot LH. \qquad (1.1.1)$$

Образовавшийся оксильный радикал люминола может вступать в различные реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем R·, подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта InH:

$$\cdot LH + InH \rightarrow LH_2 + In\cdot. \qquad (1.1.2)$$

Второй и весьма важный этап в развитии ХЛ- реакции – появление ключевого гидропероксидного продукта (4-гидроперокси-1-окси-5-аминофталазин-4-олата), которое в биохимических системах обычно происходит при взаимодействии радикала люминола с супероксидом:

$$\cdot LH + \cdot OO^- \longrightarrow LOOH \underset{-H^+}{\overset{+H^+}{\rightleftarrows}} LHOOH. \qquad (1.1.3)$$

Собственно ХЛ-реакция начинается с превращения гидропероксида (LOOH) в соединение, содержащее эндопероксидную химическую группу (2,3-перокси-ди [гидроксиметиленил] фениламин):

$LHOOH^{-}$ →пергидрокислота→эндопероксид-N=NH→эндопероксид-H + N2↑. (1.1.4)

На заключительном этапе в эндопероксидной группе разрывается связь между атомами кислорода и образуется молекула монопротонированнойаминофталевой кислоты в электронно-возбужденном состоянии с последующим испусканием кванта света.

1.2 Биолюминесценция

Биолюминесценция – это свечение организмов, видимое простым глазом. Способностью к биолюминесценции обладают организмы, принадлежащие к самым разным систематическим группам: бактериям, грибам, моллюскам, насекомым. Механизм реакций, сопровождающийся свечением, различен у разных видов, однако обычно включает в себя окисление люциферина кислородом воздуха, катализируемое люциферазой [2].

Биолюминесценция – это хемилюминесцентная реакция, в которой химическая энергия превращается в световую. В ходе реакции субстрат (люциферин) окисляется под действием фермента (люциферазы). Люциферины и люциферазы у разных организмов химически различаются, однако все хемилюминесцентные реакции требуют молекулярного кислорода и протекают с образованием промежуточных комплексов – органических пероксидных соединений. При распаде этих комплексов высвобождается энергия, возбуждающая молекулы вещества, ответственного за светоизлучение.

От энергии светового кванта (фотона) зависит частота испускаемого света. Поскольку люциферины у животных разные, излучаемый свет варьирует от синего (у морских водорослей динофлагеллат) до зеленого (у медузы), желтого (у светляков) и красного (у личинки южно-американского жука Phrixothrix). Соответствующие этим цветам энергии фотонов составляют от 70 (для голубого света) до 40 (для красного) килокалорий (ккал) на 1 эйнштейн (6г1023 фотонов). Такая энергия, высвобождаемая одноактно, значительно

превышает энергию большинства биохимических реакций, например, распад высокоэнергетической молекулы аденозинтрифосфата (АТФ, 7 ккал).

Светящиеся (фотогенные) бактерии — одна из замечательных физиологических групп среди бактерий. Они — причина свечения, иначе фосфоресценции, мертвых обитателей морей рыб, раков, а иногда и живых. Все светящиеся бактерии содержат фермент биолюминесценции – люциферазу [8].

Установлено, что химическим свечением бактерий является ферментативное окисление восстановленного флавинмононуклеотида(FMN)H2, до флавинмононуклеотида (FMN) и длинноцепочечного альдегида до миристиновой кислоты кислородом воздуха [9].

Суммарное уравнение процесса может быть записано так:

$$FMNH_2 + RCHO + O_2 \rightarrow FMN + RCOOH + H_2O + h\nu \qquad (1.2.1)$$

Эта реакция протекает, по-видимому, через стадию образования пероксида флавинмононуклеотида:

$$ФМН\text{-}H_2 + E + O_2 \rightarrow E\text{-}ФМН\text{-}H_2\text{-}OOH \rightarrow RCOH\text{-}E\text{-}ФМН\text{-}H_2\text{-}OOH$$

$$RCOOH + E\text{-}ФМН\text{-}HOH^* \rightarrow RCOOH + E + ФМН + H_2O + фотон\ (490\ нм) \qquad (1.2.2)$$

Где E - люцифераза, OOH - гидроперекисная группа, RCOH - алифатический альдегид, RCOOH - жирная кислота, образующаяся при окислении альдегида [2].

Альдегидный субстрат – RCHO – подвержен медленному неферментативному окислению, и скорость окисления зависит от температуры и начальной концентрации. При комнатной температуре раствор альдегида, используемый для измерения биолюминесценции, стабилен в течение 8 ч. Неферментативное окисление альдегида в отличие от FMNH2 не оказывает влияния на ход люминесцентной реакции, поскольку его скорость значительно меньше скорости ферментативного окисления. Существует предположение, что

сродство альдегида к люциферазе обусловлено гидрофобными взаимодействиями между каждым участком алифатической цепи альдегида и гидрофобными группами фермента. Благодаря этому с увеличением длины углеродной цепи альдегид прочнее связывается с люциферазой. Это обеспечивает бóльшую эффективность превращения химической энергии в световую. Однако эту гипотезу нельзя считать всеобъемлющей, поскольку не для всех люцифераз соблюдается монотонная связь параметров биолюминесцентной реакции с длиной цепи альдегида. Специфичность люцифераз к альдегидам проявляется в том, что другие алифатические длинноцепочечные соединения (кетоны, кислоты, спирты) не обнаруживают с люциферазой биолюминесцентной активности, хотя не исключено, что они реагируют с ней без излучения [2].

Природным субстратом бактериальной люциферазы считается тетрадеканаль, поскольку в бактериях ферментативная система, восстанавливающая для нужд биолюминесценции карбоновую кислоту, имеет специфичность именно к миристиновой кислоте [9].

Ни один из исходных реагентов обсуждаемой реакции не может существовать в бактериальной клетке в свободном виде. Поэтому бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению FMN и карбоновой кислоты исключительно для нужд биолюминесценции. Считается, что восстановление FMN в бактериях происходит в реакции, катализируемой другим ферментом – NAD(P)H: FMN-оксидоредуктазой [9].

1.3 Характеристика бактерии *Staphylococcus*

Стафилококки (род *Staphylococcus*) Род *Staphylococcus* был открыт Пастером и Огстоном в 1880 г. Название *Staphylococcus* дал Огстон (*staphyle* - гроздь, *coccus* - зернышко, ягода), а описание рода - Розенбах. Род включает в себя более 32 видов, важными для человека является около 8 видов, классификация построена изучения фенотипических свойств и генотипических

признаков. Стафилококки - это грамположительные кокки, в чистой культуре характерно скопление в виде гроздьев винограда (свойственно деление в различных плоскостях), могут образовывать микрокапсулу, но не образуют спор. Растут на простых питательных средах (МПА - мясопептонный агар, МПБ - мясопептонный бульон), являются галофильными т.к. размножаются при высоких концентрациях NaCl (10 - 15%), используется при изготовлении элективной среды ЖСА - желточно-солевого агара.

Стафилококки чувствительны к красителям (бриллиантовому зеленому, кристаллическому фиолетовому) [10].

Стафилококки продуцируют каталазу, что защищает от вредного воздействия производных кислорода. Синтезируют каротиноидные пигменты (определяют белый, золотистый и другие цвета колоний), которые также защищают от оксидантов. Стафилококки устойчивы к антибиотикам: тетрациклинам, р-лактамам, хлорамфениколу, эритромицину, и др. Антибиотикорезистентнось контролируется R-плазмидами или хромосомными мутациями.

К главным группам факторов патогенности относятся: белок А, адгезины, секретируемые вещества, медиаторы межмикробного взаимодействия, микрокапсула. Тейхоевые кислоты отвечают за адгезию к эпителиальным клеткам, адгезины - за прикрепляемость к веществам и клеткам организма. У золотистого стафилококка обнаружены белки-адгезины, которые взаимодействуют с протеинами такими как муцином, лектинами, фибронектином и другими[10].

Существуют разнообразные пути передачи стафилококка: артифициальный (через нестерильные медицинские инструменты) фекально-оральный (пищевой), аэрогенный (воздушно - пылевой, воздушно-капельный,) и др. Восприимчивость к стафилококкам высокая, так как поражаются больные с иммунодефицитом, вызванным разными причинами (травма, операция, сахарный диабет и т.д.).

Также не меньшую опасность представляет эндогенная инфекция вызванная стафилококками — представителями собственной нормальной микрофлоры. Аутоштаммы увеличивают свою вирулентность и вызывают патологический процесс как в исходном биотопе, так и в других биотопах организма за счет миграции и транслокации при уменьшении иммунного статуса организма [11].Патогенные стафилококки обычно вызывают гемолиз эритроцитов и коагулируют плазму. По наличию коагулазы все стафилококки разделяют на две группы: среди патогенных видов коагулазо положителен лишь *Staphylococcus aureus*; остальные виды называют коагулазо отрицательными. Одни стафилококки являются представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека, другие вызывают гнойные процессы, образование абсцессов, различные пиогенные инфекции и даже сепсис с летальным исходом.

Продуцируемый некоторыми стафилококками энтеротоксин обусловливает возникновение пищевых отравлений. У стафилококков легко развивается резистентность ко многим противомикробным препаратам, что создает большие трудности при лечении больных [12].

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*).

Золотистый стафилококк является первым микроорганизмом, у которого обнаружена устойчивость к антибиотикам. Со стафилококка началась история изучения пенициллиназы — первой в ряду а β - лактамаз и т.д.

Выработка антибиотикорезистентности у золотистого стафилококка. Поскольку развитие и широкое клиническое применение пенициллина в начале 1940 года отмечен началом «эры антибиотиков», сообщения о штаммах золотистого стафилококка и их устойчивостью к пенициллину в 1942 отмечен началом нашей критической, непрекращающейся борьбе против антибиотика сопротивлением.

Резистентные к пенициллину стафилококки, составляют почти 80 % клинически важныхизолятов. Резистентность к пенициллину обусловлена выработкой пенициллиназы, не действует на полусинтетические пенициллины

(оксациллин и метициллин), а также на карбапенемы и цефалоспорины, но разрушает амино - и уреидо-пенициллины. Синтез пенициллиназы индуцируется β - лактамными антибиотиками[13].

Резистентность стафилококков к метициллину может быть обусловлена тремя основными механизмами:

– продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) - ПСБ-2а (фермента, участвующего в синтезе клеточной стенки), кодируемого хромосомальным геном "mecA" -классическая или истинная резистентность к метициллину (оксациллину);

– инактивацию вследствие гиперпродукции бета-лактамаз;

– модификацию нормальных ПСБ.

Факторами патогенности возбудителя (*S. aureus*) являются микрокапсула, компоненты клеточной стенки, ферменты и токсические субстанции:

– Микрокапсула защищает бактерии от комплемент-опосредованного поглощения полиморфно-ядерными фагоцитами, способствует адгезии микроорганизмов и их распространению по тканям. При культивировании в условиях invitro обычно не образуется.

– Компоненты клеточной стенки стимулируют развитие воспалительных реакций – усиливают синтез ИЛ-1 макрофагами, активируют систему комплемента и являются мощными хемоаттрактантами для нейтрофилов. Тейховые кислоты запускают комплементарный каскад по альтернативному пути, активируют свертывающую и калликреин-кининовую системы, а также облегчают адгезию к эпителиальным поверхностям. Белок А (агглютиноген А) неспецифически связывает Fc-фрагменты молекул IgG (что активирует компоненты комплемента по классическому и альтернативному пути) и усиливает активность естественных киллеров. Активация комплемента приводит к проявлению различных местных и системных реакций, например анафилаксии, феномена Артюса, угнетению активности фагоцитов и т.д.

– Ферменты проявляют разнонаправленное действие: каталаза защищает бактерии от действия O2-зависимых микробицидных механизмов фагоцитов;

бета-лактамаза разрушает молекулы бета-лактамных антибиотиков; липазы облегчают адгезию и проникновение в ткани. Коагулаза, существующая в трех антигенных формах, вызывает свертывание сыворотки; сам фермент не взаимодействует с фибриногеном, а образует тромбиноподобное вещество, предположительно взаимодействующее с протромбином.

– Гемолизины. Выделяют четыре антигенных типа гемолизинов, вызывающих полный гемолиз кровяных сред.

1) Альфа-гемолизин (альфа-токсин) наиболее часто выявляют у бактерий, выделенных из клинических образцов; неактивен в отношении эритроцитов человека, но быстро лизирует эритроциты барана. При введении подопытным животным вызывает кожные некротические реакции и гибель животных после внутривенного введения.

2) Бета-гемолизин (сфингомиелиназа) оказывает умеренное действие на эритроциты человека; выявляют у 20% изолятов. Проявляет выраженные свойства холодового гемолиза (максимальная активность проявляется при низкихтемпературах).

3) Гамма-гемолизин – двухкомпонентный гемолизин с умеренной активностью в отношении эритроцитов человека; поскольку один из компонентов инактивирует содержащие серу полимеры, присутствующие в агаре, то эффект этого гемолизина на кровяных средах обычно не проявляется.

4) Дельта-гемолизин – агрегат низкомолекулярных соединений, проявляющих детергентные свойства; последние обусловливают цитотоксичность широкого спектра.

– Токсины. Наибольшее значение имеют: эксфолиатины А и В, обусловливающие развитие синдрома "ошпаренной кожи"; токсин синдрома токсического шока (TSST-1), ответственный за развитие специфического симптомокомплекса (предположительно за счет стимулирования выделения фактора некроза опухолей); дельта-токсин (лейкоцидин), ингибирующий всасывание воды и активирующий образование цАМФ (что имеет значение при стафилококковых диареях), а также оказывающий цитотоксическое действие на

полиморфноядерные лейкоциты; энтеротоксины A–F, ответственные за развитие пищевых интоксикаций [13].

1.4 Характеристика нейтрофильных гранулоцитов

Лейкоциты, или белые кровяные клетки, периферической крови человека и позвоночных разнородны по функциональным и морфологическим показателям.

Лейкоциты подразделяют на две большие группы: незернистые лейкоциты (агранулоциты) и зернистые лейкоциты (или гранулоциты). Для зернистых лейкоцитов характерно наличие в цитоплазме сегментированных ядер и специфической зернистости. Для незернистых лейкоцитов характерно отсутствие цитоплазме сегментированных ядер и специфической зернистости. Подразделяются на моноциты и лимфоциты, имеющие разные по фенотипические свойства, генотипические признаки и биологическую роль.

Нейтрофильные гранулоциты имеют сферическую форму. Нейтрофильных гранулоцитов больше, чем других лейкоцитов содержание в крови взрослого человека достигается 65—75% от общего числа лейкоцитов, 3-5% нейтрофилов содержат ядро. Юные формы нейтрофилов имеют бобовидное ядро и в периферической крови содержится около 0-0,5%[14].

Ядра нейтрофилов содержат плотный хроматин, имеют сегментированное ядро, состоящие из 2-3 долек, соединенных тонкими перемычками.

Нейтрофильные гранулоциты различают два основных типа зернистости в зависимости от химического состава и строения на азурофильную (первичные гранулы) и специфическую (вторичные гранулы). Специфическая зернистость превышает 80% всех гранул. В ней выявляется щелочная мурамидаза, цитохромоксидаза, аминопептидаза, фосфатаза, пероксидаза, а также липиды, гликоген и др. Общее количество азурофильных гранул составляет 10-20%, они представляют собой лизосомы с характерным набором гидролитических ферментов[15].

Нейтрофилы обладают высокой фагоцитарной способностью и подвижностью, способны к хемотаксису. Они поглащают бактерии и другие частицы, которые перевариваются под действием гидролитических ферментов. Жизненный цикл нейтрофилов достигает до 8 сут. В 8-12 ч находятся кровеносном русле, а затем выходят в соединительную ткань, где выполняют свои функции [16].

Длительность пребывания нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови составляет приблизительно 6-8 ч, это объясняет их высокую производительность - 2.5 биллиона клеток в час. Нейтрофилы, как и другие лейкоциты образуются из общей полипотентной стволовой клетки в костном мозгу.

Время дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов от клетки-предшественника до зрелой клетки в зависимости от степени активности процесса составляет от 7 до 10 дней [17].

Формирование нейтрофилов в костном мозгу связано с динамикой морфологических изменений клеток: появление специфической нейтрофильной зернистости, концентрация его у оболочки клетки и конденсация хроматина, исчезновение ядрышек, утрата базофилии цитоплазмы, сегментация ядра, постепенное уменьшение размеров ядра с увеличением доли цитоплазмы.

Для процесса созревания нейтрофильный гранулоцитов необходимо регуляция основных условий: дифференцировка этих клеток в зрелые под воздействием различных факторов роста и поддержание достаточного количества стволовых клеток [18].

Характерным признаком нейтрофилов является активное перемещение. Чувствителен к действию различных модуляторов миграционной функции и движение нейтрофильных гранулоцитов намного быстрее других лейкоцитов. Нейтрофил при спонтанной миграции двигается беспорядочно, периодически меняя вектор движения. Псевдоподии выбрасываемые клеткой иногда не совпадают с осью уже начавшегося перемещения вызывают отклонение миграционного маршрута. Сократительные белки, подобные, но не идентичные

миозину и актину мышечных клеток, являются структурной миграционой функцией. Собраны в микрофиламенты, которые соединяют при активации с образованием сократительных волокон, двигательного аппарата нейтрофила и располагаются по клеточной периферии.

Хемотаксис отражает способность клетки двигаться в сторону нахождения стимулирующих веществ, именуемых хемоаттрактантов или хемо(цито)токсинами. Направление движения определяется градиентом концентрации хемоаттрактантов. Хемотаксис является предстадией фагоцитоза, поскольку он необходим для сближения нейтрофила с фагоцитируемым объектом [19].

Разрушение, проникших в организм инфекционных частиц - функция зрелых нейтрофилов. Осуществляя ее они тесно взаимодействуют с макрофагами, Т- и В-лимфоцитами. Нейтрофилы секретируют вещества, способствуют регенерации тканей, секретируя стимулирующие регенерацию вещества, удаляя из них поврежденные клетки, обладающие бактерицидными эффектами.

Часть нейтрофильных гранул, дают положительную окраску на фермент миелопероксидазу, представлены лизосомами, включающими многочисленные энзимы: катионные белки, нарушающие рост микроорганизмов и дыхание; лизоцим, разрушающий стенку бактерий; кислые гидролазы и нейтрофильные протеазы, позволяющие нейтрофилам легко усваивать фагоцитированные частицы [20].

Нейтрофилы осуществляют свои функции, благодаря способности быстро мигрировать и собираться в поврежденном и инфицированном участках организма, фагоцитировать, т.е. поглощать и разрушать в фагоцитарных вакуолях внутри клетки захватывать бактерии и поврежденные клетки. Хорошо развитый аппарат движения связана со способностью миграции.

Появлением в тканях вазоактивных и хемотаксических факторов характеризует выбор направления движения инфицированным и воспаленным тканям. Вазоактивные факторы увеличивают проницаемость капилляров, что

содействует миграции нейтрофилов в ткань. Хемотаксические факторы образуют лигандрецепторный комплекс взаимодействия с рецепторами на поверхности нейтрофильных гранулоцитов, определяющий движение нейтрофилов к пораженному участку. Лейкотриены обладают сильным хемотаксическим эффектом, производные метаболизма арахидоновой кислоты в мембране клеток. Они секретируются активированными макрофагами и Т-лимфоцитами после влияния на них бактериальных веществ. Эндотоксины также секретируют хемоатрактанты. Основными хемотаксическими факторами являются продукты активации комплемента — фрагменты его молекул С2а и С5а. Некоторые из этих факторов, особенно С, функционируют как опсонины, т.е. вещества, содействуют фагоцитозу бактерий [21].

Реакций, в которых участвуют нейтрофилы, совершается в тканях. Поэтому адгезивность, характеризующая способность клеток задерживаться и прикрепляться на определенных субстратах, имеет особое значение при оценке функционального потенциала нейтрофильного гранулоцита [22].

Нейтрофильные гранулоциты способны осуществлять киллинг микроорганизмов с помощью двух принципиально различных механизмов: кислородозависимого и кислороднезависимого.

К кислородзависимому пути относят «респираторный взрыв», который формируются при взаимодействии нейтрофилов с объектами фагоцитоза. Кислородзависимый механизм не является системой жизнеобеспечения нейтрофила, который хорошо переносит гипоксию и нормально выполняет ряд функций (например, поглощение) в условиях анаэробиоза. «Респираторный взрыв» относится к ряду метаболических процессов, имеющих место при воздействии нейтрофилов: увеличение потребления кислорода и усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле (ПФП), и как результат этого – продукция активных форм кислорода, обеспечивающих цитотоксический эффект и обладающих бактерицидным действием. На регистрацию интенсивности «респираторного взрыва» основаны многие клинико-

диагностические методы оценки состояния организма, в частности и хемилюминесцентный анализ[23].

Кислороднезависимые механизмы. Оптимальные условия для функционирования семейства катионных белков происходит при потребление ионов водорода и повышение pH при дисмутации супероксидного аниона. Эти белки, имеют высокую изоэлектрическую точку, разрушают бактериальную стенку за счет протеиназного эффекта и присоединения к поверхности микроорганизма. Низкие значения pH, образовывающийся после образования фагосомы с лизосомами, лактоферрин и лизоцим представляют собой кислороднезависимые бактериостатические и бактерицидные факторы, которые могут действовать в анаэробных условиях. Расщепление убитых микроорганизмов происходит гидролитическими ферментами, и продукты деградации освобождаются из фагоцитарной клетки.

Различные формы реактивности фагоцитов обеспечиваются и проявляются нередко независимо друг от друга [24].

1.5 Характеристика моноцитов

Лейкоциты, или белые кровяные клетки, периферической крови человека и позвоночных разнородны по функциональным и морфологическим показателям.

Лейкоциты подразделяют на две большие группы: незернистые лейкоциты (агранулоциты) и зернистые лейкоциты (или гранулоциты). Для зернистых лейкоцитов характерно наличие в цитоплазме сегментированных ядер и специфической зернистости. Для незернистых лейкоцитов характерно отсутствие цитоплазме сегментированных ядер и специфической зернистости. Подразделяются на моноциты и лимфоциты, имеющие разные по фенотипические свойства, генотипические признаки и биологическую роль [14].

Моноциты – долгоживущие и наиболее крупные клетки крови размером 9-15 мкм относящиеся группе агранулоцитов, с ядром бобовидной формы и

тонкой структурой хроматина. Моноциты составляют от 3 до 11 % всех лейкоцитов, способны к амебовидному движению, проявляют выраженную фагоцитарную и бактерицидную активность. Фагоцитарный индекс моноцитов примерно в 3 раза выше, чем у нейтрофилов.

Моноцит – наиболее активный фагоцит периферической крови. Моноциты появляются в очаге воспаления после нейтрофилов и проявляют максимум активности в кислой среде, в которой нейтрофилы теряют свою активность, и как правило не погибают после фагоцитирования (возможна гибель моноцитов при наличии у фагоцитированного материала каких-либо цитотоксических для моноцита свойств). Этим они отличаются от нейтрофилов и эозинофилов, способных поглощать лишь относительно небольшие частицы и как правило погибающих после фагоцитирования. Моноциты и макрофаги представляют стадии развития миелоидных клеток. Они образуют мононуклеарнуюфагоцитирующую систему. Роль макрофагов в качестве одних из основных фагоцитирующих клеток установлена в 1882 г. И.И. Мечниковым, давшим этим клеткам их название. В 20-е гг. XX века Л. Ашоф (L.Aschoff) создал учение о ретикуло-эндотелиальной системе- защитной системе, объединяющей тканевые фагоцитирующие клетки. Позже для обозначения практически той же системы стали использовать термин «мононуклеарнаяфагоцитирующая система» [25].

Циркулирующий вариант клеток-моноцит, тканевый- макрофаг. Превращение моноцита в макрофаг происходит под влиянием тканевого микроокружения и сопровождается экспрессией новых генов, т.е. может рассматриваться как дифференцировка клеток. Эту дифференцировку регулирует M-CSF. Моноциты представляют довольно крупные клетки (диаметром 9-15 мкм) с ядром бобовидной формы и тонкой структурой хроматина. Макрофаги значительно крупнее моноцитов (диаметр составляет 20-25 мкм) и имеют распластанную форму. В отличие от округлых моноцитов, макрофаги имеют неправильные очертания и морфологически полиморфны.

Миграция моноцитов в ткани сопровождается их превращением в разнообразные формы макрофагов и дендритных клеток. Выделяют две основные разновидности макрофагов-резидентные и воспалительные. Резидентные макрофаги возникают в результате спонтанной («плановой») миграции моноцитов из кровотока в ткани, не связанной с воспалением, тогда как воспалительные макрофаги образуются в процессе экстренной миграции в очаги воспаления. Превращение в макрофаги сопровождается увеличением размера и формыклеток (обусловлены перестройкой цитоскелета), изменением экспрессии некоторых мембранных молекул (ослабевает экспрессия CD13, CD14, CD15,β1-интегринов, FcγRI, усиливается экспрессия CD16). Это сказывается на ответе клеток на внешние стимулы. Воспалительные макрофаги обладают высокой фагоцитарной и бактерицидной активностью, выделяют ряд цитокинов и других гуморальных веществ, важных для формирования воспаления и реализации иммунной защиты. Эти свойства позволяют воспалительным макрофагам играть роль эффекторных клеток воспаления и врожденного иммунитета. Резидентные макрофаги выполняют преимущественно гомеостатические и регуляторные функции, участвуя в разрушении старых клеток и регуляции иммунных и воспалительных процессов, а также выступают в роли АПК. Резидентные макрофаги обладают более длительным сроком жизни (годы по сравнению с неделями для воспалительных макрофагов).

Воспалительные и резидентные моноциты мигрируют из кровотока в ткани по-разному, поскольку в первом случае решающая роль принадлежит гуморальным факторам и молекулам адгезии, индуцируемым в процессе воспаления, а во втором — невоспалительным гомеостатическим факторам. В качестве хемокина для резидентных макрофагов выступает фракталкин (CX3CLl). Рецепторы для этого хемокина (CX3CR1) экспрессированы в большом количестве преимущественно на CD14+CD16+ моноцитах, при миграции в ткани становящихся резидентными макрофагами. CD14hiCD16 моноциты слабо экспрессируют этот рецептор, но несут рецептор CCR2 для

провоспалительных хемокинов преимущественно группы MCP (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16). В связи с этим CD14hiCD16 клетки обладают способностью мигрировать в очаги воспаления и превращаться в воспалительные макрофаги. Наличие рецептора CCR2 — очень важное свойство CD14hiCD16 клеток, поэтому эту субпопуляцию моноцитов иногда обозначают как CD14hiCCR2+. Эти клетки экспрессируют еще несколько хемокиновых рецепторов, отсутствующих у предшественников резидентных макрофагов: CCR1, CCR4, CCR7, CXCR1, CXCR2. Эти рецепторы распознают практически все провоспалительные и часть гомеостатических цитокинов. В свою очередь, предшественники резидентных макрофагов, помимо рецептора для фракталкина, несут еще несколько хемокиновых рецепторов, отсутствующих или слабо экспрессированных на воспалительных моноцитах — CCR5 и CXCR4 (отметим, что эти рецепторы служат корецепторами для ВИЧ и, следовательно, способствуют инфицированию этим вирусом макрофагов) [26].

Популяции моноцитов различаются не только по экспрессии CD14 и CD16, но и существенно отличаются друг от друга по своим функциональным свойствам, к числу которых отпросятся профиль синтезируемых цитокинов и хемокинов, способность к фагоцитозу, а также синтезу и секреции активных форм кислорода и оксида азота [27]. В связи с этим функциональные особенности моноцитов могут также оцениваться и по уровню «респираторного взрыва», который характеризуется хемилюминесцентной активностью клеток при их взаимодействии с объектами фагоцитоза [28]. Обсуждается значение синтеза ряда активных форм кислорода в системе внешнего киллинга. Циркулирующие моноциты можно разделять по фенотипическим характеристикам как минимум на две популяции, различающиеся по уровням экспрессии поверхностных молекул – компонента рецепторного комплекса для бактериального липопосахарида CD14 и высоко аффинного рецептора Fcγ CD16. Клетки, несущей на своей поверхности только CD14, принято называть «классическими моноцитами», так как в норме они составляют до 95% от

общего числа циркулирующих моноцитов. Тогда как моноциты, обладающие фенотипом CD14+CD16+, определяются как «неклассические» или «провоспалительные» [29].

1.6 Фагоцитоз

И. И. Мечников первым открыл защитную функцию макрофагов за это получил Нобелевскую премию открыв явление фагоцитоза. Наиболее древней филогенетически иммунной реакцией является фагоцитоз. Фагоцитоз - первый ответ иммунной системы на проникновение чужеродных антигенов, которые могут проникать в организм в виде вирусных частиц или бактериальных клеток, а также в составе высокомолекулярных полисахаридов или белков.

В процессе фагоцитоза клетки захватывают и переваривают твёрдые частицы. Фагоцитоз – один из видов эндоцитоза. У некоторых клеток он используется для получения полезных веществ, и для одноклеточных организмов подобен питанию. У многоклеточных организмов фагоцитоз выполняет функцию удаления отходов и патогенов.

Моноциты и макрофаги — древние клетки иммунной системы. Моноциты - циркулирующие в периферической крови предшественники макрофагов, функции которых разнообразны и не исчерпываются потребностями иммунной защиты организма.

Пищеварительная функция – основное эволюционное формирование фагоцитоза как иммунологического феномена. Предковые одноклеточные организмы поедают и переваривают чужеродные частицы внешней среды с целью питания. Такой тип питания сохранился у современных губок, кишечнополостных и протозоа. Прокариоты, среди которых встречается много патогенных микроорганизмов и неструктурированные вещества являлись источником питания [30]. Фагоцитарная функция макрофагов-амебоцитов сохранилась в эволюции от одноклеточных до высших многоклеточных, включая млекопитающих, несмотря на усовершенствование в филогенезе

механизмов иммунной защиты. Механизм фагоцитоза включает 8 последовательных фаз (Таблица 1).

Таблица 1– Стадии фагоцитоза

Стадия	Событие	Факторы клетки-мишени	Факторы фагоцита
Хемотаксис	Направленное движение фагоцита к объекту	Хемотаксины: бактериальные, C5a, C3a, хемокины, лейкотриены и др.	Рецепторы хемотаксических факторов, цитоскелет
Адгезия	Установление контакта (прилипание фагоцита к объекту)	Опсонины (антитела, C3b, фибронектин), молекулы адгезии	Молекулы адгезии (интегрины и др.), рецепторы (FcγR, C3R и др.)
Активация мембраны	Подготовка к поглощению	Интегрины, опсонины, защитные факторы микроорганизмов	Белки G, Ca2+, сигнальные факторы, киназы, цитоскелет
Погружение	Обволакивание объекта	Защитные факторы, препятствующие фагоцитозу	Цитоскелет (микрофиламенты)
Образование фагосомы	Замыкание мембраны и погружение	Не установлены	Цитоскелет (микротрубочки, микрофиламенты), мембрана
Образование фаголизосомы	Слияние фагосомы и лизосомы	Блокирующие агенты (подавляют слияние)	То же
Киллинг и переваривание	Гибель объекта и его переваривание	Факторы устойчивости	O2- и NO-зависимые факторы, катионные белки, пептиды, ферменты, закисление
Выброс продуктов деградации	Выброс содержимого фаголизосомы из клетки	Не установлены	Цитоскелет, мембрана

Инициатором процесса служит образование на поверхности клетки комплекса антиген-антитело. Опсонизация обеспечивается присутствием небольшого количества в организме молекул антител («нормальные антитела»). Антитела, находящиеся на поверхности чужеродной клетки, присоединяют к ним белков системы комплекса и стимулируют активацию. Образующаяся система действует как промотор следующих стадий фагоцитоза, стимулирует прямо или через посредство других клеток образование веществ, усиливающих эффект опсонизации чужеродной клетки.

Хемотаксис. Чужеродные клетки (неопсонизированные или опсонизированные) отправляют хемотаксические сигналы в окружающую среду, фагоцит начинает двигаться в этом направлении. Целый ряд веществ, также продукты метаболизма микроорганизмов рассматривается в качестве хемотаксических факторов. Комплекс антитело-антиген является начальным фактором, высокую специфичность суммарного хемотаксического сигнала. Фагоцитирующие элементы первыми приходят на сигнал, которые, возбуждая другие иммунокомпетентные клетки, активируют их к выработке медиаторов, повышающий хемотаксис. Далее хемотаксический потенциал увеличивается за счет новообразовавшихся антител, формирования комплексов антитело-антиген, а также ряда факторов, образующихся при разрушении макрофагами тканей и сосудов в воспалительном очаге. Сохранение в нем активной работы за счет поступления новых порций иммунокомпетентных клеток гарантируют хемотаксические сигналы второго порядка (образованного очага воспаления). Макрофаг, достигнув очага воспаления, останавливается под влиянием фактора торможения миграции лейкоцитов, вырабатываемого Т—лимфоцитами—хелперами. Исчезновение в очаге воспаления чужеродных антигенов, начало процессов регенерации ведет к быстрому уменьшению появлению продуктов и хемотаксического стимула, представляющих собой отрицательный хемотаксический сигнал. Оставшиеся жизнеспособные фагоциты рассеиваются по всей ткани, а новообразовавшихся фагоциты перестают мигрировать в воспалительный очаг [31].

Адгезия. Процесс адгезии включает две фазы: узнавание чужеродного (специфический процесс) и собственно адгезию или присоединение (неспецифический процесс). При отсутствии предварительного узнавания чужеродных клеток адгезия фагоцитирующей клетки к объекту фагоцитоза происходит крайне медленно.

Захват (собственно фагоцитоз). Специфические компоненты иммунной системы выполняют огромную роль в осуществлении захвата фагоцитоза. Захват неопсонизированных частиц идет медленно, причем часть из них не фагоцитируется. Иммуноглобулины - сильные опсонины. Плазматическая мембрана макрофага при помощи сформированных ею выпуклых складок захватывает объект и затягивает его. Фагосомой называется сформировавшаяся маленькая вакуоль. Далее фагосома отрывается от поверхности мембраны и перемещается в цитоплазму.

Киллинг (убийство). Процесс киллинга осуществляется в фагосоме, когда захваченная чужеродная клетка погибает. Для выполнения киллинга макрофаг секретирует и продуцирует в фагосому реакционноспособные производные кислорода [32].

Переваривание. Переваривание убитого и захваченного материала - последний этап фагоцитоза. Фагосома, содержит объект фагоцитоза, соединяется лизосомы. В состав лизосомы входит более 25 различных ферментов (большое количество гидролитических энзимов). В фагосоме происходит метаболический взрыв (активация всех ферментов), в результате этого фагоцитируемая частица переваривается. Антигенная активность существенно возрастает потому что часть молекул антигена при этом разрушается не полностью. Огромную роль для индукции лимфоцитами специфического иммунного ответа - фагосома с остаточным антигеном выбрасывается на поверхность клетки, освобождая иммуногенный антиген[33].

Характеризуя кислороднезависимый механизм реализации антимикробной реактивности моноцитов, следует отметить цитоплазматические гранулы, которые содержат дополнительные

антимикробные агенты, которые действуют в фаголизосомах без присутствия кислорода. В настоящее время хорошо охарактеризованы три компонента гранул: B/PI (бактерицидный/повышающий проницаемость белок), CLCP (химотрипсиноподобный катионный белок; катепсин-G) и дефенсины.

B/PI – белок азурофильных гранул, обладающий бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Причиной потери жизнеспособности бактерий является повышение их проницаемости путем деградации пептидогликанов и фосфолипидов. Избирательность по отношению к грамотрицательным бактериям определяется взаимодействием с ЛПС. CLCP – также содержится в азурофильных гранулах, включает в себя три катионных белка с перекрестной иммунологической реактивностью, которые in vitro обладают антибактериальной и химотрипсиновой активностями. Дефенсины – это группа низкомолекулярных пептидов, богатых цистеином. Эти пептиды проявляют активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов. Дефенсины нейтрофилов человека подвергают киллингу только метаболически активные бактерии и индуцируют потерю целостности их внешней и внутренней мембран.

Кислородзависимый путь – «респираторный взрыв», который относится к серии метаболических процессов, имеющих место при стимуляции фагоцитоза, а именно: увеличение потребления кислорода и усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле (ПФП), и как результат этого – продукция активных форм кислорода, обладающих бактерицидным действием и обеспечивающих цитотоксический эффект. Именно на регистрации интенсивности «респираторного взрыва» основаны многие клинико-диагностические методы оценки состояния организма, в частности и хемилюминесцентный анализ. Катализирует респираторный взрыв мембраноассоциированная пиридиннуклеотидоксидаза за счет реакции окисления НАДФН, образующегося при окислении глюкозы, и восстановления молекулы кислорода до супероксидного аниона.

Первичными метаболитами активированного кислорода являются супероксидный анион-радикал (O2-), с которого берет начало весь каскад активных форм кислорода, перекись водорода (H2O2), гидроксильный радикал (OH-) и синглетный кислород (1O2). В качестве основных вторичных метаболитов можно выделить гипохлорную кислоту (HOCl-), хлорамины и продукты перекисного окисления липидов. Как первичные, так и вторичные оксиданты обладают мощным энергетическим потенциалом, а их взаимопревращения создают динамический спектр молекул, которые обеспечивают цитопатогенные эффекты моноцитов [34, 35].

«Респираторный взрыв» обычно сопутствует фагоцитозу. Однако усиление клеточного «дыхания» и повышение активности ПФП наблюдается и при взаимодействии с крупными объектами, недоступными эндоцитозу, а также при стимуляции растворимыми агентами. В этих случаях моноциты выделяет оксиданты во внеклеточную среду, где они выполняют такие же функции, как внутри фагосомы.

Именно свободными радикалами кислорода обеспечивается механизм бактерицидного действия моноцитам. Полагают, что токсический эффект активных форм кислорода связан с деградацией ими гиалуроновой кислоты, коллагена базальных мембран и экстрацеллюлярного матрикса. Нарушение образования этих соединений основной причиной утраты резистентности к бактериальной инфекции при хронической гранулематозной болезни. Кислородозависимый механизм киллинга играет ведущую роль в защите против инфекций, вызванных бактериями, что отчетливо показано на примере перекиси водорода, как дезинфицирующего средства. Следует отметить, что высокая фагоцитарная активность не всегда коррелирует с повышенным уровнем продукции активных форм кислорода, в то время как бактерицидная активность клеток тесно связана с количеством внутрифагосомных высокоэнергетических оксидантов. Моноциты не способны к образованию интермедиатов кислорода, при нарушении окислительного метаболизма.

Образование фагосомы начинается с взаимодействия специфических рецепторов фагоцитов с бактерией или комплексом антиген - антитело. Рецепторы, расположенные в тех участках плазматической мембраны, где локализован особый белок клатрин, "узнают" компоненты комплемента, олигосахариды на поверхности микроорганизмов или Fc области комплекса антиген - антител. Активация рецепторов, передающих сигнал в клетку с участием инозитолфосфатной системы, инициирует процессы, определяющие фагоцитарный ответ клетки. Он включает в себя формирование фагосомы, слияние её с лизосомой, образование фаголизосомы, активацию кислородзависимых бактерицидных механизмов уничтожения микробов и/или выработку клетками токсичного для микробов оксида азота, а также действие кислороднезависимых механизмов уничтожения микроорганизмов [36].

Взаимодействие микробной клетки с поверхностью фагоцита приводит к образованию на его мембране выростов - псевдоподий, окружающих микробную клетку. Фагосома, сформированная таким образом, вместе с захваченной бактерией погружается внутрь фагоцита. В цитозолефагосомы сливаются с первичными лизосомами, образуя фаголизосомы. Первичные лизосомы, образованные аппаратом Гольджи, содержат ряд заключённых в гранулы гидролаз, способных разрушать органические молекулы в кислой среде фаголизосом: протеиназы, фосфатазы, эстеразы, ДНК-азы, РНК-азы. Низкое значение pH внутри фагосом оказывает бактерицидное действие и создаёт оптимальную среду для активации лизосомальных гидролаз. В результате действия этих ферментов разрушаются полимерные молекулы микроорганизмов и образуются аминокислоты, моносахариды, нуклеотиды, которые поступают в цитозоль и могут использоваться клеткой. Большая часть мембранных компонентов и непереваренные субстраты локализуются в остаточных тельцах, которые путём экзоцитоза возвращаются на поверхность плазматической мембраны фагоцитов, при этом значительная часть мембранных компонентов может утилизироваться и в самой мембране.

Изучение метаболических каналов, которые выводят моноциты на «респираторный взрыв», сфокусировалось, вокруг механизмов, окисляющих и восстанавливающих НАДФ. Таким образом, превращения в системе НАДФН-НАДФ сопрягают два альтернативных механизма: аппарат окисления (его суммарно обозначают как НАДФН-оксидаза) и аппарат восстановления НАДФ – им служит ПФП, где попутно с другими задачами решается снабжение клетки молекулами НАДФН. Она структурно или функционально сопряжена с рецепторами, распознающими внешние сигналы, и активизируется при связывании лигандов на фоне общей перестройки мембран. Центральное место в фосфорилировании НАДФН-оксидазы принадлежит протеинкиназе С (ПК-С), которая активируется в системе Ca2+-фосфолипидзависимых реакций. Подключение ПК-С — не единственный способ инициации «респираторного взрыва» моноцитов. Примером служит стимуляция Ca2+-ионофорами, когда фосфорилирование НАДФН-оксидазы обеспечивается кальмодулином, активируемым потоком Ca2+ из внешней среды, либо из внутриклеточных резервов. Установлено, что моноциты могут не реагировать на прямую активацию ПК-С (латекс), но сохранять чувствительность к другим стимуляторам (опсонизированый зимозан), которые способны активировать НАДФН-оксидазу, минуя С-протеинкиназный комплекс. Иными словами, развитие метаболической перестройки моноцита находится под контролем нескольких механизмов, которые лишь частично стыкуются между собой, определяя возможность дифференцированного воздействия на кислородзависимые реакции через усиление либо ослабление различных медиаторных узлов клетки.

Некоторые грамположительные бактерии погибают в фагосомахмоноцитов под действием лизосомального фермента лизоцима, который гидролизует связи между содержащимися в клеточной стенке N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетил-D-глюкозамином и вызывает её разрушение.

Таким образом, огромное разнообразие микроорганизмов, атакующих клетки человека, определило многообразие бактерицидных механизмов, действующих как в аэробных, так и анаэробных условиях.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили моноциты, нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у здоровых людей (n=22), а также штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивых (MRSA) и чувствительных (MSSA) к действию метициллина.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Микробиологические методы:

2.2.1.1. Выделение штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*. Для взятия образцов патологического материала со слизистой оболочки носа, носоглотки раневого отделяемого, мокроты и бронхиального содержимого и транспортировки для дальнейших исследований, используются стерильные тумферы с коммерческой транспортной средой Эймса.

2.2.1.4. Определение антибиотикорезистентности штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*. Для выявления метициллинрезистентных штаммов S. aureus использовали метод скрининга на агаре. Для проведения скрининга использовали агар Мюллера-Хинтон, содержащий 4% NaCl и 6,0 мкг/мл оксациллина. Микробную взвесь готовили методом прямого суспендирования из нескольких однотипных изолированных колоний стафилококков. В стерильном физиологическом растворе и доводили до мутности 0,5 по Мак Фарланду (1,5×108 КОЕ/мл). Инокуляцию чашек с агаром проводили с помощью стерильного ватного тампона. Культуру наносили на ограниченную поверхность (диаметром 10-15 мм). Штаммы *S. aureus* инкубировали при температуре 35^0 С в течение полных 24 часов. После инкубации чашки просматривали. Появление видимого роста на месте нанесения культуры считали проявлением устойчивости данного штамма к метициллину. Исследование проводили при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера-Хинтон с 4% NaCl без метициллина (культуры наносили также, как на агар с метициллином).

2.2.2. Иммунологические методы

2.2.2.1 Выделение нейтрофильных гранулоцитов из периферической крови. Венозную кровь из локтевой вены забирали в пробирки с гепарином. Выделение лимфоцитов производили центрифугированием в 2-х градиентах плотности фиколл-верографина (□ = 1,077 г/см3 для выделения лимфоцитов, □ = 1,119 г/см3 для выделения нейтрофильных гранулоцитов) по методу A. Boyum (1968). При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определяли чистоту выхода нейтрофильных гранулоцитов, которая составляла не менее 97%.

2.2.2.2Выделение моноцитов из периферической крови. Цельную гепаринизированную кровь ставили в на 30 мин в термостат (37°С), для получения лейковзвеси. Затем лейковзвесь наслаивали на градиент плотности фиколл-урографина (ρ=1,077 г/см3) и центрифугировали при 400g 40 мин. Кольцо мононуклеарной фракции отбирали и дважды отмывали от фиколла центрифугированием в PBS при 400g 5 мин. Отмытые клетки мононуклеарной фракции подчитывали с использованием трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток, далее клетки разводили в среде RMPI-1640 с глутаматом до концентрации 5 млн./мл. заливали в культуральный флакон (на 25 см2) с вентилируемой пробкой (greinerbio-one, Германия) и инкубировали в CO2 инкубаторе (Sanyo, Япония) 70 мин. После чего надосадочную жидкость с не прикрепившимися клетками сливали, прикрепившиеся клетки (моноциты), отделяли от пластика инкубацией с раствором Версена в течении 20 мин. при температуре 4°С. Далее клетки отмывали от раствора Версена центрифугированием в среде RMPI-1640 с добавлением 100-200 мкл сыворотки. Отмытые клетки подчитывали с использованием трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток и разводили до концентрации 1 млн./мл.

2.2.2.3. Определение кислороднезависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus* с помощью проточной цитометрии. Функции фагоцитоза оценивали с помощью

резистентных и чувствительных штаммов бактерий меченых FITC на проточном цитометре FC500. Конъюгацию бактерий проводили следующим образом: смывы с твёрдых сред разводили бикарбонатным буфером pH=9,0 до концентрации 1млн/мл, затем в равном объёме добавляли FITC растворенный в ДМСО (1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течении 1 часа, и троекратно отмывали. К 50 мкл венозной гепаринизированной крови добавляли 10 мкл суспензии меченых бактерий и инкубировали 30 минут при температуре 37℃, затем отмывали и докрашивали моноклональными АТ к CD14, CD16 и CD45. Далее в течении 15минут проводили лизис эритроцитов раствором Versalise. Через 15 мин. определяли интенсивность свечения на проточномцитометре.

2.2.2.4. Определение кислородзависимого фагоцитоза моноцитов при воздействии устойчивых и чувствительных штаммов *Staphylococcus aureusc* помощью хемилюминесцентного метода. Исследование спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) моноцитов периферической крови проводили по методу DeSoleetal. (1983). Пробы включали 200 мкл лейкоцитарной взвеси (1 млн/мл), 20 мкл донорской сыворотки (AB(IV) (Rhl–)), 240 мкл раствора Хенкса (без фенолового красного) и 50 мкллюминола или 50 мкллюцигенина (100 мкг/мл, “Sigma”). Проба индуцированной ХЛ содержала 200 мкл раствора Хенкса и 40 мк лопсонизированного зимозана (2 мг/мл, “Sigma”) или живой бактериальной суспензии 106КОЕ/мл. Бактериальную суспензию готовили из суточной бактериальной культуры в концентрации 106 КОЕ/мл. Затем пробы помещали в хемилюминесцентный анализатор “CL3606M” (СКТБ «Наука», Красноярск) и в течение 90 мин оценивали спонтанную и индуцированную ХЛ реакцию. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), площадь кривой (S^2). Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной ХЛ к площади спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА), который определяли по формуле:

$ИА = S_{индуцированная}/S_{спонтанная}$, (2.2.2.4.1)

где$S_{индуцированная}$ – величина площади под кривой хемилюминесценции, индуцированной опсонизированнымзимозаном или живой бактериальной суспензией;

$S_{спонтанная}$– величина площади под кривой спонтанной хемилюминесценции.

2.3Биолюминесцентное определение активности дегидрогеназ

В данной работе использовался биолюминесцентный анализ [37]. Данным методом определяли активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), глицерол-3-фосфатдегидрогеназ (Г3ФДГ, КФ 1.1.1.8), малик-фермента (НАДФМДГ, КФ 1.1.1.40), НАД- и НАДН-зависимых реакций малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ, КФ 1.1.1.37), НАДФ- и НАДФН-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ, КФ 1.4.1.4), НАД- и НАДН-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ, КФ 1.4.1.2) НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41 и НАДФ-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2).

Биолюминесцентное определение активности дегидрогеназ клеток иммунной системы проводили по самостоятельно разработанной методике. В 600 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 200 мкл суспензии разрушенных клеток лимфоцитов или нейтрофильных гранулоцитов. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также pH среды для определяемых ферментов представлены в таблице 2 [37].

Необходимо отметить, что в инкубационную смесь для определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрации 2.15 и 1.3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДН-зависимых реакций НАДГДГ и НАДФН-

зависимых реакций НАДФГДГ дополнительно вносили NH_4Cl в концентрации 5.0 мМ.

Таблица 2 – Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах или нейтрофильных гранулоцитах крови биолюминесцентным методом

Фермент	**Субстрат – мМ**	**Кофактор – мМ**	**pH буфера**
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф - 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДН-ЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДН-МДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФН-ГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДН-ГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с pH 9,0 и 9,8 готовили на Трис-HCl буфере; с pH 7,0, 7,4 и 7,8 – на K^+,Na^+-фосфатном буфере.

После инкубации при 37°С в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)) или 5 минут (для реакции с окислением НАД(Ф)Н) 200 мкл инкубационной смеси добавляли в кювету биолюминометра

" БЛМ-8801 " (сконструированного в СКТБ «Наука», г. Красноярск), куда предварительно вносили 50 мкл ФМН в концентрации $1.5*10^{-5}$М, 10 мкл в ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза и 50 мкл 0.0005% альдегида C_{14} (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0.1 М K^+, Na^+ -фосфатном буфере с pH 7.0).

Измеряли уровень биолюминесценции и при помощи калибровочной кривой определяли концентрацию НАД(Ф)Н в пробе. Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из Photobacteriumleiognathi и оксидоредуктазы из Vibriofischeri в Институте биофизики СО РАН [37].

Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения тех или иных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, определялись показатели, условно названные «фоны ферментов». Определение фонов ферментов проводили в тех же условиях, что и вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер.

Для построения графика зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график) 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10^{-9}-10^{-4} М вносили в кюветы биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего проводилось измерение интенсивности биолюминесценции.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \times V \times 10^{-6}}{\mathrm{T}}, \qquad (2.3.1)$$

где Δ[C] - разница концентраций НАД(Ф)H_2 в пробах «фермент» и «фон фермента»;

V - объем пробы в миллилитрах;

T - время инкубации в минутах.

Активность НАД(Ф) зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где I E=1мкмоль/мин.

2.4 Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MSExcel 7,0 была сформирована база данных, статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., 2004). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Различия между показателями спонтанного и индуцированного уровней синтеза АФК в каждой обследуемой группе людей определяли по U критерию Вилкоксона.

ГЛАВА 3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были отобраны по 30 штаммов *Staphylococcus aureus* как устойчивых, так и чувствительных к метициллину. Метициллин- это β-лактамный антибиотик узкого спектра действия, относящийся к группе полусинтетических пенициллинов. Он обладает бактерицидным действием, разрушая клеточные стенки бактерий.

В работе был исследован метаболизм бактерий биолюминесцентным методом. Были определены ферменты НАДФ(Н)- зависимых дегидрогеназ в бактериях устойчивых к метициллину. Чувствительные бактерии служили контрольной группой.

Резистентные штаммы микроорганизмов возникают при изменении генома бактериальной клетки в результате спонтанных мутаций. Геномные изменения в клетке влекут за собой и перестройку метаболизма, что как раз было обнаружено при определении НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ у метициллинустойчивых штаммов золотистого стафилококка относительно чувствительных штаммов. Так, в метициллинустойчивых штаммах золотистого стафилококка повышается уровень глицерол-3-фосфатдегидрогеназы-фермента, который находится в цитоплазме, и занимает центральное положение в реакциях липидного обмена, активно участвует в катаболизм липидов и жирных кислот (Рисунок 1). При этом активность НАД-изоцитратдегидрогеназы, которая осуществляет лимитирующую реакцию в цикле трикарбоновых кислот (основной энергетический фермент Цикла Кребса) снижена у MRSA относительно MSSA. Таким образом, в метаболизме антибиотикорезистентных штаммов золотистого стафилококка повышены катаболические процессы при снижении энергетики клетки (Рисунок 2).

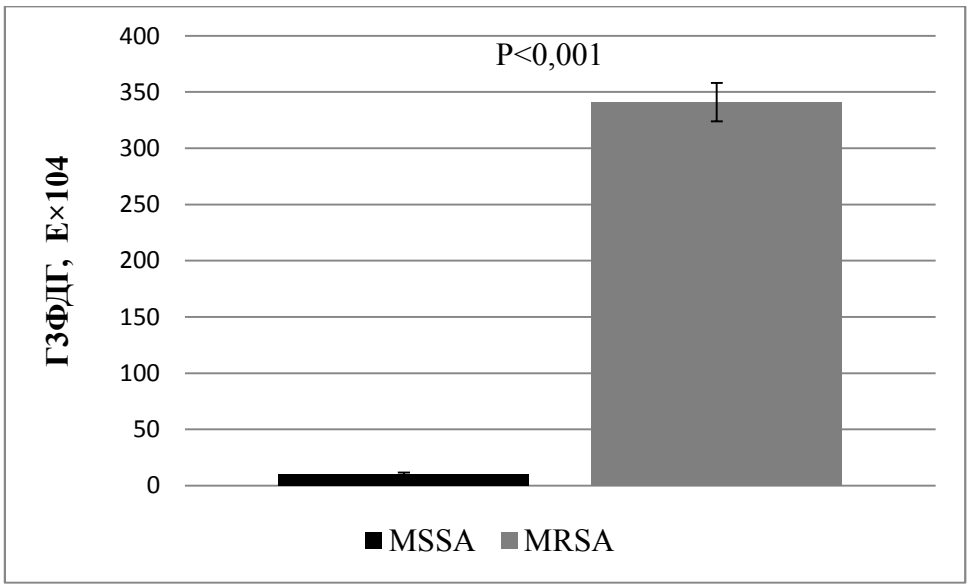

Рисунок 1 –Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы штаммов *Staphylococcus aureus*

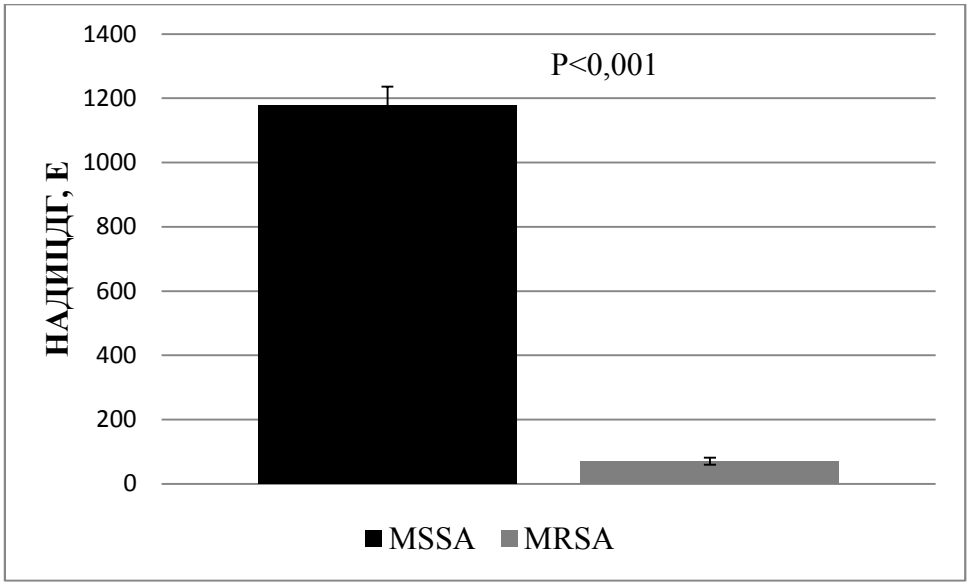

Рисунок 2 –Активность НАД-изоцитратдегидрогеназы штаммов *Staphylococcus aureus*

Исходя из ферментативных различий в метаболизме MRSA и MSSA, было интересно посмотреть реакцию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов на воздействие штаммов золотистого стафилококка в зависимости от устойчивости к метициллину.

Определение общего пула АФК выделяемого нейтрофилами и моноцитами включало в себя оценку базовой активности и определение резервных возможностей клеток при воздействии индукторов в виде живой

бактериальной суспензии *S.aureus* (MRSAиMSSA) с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции.

А также отдельно исследована способность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов к образованию супероксидного аниона (–О-2) с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции. В результате была определена активность кислородзависимых окислительных ферментативных систем нейтрофилов и моноцитов, активность которых определяется количеством выделенных АФК. Образование АФК зависит от функционирования сложного мультимолекулярного комплекса, объединенного общим названием НАДФН-оксидазной ферментативной системы и миелопероксидазного комплекса, который играет немаловажную роль в обезвреживании токсичных продуктов метаболизма и образовании ряда АФК [38].

Результаты исследования хемилюминесцентного ответа нейтрофильных гранулоцитов при воздействии штаммов MRSA и MSSAотражены в таблицах 3-4.

Таблица 3 – Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Спонтанная реакция	Индуцированная реакция	
		MSSA	MRSA
	N=35		
	1	2	3
Tmax (сек)	458 (178-1557)	797 (297-1586)	653 (247-1651)
Imax (о.е)	24851 (7520-46134)	23711,5 (5804-50716)	30067 (13112-73171) P_2<0,001
Smax×10^4 (о.е)	1392,9 (270,9-15580)	2419,5 (208,9-9862)	3083,3 (914,3-9526) P_2<0,001
ИА (о.е)	3,18 (1,56-21,02)	1,05 (0,64-1,59)	1,14 (0,74-3,63) P_2<0,001

Нейтрофильные гранулоциты усиливают продукцию активных форм кислорода в люминол-зависимой ХЛ при воздействии устойчивых штаммов

стафилококка (Таблица 3). При этом интенсивность люцигенин-зависимой ХЛ снижена. При исследовании люминол-зависимой ХЛ нейтрофильных гранулоцитов при воздействии устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных увеличивается площадь под кривой, интенсивность и ИА, при этом эти показатели снижаются в люцигенин-зависимом процессе (Таблица 4).

Таблица 4 –Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Спонтанная реакция	Индуцированная реакция	
		MSSA	MRSA
	N=29		
	1	2	3
Tmax (сек)	915 (402-1189)	1189 (455-1642)	956 (803-1283)
Imax (о.е)	11243 (325-36832)	10961 (399-15667)	4857 (521-11614) P_2<0,001
Smax×10^4 (о.е)	3596 (29,8-10360)	1781,1 (29,3-5188)	601,8 (39,9-3600)
ИА (о.е)	1,24 (0,39-7,47)	0,79 (0,18-1,05)	0,71 (1,11-1,14) P_2<0,001

Результаты исследования хемилюминесцентного ответа моноцитов при воздействии устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных отражены в таблицах 5-6.

Моноциты крови усиливают продукцию активных форм кислорода в люминол-зависимой ХЛ при воздействии устойчивых штаммов золотистого стафилококка относительно чувствительных штаммов (Таблица 5). При этом интенсивность люцигенин-зависимой ХЛ снижена (Таблица 6). Исследование люминол-звисимой ХЛ моноцитов крови при воздействии устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных увеличивается площадь под кривой, интенсивность и ИА (Таблица 5), при этом эти показатели снижаются в люцигенин-зависимом процессе (Таблица 6).

Таблица 5 –Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Спонтанная реакция	Индуцированная реакция	
		MSSA	MRSA
	N=22		
	1	2	3
Tmax (сек)	2600 (573-4812)	2880 (983-4692)	2242,50 (1082-4740)
Imax (о.е)	631,5 (173-4190)	602,5 (240-4044)	1506,5 (230-4666) P_2<0,001
Smax×10^4 (о.е)	57,5 (34,4-1680)	91,4 (46,1-1165)	319,4 (48,6-1620) P_2<0,001
ИА (о.е)	1,63 (1,04-2,23)	0,98 (0,9-1,28)	1,01 (0,96-1,52) P_2=0,003

Таблица 6 – Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Спонтанная реакция	Индуцированная реакция	
		MSSA	MRSA
	N=22		
	1	2	3
Tmax (сек)	860 (484-2603)	1609,5 (364-2519)	1416 (664-1576)
Imax (о.е)	194 (157-2030)	1133,5 (158-2213)	188 (147-2056) P_2=0,036
Smax×10^4 (о.е)	44,9 (28,9-824)	135,6 (32,7-881,3)	33,9 (30,9-837)
ИА (о.е)	1,19 (1,01-1,45)	1,21 (0,97-1,65)	1,10 (1-1,24) P_2=0,046

Показатели кислороданезависимого фагоцитоза отражены в таблицах 7-8.

Таблица 7 – Показатели кислородонезависимого фагоцитоза нейтрофильными гранулоцитами штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	P
N=43			
Фагоцитарное число	23,09 (14,71-37,47)	51,51 (22,7-66,85)	=0,008
Фагоцитарный индекс	100 (72,6-125)	59,9 (40,90-90)	=0,003

В результате исследования кислородонезависимого фагоцитоза было обнаружено: повышение фагоцитарного числа и снижение фагоцитарного индекса как нейтрофильных гранулоцитов, так и моноцитов при воздействии устойчивыми штаммами, относительно чувствительных (Таблица 8-9).

Таблица 8 – Показатели кислородонезависимого фагоцитоза моноцитами штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	P
N=43			
Фагоцитарное число	12,4 (6,86-21,4)	34,92 (13,07-44,92)	<0,001
Фагоцитарный индекс	103 (64,1-128)	55,7 (36,4-73,7)	
Фагоцитарное число CD14lowCD16+	30,76 (22,22-40)	42,1 (27,58-60)	=0,002
Фагоцитарный индекс CD14lowCD16+	57,3 (26,2-192)	37,6 (18,7-91,9)	
Фагоцитарное число CD14hiCD16+	33,33 (15,62-50)	50 (25-69,38)	=0,009
Фагоцитарный индекс CD14hiCD16+	261 (128-364)	67,1 (37,7-178)	<0,001
Фагоцитарное число CD14hiCD16-	12 (5,897-18,23)	36,57 (12,5-48,69)	<0,001
Фагоцитарный индекс CD14hiCD16-	63,5 (46-82,5)	50,8 (31,6-58,7)	<0,001

Исследования кислородонезависимого фагоцитоза популяций моноцитов показали, что фагоцитарное число классических, не классических, и промежуточных популяций моноцитов повышается при воздействии устойчивыми штаммами; а фагоцитарный индекс всех популяций, напротив, снижается при воздействии устойчивыми штаммами (Таблица 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследование было установлено:

1. Исследование метаболизма штаммов MRSA относительно MSSA выявило различия по двум ферментам:

a) Увеличение глицерол-3-фосфатдегидрогеназы,
b) Снижение НАД-изоцитратдегидрогеназы.

Таким образом механизмы антибиотикорезистентности у бактерий затрагивают метаболические процессы.

2. При индукции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов штаммами MRSA относительно MSSA наблюдается выраженная интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции, при этом активность НАДФН- оксидазы снижена.

3. Оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при воздействии штаммов MRSA относительно MSSA показала увеличение фагоцитарного индекса при снижении фагоцитарного числа:

увеличение фагоцитарного индекса не классических и промежуточных субпопуляций моноцитов в 1,5 раза, классических субпопуляций – в 3 раза;

снижение фагоцитарного числа промежуточных субпопуляций моноцитов в 1,4 раза, неклассических – в 1,5 раза, классических субпопуляций моноцитов в 4 раза.

Таким образом, можно отметить, что классический тип моноцитов быстрее активируется в ответ на MRSA. При этом не классические и промежуточные моноциты при низкой скорости фагоцитируют эффективнее.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК– активные формы кислорода

ИА – индекс активации

СР – свободные радикалы

ХЛ – хемилюминесценция

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шляпников С.А., Антибиотикорезистентность основных проблемных микроорганизмов отделения реанимации и интенсивной терапии хирургического профиля / С. А. Шляпников, Н. Р. Насер, Л.Н. Попенко, Н.В. Минаев //Бюллютень ВСНЦ СО РАМН/ Всероссийская конференция – 2008. – Т . 61, №3. – С.178.
2. Владимиров, Ю.А.Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико биологических исследованиях / Ю.А.Владимиров // Соросовский образовательный журнал – 2001. – № 1. – С.16-23.
3. Борисов А. Разработка хемилюминесцентного метода подбора иммуноактивных препаратов для персонифицированного лечения пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.startbase.ru/knowledge/articles/152/ (Дата обращения 04.03.2014)
4. Blazheevskly M. Ye., Chemiluminescence-based kinetic determination of drug / M. Ye. Blazheevskly N. Yu. Bondarenco // Методыхимическогоанализа– 2011.–Т. 6, №3. – С. 124-142.
5. Владимиров, Ю.А.Сверхслабые свечения при биохимических реакциях / Ю.А. Владимиров.–Москва: Наука – 1966. – С.126.
6. Владимиров, Ю.А. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакции свободных радикалов/ Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина, Д.Ю. Измайлов // Биофизика.– 2011. – № 6. – С.1081-1090.
7. Владимиров, Ю.А.Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико биологических исследованиях / Ю.А.Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 1. – С.16-23
8. Гительзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е. Светящиеся бактерии: Новосибирск: Наука, СО – 1984.

9. Кудряшева, Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: науч.изд / Н.С Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова. – Красноярск: ИзадельствоКрасГУ – 2002.
10. Белобородов, В.Б. Стафилококковые инфекции / В.Б. Белобородов, С.Д. Митрохин // Инфекции и антимикробная терапия. – 2003. – №1.– С.12–18.
11. Kubica, M. A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of S. aureusphagocytosed by human monocyte-derived macrophages / M. Kubica, K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, et al. // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, N 1. – P.1409.
12. Зайцев, А.А. Стафилококки и ванкомицин: тенденции и противостояние / А.А. Зайцев //Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – №6. – С.20-23.
13. Страчунский, Л.С. Внебольничные MRSA – новая проблема антибиотикорезистентности / Л.С. Страчунский, Ю.А. Белькова, А.В. Дехнич // Клин.микробиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – №1. – С.32-46.
14. Швыдченко, И.Н. Цитосекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов / И.Н. Швыдченко, И.В. Нестерова, Е.Ю. Синельникова // Иммунология. – 2005. – №1. – С.31-34.
15. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука. – 1983. — С.283.
16. Елисеев В.Г. Гистология: под редакцией / В.Г. Елисеев, Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина. – Москва: Медицина. – 1983.– С.146.
17. Владимиров, Ю.А. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, Д.Ю. Измайлов //Бюллютень экспериментальной биологической медицины. – 2007. – Приложение № 2 (Сб. научных трудов, посвященных 25-летию создания НИИ физико-химической медицины). – 2007. – С. 13-20.
18. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Парфенов В.В. Особенности активационного потенциала ядер нейтрофильных

гранулоцитов в норме и патологии / И.В. Нестерова, А.А. Евглевский, Е.В. Фомичева, В.В. Парфенов // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 2. — С. 52-55.

19. Нестерова И.В., Фомичева Е.В., Швыдченко И.Н., Петренко С.Г. Активация ядер нейтрофильных гранулоцитов в норме и у пациентов с острым деструктивным панкреатитом / И.В. Нестерова, Е.В. Фомичева, И.Н. Швыдченко, С.Г. Петренко // Вестн. хирургич. гастроэнтерол. — 2007. — № 3. — С. 57.
20. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А. и др. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы // Аллергология и иммунология. — 2008. — Т. 9, № 4. — С. 432-435.
21. Веселовский В.А. Хемилюминесцентный метод анализа в биологии // Спектроскопич. методы исследов. в физиол. и биохимии. – Л.:Наука. – 1987. – С. 34-37.
22. Угарова Н.Н., Боровко Л.Ю., Лебедева О.В. и др. Биолюминесцентные методы и реагенты для целей медицинской диагностики // Вестн. АМН СССР. – 1985. – № 7. – С.1540-1558.
23. Борисов А. Разработка хемилюминесцентного метода подбора иммуноактивных препаратов для персонифицированного лечения пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.startbase.ru/knowledge/articles/152/ (Дата обращения 04.03.2014)
24. Веселовский В.А. Хемилюминесцентный метод анализа в биологии // Спектроскопич. методы исследов. в физиол. и биохимии. – Л.:Наука. – 1987. – С. 34-37.
25. Кощеев, В.Н. / Оценка особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови практически здоровых людей / Савченко А.А. – 2013
26. Ярилин, А.А. Иммунология. – 2010. – С.63-71.

27. ToloueiSemnaniR., MooreV., BennuruS., McDonald-FlemingR., GanesanS., CottonR., AnuradhaR., BabuS., NutmanT.B. Humanmonocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection. Infect. Immun. – 2014. – Vol. 82, no. 11. – P. 4438-4446.
28. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. J. Immunol. Methods. – 2012. – Vol. 381, no. 1-2. – P. 9-13.
29. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11, no. 11. – P. 762-774.
30. Герасимов, И.Г. Свертываниекровиактивируетнейтрофилыкреспираторномувзрыву / И.Г. Герасимов, Д.Ю. Игнатов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2005. – № 7. – С. 88-90.
31. Бехало, В.А. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления / В.А. Бехало, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Иммунология. – 2009. – №3. – С. 184-189.
32. Земсков, А.М. Проблема неспецифического и специфического в индукции и регуляции иммунологических реакций / А.М. Земсков, В.М. Земсков, М.А. Земсков // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – №4. – С. 105-109.
33. Злакоманова, О.Н. Хемотаксис фагоцитов: значение в подборе индивидуальной дозы лекарственного препарата для коррекции локомоторных дисфункций фагоцитов у детей с травмой / О.Н. Злакоманова, А.В. Зурочка, А.В. Чукичев // Медицинская иммунология. – 2007. – Т.9, №4-5. – С. 479-492.
34. Винник, Ю.С. Динамика продукции активных форм кислорода лимфоцитами крови у больных острым панкреатитом / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Е.В. Портнягин, Г.В. Макарская// Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – №1. – С. 35-38.

35. Marriott, H. M. Reactive oxygen species regulate neutrophil recruitment and survival in pneumococcal pneumonia / H. M. Marriott, L. E. Jackson, T. S. Wilkinson et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med.– 2008. – №8 – P.887-895.
36. Олиферук, Н.С. Оценка фагоцитарной и бактериальной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток / Н.С. Олиферук //Иммунология. – 2005. – №1. – С.10
37. Савченко А.А. Содержание АТФ и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях у пришлых жителей Эвенкии / С.В. Смирнова, А.Г. Борисов // Бюл. СО РАМН. – 2010. – Т.30, № 3. – С. 33-38. статья на которую можешь сослаться в биолюм методе.
38. Северин, Е.С. Биохимия / Т.Д. Алейникова, Д.В. Авдеева, Н.П. Волкова // Учебник для вузов. – 2003. – С.664-669.