

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« 18» июня 2018 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ОТВЕТ НА  
ВОЗДЕЙСТВИЕ ШТАММОВ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,  
*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*

Руководитель	_____	д.б.н., доцент	Коленчукова О.А.
	_____	к.б.н., доцент	Сарматова Н.И.
Выпускник	_____		Пятаева А.Д.

Красноярск 2018

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	Ошибка! Закладка не определена.
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	5
1.1 Нейтрофильные гранулоциты .....	5
1.2 Созревание нейтрофилов .....	6
1.3 Функции нейтрофилов .....	7
2.1 Моноциты .....	12
2.2 Значение моноцитов.....	13
3. Опсонизация - процесс, облегчающий фагоцитоз.....	14
4.1 Хемилюминесцентный анализ оценки активности нейтрофильных гранулоцитов .....	18
4.2 Основные стадии хемилюминесцентного анализа.....	19
4.3 Свободные радикалы хемилюминесценции клеток .....	20
4.4 Применение хемилюминесцентного анализа .....	21
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	23
5.1 Объект исследования .....	23
5.2 Методы исследования .....	23
5.2.1 Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической крови .....	23
5.2.2 Проведение хемилюминесцентного анализа фагоцитарных клеток ....	25
5.3 Статистические методы исследования.....	26
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	27
ВЫВОДЫ: .....	30
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	31

## ВВЕДЕНИЕ

В современном мире огромное значение уделяется профилактике заболеваний. Но, кроме того, чтобы следовать профилактике, необходим огромный диагностический комплекс. В последние десятилетия медицина стремится усовершенствовать самые различные анализы крови [1].

Кровь - самая исследуемая и самая информативная из сред организма: современная лабораторная диагностика показателей крови даёт более 60% информации о пациенте. В первую очередь, любая патология отражается на обменных процессах в организме вообще и на состоянии иммунного (антигенного) статуса в частности [2].

Иммунная система человека обеспечивает его биологическую индивидуальность и защищает организм человека от чужеродных агентов, антигенов. Она представляет собой комплекс органов и клеток, способных выполнять иммунологические функции. Центральная роль в иммунном ответе всегда принадлежит лейкоцитам, а точнее нейтрофилам. Нейтрофильный ответ - самый первый ответ на бактериальные и многие другие инфекции. Нейтрофильный ответ при острых воспалениях и инфекциях всегда предшествует более специфическому – лимфоцитарному [3].

Целью работы являлось определение параметров хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови в ответ на воздействие опсонизированных и неопсонизированных культур *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

На основании поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Исследовать хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов крови в ответ на опсонизированные бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

2. Исследовать хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов крови в ответ на неопсонизированные бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

3. Исследовать хемилюминесцентную активность моноцитов крови в ответ на опсонизированные бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

4. Исследовать хемилюминесцентную активность моноцитов в ответ на неопсонизированные бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Нейтрофильные гранулоциты

Лейкоциты, или белые кровяные клетки, периферической крови позвоночных и человека разнородны по морфологическим признакам и биологической роли. Все лейкоциты подразделяются на две большие группы: зернистые лейкоциты (или гранулоциты) и не зернистые лейкоциты (агранулоциты). Группа зернистых лейкоцитов характеризуется наличием в цитоплазме специфической зернистости и сегментированными ядрами. При окраске смесью кислого (эозин) и основного (азур) красителей по методу Романовского-Гимзы зернистость в одних лейкоцитах обнаруживает сродство к кислым красителям, и такие лейкоциты называются эозинофильными, или ацидофильными, в других — сродством к основным красителям — базофильные лейкоциты; зернистость третьих обнаруживает сродство к кислым и основным красителям, такие лейкоциты называются нейтрофильными, или гетерофильными. Группа незернистых лейкоцитов отличается отсутствием специфической зернистости в цитоплазме и несегментированными ядрами. Они подразделяются на лимфоциты и моноциты, имеющие разные морфологические и функциональные показатели [4].

Нейтрофильные гранулоциты (*granulocytusneutrophilicus*) — нейтрофильные лейкоциты, или нейтрофилы, имеют округлую форму, их диаметр в капле свежей крови около 7—9 мкм. На стекле при изготовлении мазка они несколько распластываются, и их диаметр составляет 10—12 мкм. В крови взрослого человека нейтрофилов содержится больше, чем других лейкоцитов; их относительное количество достигает 65—75% от общего числа лейкоцитов [4].

Цитоплазма нейтрофилов слабо оксифильна, в ней содержится мелкая зернистость, плохо заметная не только на свежих, но и на фиксированных, окрашенных препаратах. Количество гранул в каждой клетке может быть от 50 до 200. При окраске по методу Романовского-Гимзы зернистость принимает розово-фиолетовый цвет. Зернистостью занята не вся цитоплазма — поверхностный

слой ее в виде узкой каемки остается гомогенным, содержит тонкие филаменты. Этот слой играет главную роль при амебоидном движении клетки, участвуя в образовании псевдоподии [4].

Нейтрофилы обладают высокой подвижностью и фагоцитарной способностью, способны к хемотаксису. Они захватывают бактерии и другие частицы, которые разрушаются (перевариваются) под действием гидролитических ферментов. Живут нейтрофильные гранулоциты до 8 сут. В кровеносном русле они находятся 8-12 ч, а затем выходят в соединительную ткань, где осуществляют свои функции [4].

## 1.2 Созревание нейтрофилов

Период пребывания нейтрофилов в периферической крови составляет примерно 6-8 ч, и это, вероятно, объясняет их продукцию с удивительно высокой скоростью - 2.5 миллиарда клеток в час. Так же как и другие лейкоциты, нейтрофилы происходят из общей полипотентной стволовой клетки в костном мозге (рис. 1) [5].

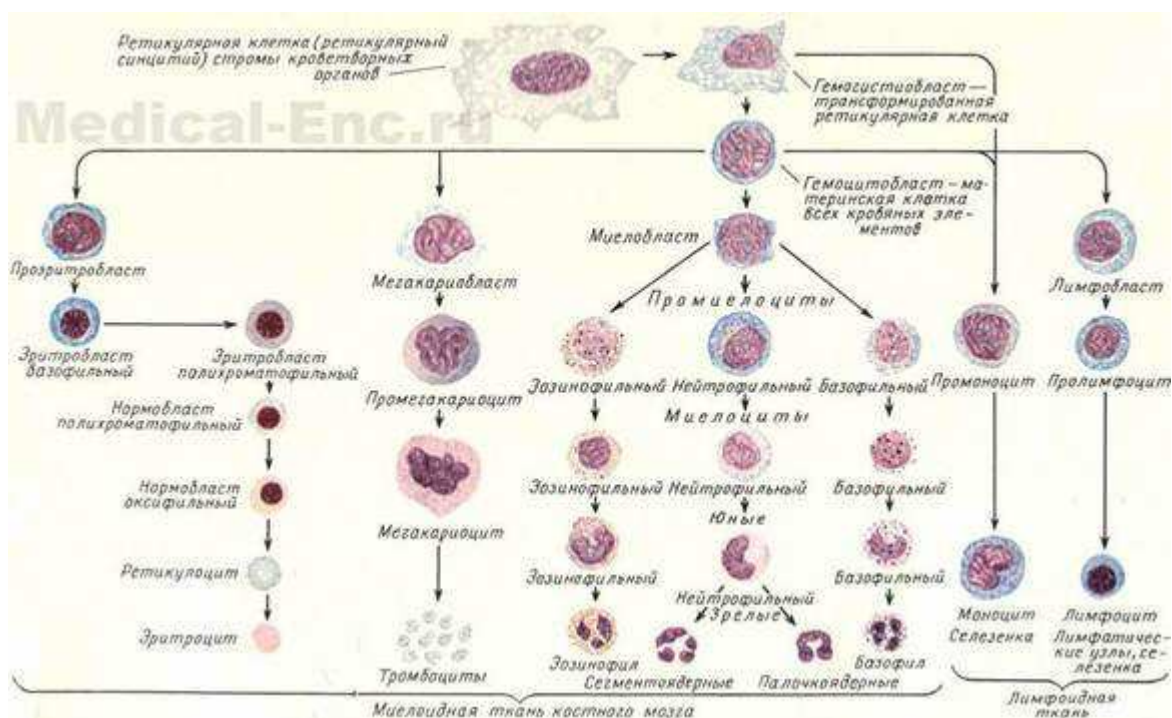


Рисунок 1 – Морфологические формы клеток крови.

Длительность цикла дифференцировки нейтрофилов от клетки-предшественника до зрелой клетки составляет в зависимости от степени активности процесса от 7 до 10 дней [5].

Созревание нейтрофилов в костном мозгу сопряжено с динамикой морфологических изменений клеток: постепенное уменьшение размеров ядра с увеличением доли цитоплазмы, исчезновение ядрышек, конденсация хроматина и концентрация его у оболочки клетки, сегментация ядра, утрата базофилии цитоплазмы, появление специфической нейтрофильной зернистости. Особенности ультраструктуры и цитохимии миелобластов (наличие ядрышек, большое количество рибосом, развитые аппарат Гольджи и система эндоплазматического ретикулума) свидетельствуют о том, что метаболизм этих клеток направлен на поддержание высоких темпов синтеза нуклеиновых кислот и цитоплазматических белков. На стадии поздних миелобластов и промиелоцитов в аппарате Гольджи и в системе эндоплазматического ретикулума происходит интенсивное образование первичных гранул [5].

Для процесса созревания нейтрофилов необходимо наличие двух условий: поддержание достаточного количества стволовых клеток и дифференцировка этих клеток в зрелые под воздействием различных факторов роста [5].

### **1.3 Функции нейтрофилов**

Функцией зрелых нейтрофильных лейкоцитов является уничтожение, проникших в организм инфекционных агентов. Осуществляя ее они тесно взаимодействуют с макрофагами, Т- и В-лимфоцитами. На важность функционального вклада нейтрофилов и защиту организма от инфекции указывает, например, тяжесть течения инфекционных заболеваний у больных, страдающих сниженной продукцией или качественными нарушениями этих клеток. Нейтрофилы секретируют вещества, обладающие бактерицидными эффектами, способствуют регенерации тканей, удаляя из них поврежденные клетки, а также секретируя стимулирующие регенерацию вещества. Часть нейтрофильных гранул, дают положительную окраску на фермент миелопероксидазу, представлены лизосо-

мами, содержащими многочисленные ферменты: лизоцим, повреждающий стенку бактерий; катионные белки, нарушающие дыхание и рост микроорганизмов; нейтрофильные протеазы и кислые гидролазы, позволяющие нейтрофилам легко переваривать фагоцитированные объекты [6].

Гранулы нейтрофилов, не окрашивающиеся на миелопероксидазу, содержат лактоферрин, оказывающий бактериостатическое действие, транскобаламины I и III — переносчики витамина B12 в крови, лизоцим. В гранулах третьего типа содержатся кислые гликозаминогликаны, участвующие в процессах размножения, роста и регенерации тканей. Гранулы 2-го и 3-го типов — это секреторные органеллы, выделяющие секрет и вне фагоцитоза, что позволяет отнести нейтрофилы к клеткам, постоянно секретирующим биологически активные вещества [6].

Нейтрофилы осуществляют свои функции, благодаря способности быстро мигрировать и накапливаться в инфицированном или поврежденном участках организма, фагоцитировать, т.е. захватывать и разрушать в фагоцитарных вакуолях внутри клетки поглощенные бактерии и поврежденные клетки. Их способность к миграции связана с хорошо развитым аппаратом движения. Выбор направления их движения к воспаленным или инфицированным тканям обусловлен появлением в этих тканях вазоактивных и хемотаксических факторов. Вазоактивные факторы повышают проницаемость капилляров, что способствует миграции нейтрофилов в ткань. Хемотаксические факторы взаимодействуют с рецепторами на поверхности гранулоцитов, образуя лигандрецепторный комплекс, определяющий движение нейтрофилов к воспаленному участку. Самым мощным хемотаксическим эффектом обладают лейкотриены, производные метаболизма арахидоновой кислоты в мембране клеток. Они секретируются активированными Т-лимфоцитами и макрофагами после воздействия на них бактериальных веществ. Помимо лейкотриенов эти клетки секретируют другие хемотаксические факторы — эндотоксины. Важными хемотаксическими факторами являются продукты активации комплемента — фрагменты его молекул C2a и C5a.



Некоторые из этих факторов, особенно С, функционируют как опсонины, т.е. вещества, облегчающие фагоцитоз бактерий (от греческого *opsonein* — делать съедобным) [7].

Большинство реакций, в которых участвуют нейтрофилы, совершается в тканях. Поэтому адгезивность, характеризующая способность клеток прикрепляться и задерживаться на определенных субстратах, имеет важное значение при оценке функционального потенциала нейтрофильного гранулоцита [7].

Нейтрофильные гранулоциты способны осуществлять киллинг микроорганизмов с помощью двух принципиально различных механизмов: кислородозависимого и кислороднезависимого [7].

К кислородзависимому пути относят «респираторный взрыв», который развивается 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 анаэробнозависимого. «Респираторный взрыв» относится к серии метаболических процессов, имеющих место при стимуляции нейтрофилов: 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 в отношении опухолевых клеток. Именно на регистрации интенсивности «респираторного взрыва» основаны многие клинико-диагностические методы оценки состояния организма, в частности и хемилюминесцентный анализ [7].

Нейтрофильные гранулоциты занимают одну из наиболее активных позиций в системе гуморально-клеточной кооперации крови. Эти клетки составляют первую линию неспецифической противомикробной защиты. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления и, от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя. Их мобилизация из кровяного русла резко повышается

под влиянием цитокинов макрофагального происхождения (ИЛ-8) или C5a – фракции активированной системы комплемента [7]. Другие продукты макрофагов активируют функциональную активность нейтрофилов (ФНО). В свою очередь, стимулированные нейтрофилы сами становятся мощными эффекторами и одним из пусковых механизмов каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления [6]. Следует также отметить, что цитопатогенное действие нейтрофилов связано главным образом с генерацией активных форм кислорода [6]. Все вышеперечисленное позволяет классифицировать данный тип клеток как универсальную мишень и, соответственно, индикатор различных нарушений гомеостаза.

Гранулоциты продуцируются в костном мозге под влиянием ИЛ-1, ИЛ-3, ГМ-КСФ и Г-КСФ. Предшественники активно пролиферируют, а в резерв входят неделящиеся, созревающие гранулоциты. Через стадию предшественника они проходят за 4 дня (3-5 делений), а морфологическое и функциональное созревание в резерве занимает еще 5 дней [7].

Уже в ранних работах было показано, что развитие клеток в пределах костного мозга и их выход в ответ на специфический сигнал являются независимыми процессами. Повышенное количество зрелых нейтрофилов в циркуляции, скорее является результатом выброса клеток из пула постмитотических клеток костного мозга, нежели повышение скорости гранулопоэза. Ежедневный выход из костного мозга может повышаться в результате влияния воспалительных стимулов. Такой усиленный выход гранулоцитов могут индуцировать бактериальные липополисахариды или противовоспалительные цитокины (ИЛ-1, ФНО) или C3 – фракция активированного комплемента. Лишь около половины нейтрофилов в крови циркулируют в свободном состоянии, остальные находятся в маргинальном пуле и временно находятся в состоянии прилипания к поверхности эндотелия венул. С этим пулом связано кратковременное физиологическое повышение в крови нейтрофилов, как реакция на пищу, физическую нагрузку, суточные ритмы, определенные гормональные сдвиги. Динамическое равнове-

сие двух пулов регулируется: агентами, усиливающими пристеночное стояние путем усиления экспрессии адгезионных молекул (ICAM), к которым относятся хемокины, ИЛ-1, ФНО, ИФН, а также агентами, ингибирующими пристеночное стояние, к которым относятся кортикостероиды. Поступившие из костного мозга нейтрофилы в крови находятся около 6 ч, после чего переходят в ткани, где и функционируют 3-5 дней [32].

К настоящему времени на мембране нейтрофилов обнаружено множество рецепторов различной специфичности. Они представляют собой, как правило, белки или гликопротеиды, расположенные на цитоплазматической мембране и характеризующиеся высокой степенью сродства к биологически активным веществам. Особенности рецепторных структур направлены на взаимосвязь с микроокружением, а также участвуют в регуляции реактивности самого нейтрофила. Так, можно выделить группу рецепторов к цитокинам и факторам роста, с помощью которых осуществляется регуляция функциональной активности и хемотаксиса нейтрофилов со стороны клеточного микроокружения. Паттерн-распознающие рецепторы служат для присоединения микроорганизмов к мембране нейтрофила и их последующего фагоцитоза. Рецепторы адгезии к мембранам других клеток и внеклеточному матриксу обеспечивают контактные взаимодействия с другими клетками, элементами внеклеточного матрикса тканей и сосудов, способствуют процессам миграции нейтрофильных гранулоцитов. Через рецепторы к гормонам и биологически активным веществам осуществляется нейроэндокринная и паракринная регуляция функциональной активности нейтрофилов. Рецепторы к компонентам комплемента обеспечивают усиление фагоцитарных функций. Рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулинов позволяют нейтрофильным гранулоцитам осуществлять фагоцитоз иммунных комплексов и принимать участие в элиминирующих механизмах иммунного ответа [7].

Данные, накопленные за последние два десятилетия, доказали роль нейтрофилов в модуляции клеточного и гуморального иммунитета через синтез и

продукцию иммунорегуляторных цитокинов. В настоящее время получены убедительные доказательства продукции нейтрофилами ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2 $\beta$  совместно с ингибитором ИЛ-1, TGF- $\alpha$ , M-КСФ, GM-КСФ, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-12. Также нейтрофильные гранулоциты синтезируют и секретируют NAP-1/ИЛ-8. Следует также отметить, что синтетические процессы, почти незаметные в покоящихся нейтрофилах, усиливаются при стимуляции [5].

## **2.1 Моноциты**

Моноциты — клетки лейкоцитарного ряда. Это означает, что они являются разновидностью лейкоцитов, не имеют гранул (вместе с лимфоцитами относятся к агранулоцитам). Моноциты в крови среди других клеток выглядят самыми крупными по размерам [2].

Моноцитарные клетки поступают в кровь из костного мозга, где они рождаются, но дальнейшее «взращение» происходит в крови, лимфоузлах. Дозревая, они превращаются в макрофаги, а в тканях в гистиоциты. Из-за своей массивности они медленно двигаются по кровяному руслу или «сидят» в тканях.

Моноцит — крупный зрелый одноядерный лейкоцит группы агранулоцитов диаметром 18—20 мкм с эксцентрично расположенным полиморфным ядром, имеющим рыхлую хроматиновую сеть. Как и лимфоциты, моноциты имеют не сегментированное ядро. Моноцит — наиболее активный фагоцит периферической крови. Клетка овальной формы с крупным бобовидным, богатым хроматином ядром (что позволяет отличать их от лимфоцитов, имеющих округлое тёмное ядро) и большим количеством цитоплазмы, в которой имеется множество лизосом [2].

Моноциты образуются в костном мозге, а не в ретикуло-эндотелиальной системе, как считалось ранее. В кровь выходят не окончательно созревшие клетки, которые обладают самой высокой способностью к фагоцитозу.

Рост и созревание моноцитарно-макрофагального ростка костного мозга усиливается GM-КСФ и M-КСФ, тормозится глюкокортикоидами. При стрессе,

шоке, терапии экзогенными глюкокортикоидами отмечается абсолютная или относительная монопения.

Моноциты находятся в крови 2-3 дня, после чего большинство из них либо гибнет через апоптоз, либо становится макрофагами (например, в кишечнике). Моноциты крови являются предшественниками макрофагов моноцитарного происхождения, непосредственно в макрофаги их принимают после их выхода из кровяного русла [15].

Моноциты обладают выраженной фагоцитарной функцией. Это самые крупные клетки периферической крови, они являются макрофагами, то есть могут поглощать относительно крупные частицы и клетки или большое количество мелких частиц 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 макрофагов — нейтрофилов и эозинофилов, способных поглощать лишь относительно небольшие частицы и как правило погибающих после фагоцитирования.

Моноциты способны фагоцитировать микроб в кислой среде, когда нейтрофилы неактивны. Фагоцитируя микробов, погибших лейкоцитов, поврежденные клетки тканей, моноциты очищают место воспаления и подготавливают его для регенерации. Эти клетки образуют отграничивающий вал вокруг неразрушаемых инородных тел [31].

## **2.2 Значение моноцитов**

Макрофаги и гистиоциты — это те клетки, которые непосредственно обеспечивают уничтожение чужеродных веществ, продуктов распада, атипических клеток, микроорганизмов. Они не торопятся выполнять свои функции, более склонны к «плановой» работе, вступают в борьбу постепенно.

Поэтому содержание моноцитов в крови изменяется не сразу после воздействия патологического процесса, а спустя некоторое время. Клетки «ждут» команды от подвижных лимфоцитов-разведчиков [2].

Но, если эти клетки активизировались, то очищение пойдет значительно быстрее. Подойдя к «неопознанному объекту», они обволакивают его своей протоплазмой, втягивают внутрь и растворяют с помощью сильных ферментов [2].

Моноциты-чистильщики убирают ненужные остатки воспаления, старые клетки, пытаются бороться с опухолями. Они активные участники защитного механизма или иммунитета.

Уровень моноцитов в крови, как и всех клеток лейкоцитарной формулы, вычисляют в абсолютном значении в литре крови и подсчитывают их долю (%) среди лейкоцитов. Оба показателя важны для определения характера и степени выраженности защитной реакции организма.

Норма моноцитов в крови у мужчин и женщин не отличается и практически не зависит от возраста. У человека нормальным количеством считается  $0,07 \times 10^9/\text{л}$  (для ребенка — от  $0,05$  до  $1,1 \times 10^9/\text{л}$ , для взрослого — от  $0$  до  $0,08 \times 10^9/\text{л}$ ) [5].

В пересчете на процентное содержание у детей это от 2 до 12%, у взрослых — от 3 до 11%.

Количество моноцитов в крови может отклоняться от нормального в сторону повышения или понижения. Проведение анализа при различных заболеваниях позволило выявить главные причины изменений [5].

### **3. Опсонизация - процесс, облегчающий фагоцитоз**

Опсонины — это сывороточные факторы, в обязанности которых входит превращение бактерий в материал для фагоцитоза. Большинство патогенных бактерий должны подвергнуться опсонизации прежде, чем будут адгезированы фагоцитирующими клетками, в том числе нейтрофилами.

В настоящее время наиболее важными сывороточными опсонинами считаются система комплемента и иммуноглобулины [16].

В бактериальной опсонизации могут принимать участие как классический, так и альтернативный пути активации комплемента, а активированный фрагмент третьего компонента комплемента (СЗЬ) — наиболее сильный опсонизирующий фактор. За опсонизацию через активацию системы комплемента ответственны прежде всего СЗЬ и 1СЗЬ и соответствующие им рецепторы на нейтрофилах: СК.1 — для СЗЬ и СК.3, (СБ11Ь/С018) — для 1СЗЬ [30].

Для капсульных микроорганизмов 1СЗЬ-СК.3 взаимодействие повышает их адсорбцию к нейтрофилам, но не влияет на процесс переваривания. Переваривание происходит только в присутствии антител. Антитела связываются со специфическими антигенами бактериальной клеточной стенки. Молекулы этих антител фактически играют роль лигандов — мостиков, обеспечивающих адсорбцию бактерий к нейтрофилам (рис. 7). Как было сказано выше (табл. 1), нейтрофилы несут на своей поверхности два рецептора к  $1\text{§}0$ : РсК.11 и РсК.111. РсКП в одинаковой степени связывает  $1\text{§}C1$  и  $1\text{§}03$ , и эта связь более крепкая, нежели с  $1\text{§}02$  и  $1\text{§}C4$ . РсКШ связывает только агрегированный  $1\text{§}C$ . Опсонизирующими свойствами обладают и иммуноглобулины класса А; не исключено, что в этой роли могут выступать и иммуноглобулины других классов. С недостаточной опсонизирующей активностью сыворотки связана увеличивающаяся восприимчивость к бактериальным инфекциям при многих заболеваниях, включая гипогаммаглобулинемию, врожденное отсутствие ряда компонентов системы комплемента, активную системную красную волчанку, серповидноклеточную анемию и кистозный фиброз. Низкий уровень содержания опсонина сопровождается бактериальными инфекциями с необычно тяжелой или рецидивирующей клинической картиной. Хотя множество бактериальных инфекций связаны с нарушениями фагоцитарных функций нейтрофилов, недостаточность опсонизации может быть вторичной природы и носит обратимый характер [17].

Многие бактерии выработали механизмы защиты от опсонизации и последующего фагоцитоза нейтрофилами. В основном эти механизмы защиты сопряжены с бактериальной капсулой. Капсула защищает бактерии от нейтрофилов, препятствуя опсонизации. Например, бактерии, вызывающие пневмонию и менингит (*Haemophilus influenzae*, *Meningococcus meningitidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* группы В), имеют на своей поверхности полисахаридную капсулу. Штаммы этих же бактерий, лишенные капсулы, обладают меньшей вирулентностью. Капсула патогенных бактерий препятствует фиксации комплемента, в то время как капсула авирулентных бактерий не обладает такой способностью. Капсула слабо иммуногенна и маскирует структуры бактериальной стенки, которые более иммуногенны и могут непосредственно активировать систему комплемента. Компонентами клеточной стенки бактерий, снижающими эффективность фагоцитоза или препятствующих ему, являются: пептидогликаны, белок А (Streptococcus pneumoniae) и М-белок (стрептококк группы А) [29].

Адгезия некоторых бактерий к нейтрофилам возможна также и в отсутствие антител и/или комплемента. Например, адгезины *E. coli* могут обеспечивать прямую адгезию этих бактерий к нейтрофилам. Принципиально адгезины могут быть разделены на две группы: 1) адгезины, где O-маннозиды угнетают адгезию, и 2) адгезины, где угнетения адгезии не происходит. Маннозорезистентный фенотип (МК — шаппозегез151ап0 сопряжен с адгезинами, связанными с клеточной стенкой бактерий или со специфическими белковыми фимбриями. Среди штаммов *E. coli* выделяют МК штаммы, содержащие Р-адгезины, которые распознают и связывают участки с последовательностью ав-С3а1-(1-4.)-р-1)-(ла1 на рецепторах клеток-мишеней. Штаммы *E. coli*, экспрессирующие Р-адгезины, часто являются причиной инфекций мочевыводительной системы. Маннозочувствительные (МЗ — таппозегепзШУе) штаммы *E. coli* обладают активной адгезией к слизистой мочевых путей [18].



Помимо комплемента и антител, дополнительным опсономом, представленным в сыворотке крови, является белок, связывающий ЛПС (БВР — ProlyzassBaп(1e-Ыпё1я§ ргоСет). РВР — острофазовый белок крови, который связывает ЛПС. Связываясь с поверхностью грамотрицагельных бактерий, БВР значительно повышает их адсорбцию на поверхности нейтрофилов и макрофагов через СВ 14. Это связывание приводит к значительному повышению фагоцитоза [28].

Другим белком плазмы крови, выполняющим опсонизирующую функцию, является фибронектин. Фибронектин — высокомолекулярный гликопротеин (м. м. = 440 кДа), присутствующий в нерастворенном виде в соединительной ткани и на мембране некоторых клеток (моноцитов, нейтрофилов, гепатоцитов, фибробластов, эндотелиальных клеток, тромбоцитов и т. д.). Некоторые виды бактерий (5. аигеиз, стрептококки групп А, В, С и О) несут рецепторы к фибронектину. В связи с тем, что нейтрофилы также экспрессируют рецептор к фибронектину, не исключено, что фибронектин действует как мост между нейтрофилом и бактерией, таким образом облегчая их фагоцитоз в отсутствие специфических опсонов. Кроме того, предполагается, что фибронектин способен повышать способность антител и комплемента к опсонизации бактерий. Возможно двойное толкование действия фибронектина: либо это проявление опсонизирующего действия при фагоцитировании стафилококка, либо усиление патогенного действия последнего за счет препятствия иммунологическому распознаванию [19].

Возможность такого двойного действия обосновывается тем, что способность фибронектина содействовать прилипанию нейтрофилов к стрептококку реализуется только в отношении штаммов, не содержащих М-белок; ингибирующее действие в отношении кишечной палочки не проявляется.

Многие микроорганизмы препятствуют опсонизации, меняя антигенную структуру своих поверхностных образований. Например, РН белки, экспрессированные на поверхности, очень разнообразны по своей антигенной структуре

и кон-тролируются различными генами. Один и тот же штамм способен экспрессировать более 7 различных вариантов РИ белков.

Нейтрофилы принимают участие в элиминации вирусных частиц. Например, взаимодействие с вирусом герпеса через СК.1 и СК3 на нейтрофилах приводит к адсорбции вируса, но не его ин-тернализации, для которой важно участие РсК.. Недавно показано, что Тгур-апозота продуцирует  $\beta$ p160, который ограничивает активацию комплемента путем угнетения образования С3-конвертазы. Этот гликопротеин имеет сходство с БАР-белком, реидиру-ющим систему комплемента [20].

#### **4.1 Хемилюминесцентный анализ оценки активности нейтрофильных гранулоцитов**

Одним из наиболее перспективных методов, позволяющих оценить функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов, является хемилюминесцентный анализ [8].

Хемилюминесцентный анализ позволяет получать информацию о нативном состоянии и функциональной активности клеток. Установлена возможность непосредственного исследования клеточного ответа при воздействии физиологических и патологических агентов. Доказан высокий уровень корреляции между уровнем хемилюминесценции фагоцитов и киллингом [26].

В связи с этим, определение хемилюминесценции нейтрофилов может использоваться как один из критериев их способности к завершённому фагоцитозу. Уровень хемилюминесценции нейтрофилов характеризует интенсивность «респираторного взрыва» в клетках с продукцией активных форм кислорода, оказывающих бактерицидное действие (супероксидный анион-радикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород и др.) [27].

Метод регистрации ХЛ клеток крови позволяет проводить изучение и отбор иммуномодулирующих фармакологических препаратов на основании срав-

нения люминолзависимой стимулированной хемилюминесценции до и после введения в пробу с лейкоцитарной взвесью исследуемых препаратов[8].

Хемилюминесцентный тест является высокочувствительным и безопасным методом диагностики непереносимости лекарственных средств. В случае непереносимости инкубация цельной крови с раствором этих препаратов в терапевтических концентрациях сопровождается достоверным снижением генерации активных форм кислорода нейтрофилами, стимулированными неспецифическими активаторами. Снижение люминолзависимой хемилюминесценции цельной крови при непереносимости лекарственного препарата отмечается независимо от химических свойств и принадлежности медикаментов к фармакологическим группам [25].

#### **4.2 Основные стадии хемилюминесцентного анализа**

Явление хемилюминесценции - свечения, сопровождающего химические реакции, – все более широко используется в практических целях, поскольку позволяет создать ультра чувствительные и специфические методы анализа различных биологических субстратов. Хемилюминесценция (ХЛ) обусловлена, реакциями экзотермического типа и протекает, как правило, 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 [9].

2. Перенос электрона (окислительно-восстановительная реакция) на один из более высоких энергетических уровней и образование продукта реакции в электронно- возбужденном состоянии [9].

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 [24].

Хемилюминесцентный метод позволяет регистрировать короткоживущие свободные радикалы, которые можно разделить на четыре группы: а) свободные радикалы (СР) активных форм кислорода, б) СР липидов, в) СР, осуществляющие ферментативное дыхание в митохондриях, г) СР естественных антиоксидантов [9].

### **4.3 Свободные радикалы хемилюминесценции клеток**

Живые клетки - фагоциты (к которым относятся гранулоциты и моноциты крови, а также тканевые макрофаги) сами образуют активные формы кислорода при их стимулировании. При этом наблюдается хемилюминесценция, особенно яркая в присутствии люминола (или люцигенина). 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. Такие же "хемилюминесцентные ответы" можно получить, если добавить к лейкоцитам крови суспензию бактерий, изолированные оболочки дрожжевых клеток, кристаллы кварца или сульфата бария, а также определенные химические соединения; все эти агенты получили собирательное название "стимулов". Стимулированная ХЛ клеток в присутствии люминола - ценный показатель функционального состояния фагоцитов крови и тканей, их способности производить при необходимости активные формы кислорода, т.е. выполнять свою защитную функцию. Эта способность обычно усиливается при возникновении в организме очагов воспаления (например, после инфаркта миокарда) и в ряде других случаев. Наоборот, при длительном недостатке кислорода, связанном с общим ослаблением организма, активность фагоцитов и ХЛ-ответы снижаются [14].

Уровень хемилюминесценции при фагоцитозе характеризует интенсивность "респираторного взрыва" в клетках с продукцией активных форм кислорода, оказывающих бактерицидное действие. Первичными метаболитами активированного кислорода являются супероксидный анион-радикал ( $O_2\bullet$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $OH\bullet$ ), синглетный кислород

(1O2). В качестве основных вторичных метаболитов необходимо отметить гипохлорную кислоту (HOCl), хлорамины и продукты перекисного окисления липидов. Взаимопревращения первичных и вторичных оксидантов с мощным энергетическим потенциалом создают динамический спектр молекул, которые прямо или косвенно вовлекаются в реакции фагоцитов. При этом, взаимодействие высокоэнергетических оксидантов с люминесцирующими посредниками (люминол, люцигенин и др.) приводит к переходу последних в электронно-возбужденное состояние, выход из которого сопровождается испусканием кванта света. Регистрация светоизлучения хемилюминесцентной реакции производится на хемилюминометрах отечественного или зарубежного производства [10].

В целом, о каком бы разнообразии конечных и промежуточных эффекторов не шла бы речь, в основе реактивной хемилюминесценции лежит прямое или опосредованное вовлечение кислорода в образование высоко реактогенных молекул, излучающих свет. Главное содержание таких реакций - мобилизация кислорода активированными клетками - сближает хемилюминесценцию с реакцией восстановления нитросинеготетразолия (НСТ). Следовательно, отмечая объективные преимущества хемилюминесцентного анализа, необходимо помнить о базисной информации накопленной при использовании в клинической практике НСТ-теста [11].

#### **4.4 Применение хемилюминесцентного анализа**

В патогенезе многих болезней и патологических процессов играет важную роль оксидативный стресс. Метод ХЛ оказывается полезным при изучении таких патологий, поскольку дает возможность измерять уровень свободных радикалов (АФК, NO), оценивать параметры антиоксидантной защиты и влияние антиоксидантов. Хемилюминесценцию успешно применяют при изучении иммунных нарушений, нарушений метаболизма, дисфункции эндотелия, ишемии/реперфузии миокарда и мозга, онкологических и воспалительных заболе-

ваний, а также многих других болезней, патогенез которых связан с оксидативным стрессом [12].

Свободные радикалы – важные участники регуляторных процессов в живых клетках, но одновременно – причина повреждения клеточных структур и триггер, запускающий каскад реакций самоуничтожения. Их ведущая роль в развитии практически всех болезней пожилого возраста и старении организма общепризнана и является объектом многочисленных исследований. Однако средняя по времени (стационарная) концентрация этих активных частиц в живой клетке очень мала, и их прямое обнаружение обычными биохимическими методами практически невозможно. Метод хемилюминесценции основан не на анализе веществ, а на измерении скорости реакций, сопровождающихся свечением, а именно такие реакции характерны для свободных радикалов [21].

Наиболее известные хемилюминесцентные реакции в биохимических системах – собственное (сверхслабое) свечение при цепном окислении липидов, реакции люминола с АФК (гидроксильным радикалом и супероксидом) и органическими радикалами, реакции люцигенина и ряда производных люцифериннов с супероксидным радикалом. Все они включают в себя на определенном этапе взаимодействие двух радикалов, которое позволяет образовавшейся молекуле накопить такое количество энергии, что ее оказывается достаточно для излучения фотона конечных продуктов [22].

Метод ХЛ стал одним из основных методов изучения свободнорадикальных процессов в научных и клинических исследованиях [23].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 5.1 Объект исследования

Объектами исследования являлись нейтрофильные гранулоциты и моноциты крови относительно здоровых людей (n=20). Кровь взята из локтевой вены на голодный желудок в Красноярском Краевом Центре Крови №1. В качестве индуктора выброса АФК для хемилюминесцентной реакции использовали устойчивые опсонизированные и неопсонизированные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

### 5.2 Методы исследования

#### 5.2.1 Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической крови

Забор крови для исследования проводили утром натощак с 8 до 9 часов. Выделение общей фракции моноцитов и нейтрофилов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода нейтрофилов и моноцитов, которая составляла не менее 97%, жизнеспособность клеток соответствовала 98-100%. В дальнейшем 1 млн. выделенных клеток использовали для определения хемилюминесцентной активности.

Порядок выполнения работы:

1. Используют фиколл-верографин  $\rho = 1,077$  г/см<sup>3</sup> и  $\rho = 1,119$  г/см<sup>3</sup>. Вначале создают двойной градиент фиколл-верорографина: первым в пробирку вносят раствор фиколл-урографина, имеющий плотность  $\rho = 1,119$  г/см<sup>3</sup>, затем на него аккуратно наслаивают раствор фиколла с плотностью  $\rho = 1,077$  г/см<sup>3</sup>.
2. Гепаринизированную кровь наслаивают на двойной градиент фиколл-верорографина, центрифугируют 45 мин при 1500 об. После центрифугирования получают кольца моно-нуклеарных клеток (верхнее) и нейтро-

филов (нижнее), а в осадке находятся эритроциты. Полученные кольца мононуклеарных клеток и нейтрофилов отбирают в чистые центрифужные пробирки.

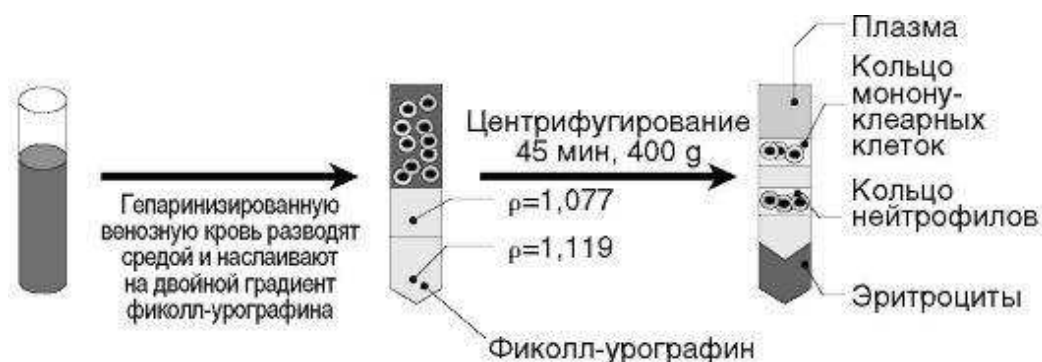


Рис.2 - Выделение мононуклеарных клеток и нейтрофилов с помощью градиента плотности фиколл-урографина.

3. Добавляют физиологический раствор превосходящим объемом и центрифугируют 5 мин при 1500 об. Все клетки оседают на дно, смыв супернатанта.
4. Добавляют 1 мл.раствораХэнкса в кювету с нейтрофилами. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов
5. Добавляют 3 мл среды RPMI в кювету с мононуклеарными клетками. Далее данную смесь переносят на пластиковую чашку Петри и инкубируют 1 час при 37 °С.
6. После инкубирования мононуклеарных клеток, среда RPMIзаменяется на раствор Версена и инкубируется 20 мин при 4°С.
7. Раствор Версена с моноцитами переливают в пробирку и добавляют 9 мл физиологического раствора. Центрифугируют 5 мин при 1500 об.
8. После центрифугирования моноциты оседают на дно пробирки, сливают супернатант. Добавляют 1 мл раствора Хэнкса. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов.
9. Для подсчета клеток в планшет добавляют 40 мкл уксусной кислоты и 10 мкл лейкозвеси и подсчитывают количество нейтрофильных гранулоци-



тов в камере Горяева в 5 больших квадратах по диагонали. Количество клеток определяют по формуле  $(X1 \cdot 11 \cdot 1000) / 0,02 = (X2 / 2000000) - 1$  количество Хенкса необходимое добавить к 1 мл лейкоцитарной суспензии, где X1 – суммарное количество клеток в 5 квадратах, X2- количество нейтрофилов в 1 мл суспензии (необходимое количество клеток  $2 \cdot 10^6$  в 6 степени).

Опсонизация штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,  
*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*:

Для получения опсонизированных культур штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* мы использовали сыворотку крови относительно здоровых людей. Инкубировали культуры штаммов с сывороткой крови в термостате в течение 40 минут.

### 5.2.2 Проведение хемилюминесцентного анализа фагоцитарных клеток

Готовят пробу : 200 мкл взвеси нейтрофильных гранулоцитов (2 млн/мл), 20 мкл донорской сыворотки, 240 мкл раствора Хенкса (“ПанЭко”, Россия), 50 мкл люминолава концентрации  $10^{-5}$  М и 40 мкл бактериальной суспензии *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Оценку спонтанной и бактериально-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606М» (СКТБ “Наука”, Красноярск).

Хемилюминесцентный анализ проводят в 3 кюветах с нейтрофилами и 3 идентичных кюветах с моноцитами. Спонтанная хемилюминесценция осуществляется без добавления индуктора, во вторую кювету добавляют суспензию *Pseudomonas aeruginosa* опсонизированную, в третью – неопсонизированную, четвертая кювета спонтанная с моноцитами без добавления индуктора, в пятую добавляем бактериальную суспензию опсонизированную *Pseudomonas aeruginosa*, в шестой кювете неопсонизированная культура. То же самое прово-

дим с бактериальными культурами *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

Результаты ХЛ анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности ХЛ, значение максимума интенсивности ХЛ, площадь под кривой ХЛ. Определили индекс чувствительности хемилюминесценции (ИА)- отношением площади кривой хемилюминесценции индуцированной бактериями к спонтанной хемилюминесценции. Индекс активации определяли по формуле:

$$ИА = S_{\text{индуцированная}} / S_{\text{спонтанной}} \dots (6)$$

$S_{\text{индуцированная}}$  – величина площади под кривой хемилюминесценции индуцированной бактериями (относительных единиц).

$S_{\text{спонтанная}}$  – величина площади под кривой хемилюминесценции не индуцированной (относительных единиц);

### 5.3 Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MSExcel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ и Statistica 10,0 производился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Результаты статистической обработки использованы в рисунках.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование кислородозависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов осуществляли с помощью хемилюминесцентного метода. Результаты ХЛ анализа характеризовали по следующим параметрам: по времени выхода на максимум интенсивности ( $T_{max}$ ), по максимальному значению интенсивности ХЛ ( $I_{max}$ ) и площади под кривой интенсивности ХЛ ( $S$ ). Усиление ХЛ проводили с помощью опсонизированной и неопсонизированной культуры *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Индекс активации (ИА) оценивали соотношением площади индуцированной ( $S_2$ ) к площади спонтанной ( $S_1$ ).

[Изъято 10 страниц]

Таким образом в результате исследования было установлено увеличение интенсивности хемилюминесцентной реакции в ответ на опсонизированные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. При исследовании интенсивности хемилюминесцентной реакции в ответ на индукцию штаммами *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* достоверных данных не выявлено. При индукции опсонизированной культурой определялось значительное увеличение генерации АФК. Процесс опсонизации – это взаимодействия поверхностных антигенных структур патогенного агента с белковыми компонентами плазмы крови (компоненты комплемента, иммуноглобулины, белки острой фазы) с образованием иммунных комплексов, поглощение которых фагоцитами значительно облегчается. Этот процесс не относится непосредственно к фазам фагоцитоза, однако, опсонины в комплексе с антигеном и иммуноглобулином усиливают фагоцитоз. Они связываются с объектом фагоцитоза, выступая в роли своеобразного функционального посредника между ним и фагоцитирующей клеткой. В бактериальной опсонизации могут принимать участие как классический, так и альтернативный пути активации комплемента, а активированный фрагмент третьего компонента комплемента (C3b) – наиболее сильный опсонизирующий фактор. За счет наличия на поверхности нейтрофилов рецепторов к C3 компоненту комплемента обеспечивается связывание мембраны фагоцита с поглощаемой частицей, благодаря чему осуществляется выведение C3 несущих комплексов. За счет существования на поверхности нейтрофилов рецепторов к Fc фрагментам иммуноглобулинов класса G (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>) усиливается фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов в отношении тех микроорганизмов, против которых образованы антитела. Опсонизирующими свойствами обладают, и иммуноглобулины класса A. Антитела связываются со специфическими антигенами бактериальной клеточной стенки и играют роль лигандов - «мостиков», обеспечивающих адсорбцию бактерий к нейтрофилам. Итогом любой опсонизации является усиление клеточной реакции на объект фагоцитоза, его поглощение и стимуляция цитотоксической функции фагоцита. Известно, что на мембране лейкоцитов выявлены молекулы, взаимодействующие

щие с опсонизированными бактериями, – рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулинов (FcR) и пептидов, образующихся при расщеплении C3-компонента комплемента (CR). CR обладают лектиноподобными свойствами и могут взаимодействовать с некоторыми микробами непосредственно, без участия комплемента (опсонинезависимый фагоцитоз). Наряду с синергическим взаимодействием в литературе имеются данные о конкурентных контактах FcR и CR3. По мнению некоторых авторов между этими рецепторами может идти конкуренция, и исход процесса зависит от того, какой рецептор будет вовлечен в фагоцитоз.

## **ВЫВОДЫ:**

1. Обнаружена интенсификация кислородозависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в ответ на опсонизированные бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* относительно неопсонизированных.

2. Нейтрофильные гранулоциты сильнее активизируются в ответ на опсонизированные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* относительно культуры *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. При этом активность моноцитов крови выше при индукции неопсонизированных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* относительно *Klebsiella pneumoniae*.

3. Нейтрофильные гранулоциты активизируются быстрее в ответ на опсонизированные и неопсонизированные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* относительно моноцитов.

4. Из всех исследованных культур достоверные результаты получены при индукции опсонизированными и неопсонизированными культурами *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. При воздействии штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* достоверных результатов не выявлено.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никулин Б.А. Оценка и коррекция иммунного статуса : руководство для врачей / Б. А. Никулин.// Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 375 с.
2. Ингерлейб М.Б. Медицинские Анализы : диагностический справочник / М.Б. Ингерлейб – Москва 2011. С.13.
3. Земсков А.М. Клиническая иммунология: учебное пособие для студентов медицинских вузов/Под ред.А.М.Земскова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.С 20.
4. Елисеев В.Г. Гистология : под редакцией / В.Г. Елисеев, Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина. – Москва : Медицина, 1983.- 146 с.
5. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука, 1983. — 283 с.
6. Данилова А.М. Электронно-микроскопическая и цитохимическая характеристика антимикробной активности нейтрофильных лейкоцитов: Автореф. дис. . канд. мед. наук: 03.00.07 / ЛМА им. Кирова. Д., 1986. - 22 с.
7. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функции//Иммунология.-2007.-№6.-С.374-381.
8. Пинегин Б.В., Карсанова М.И. Макрофаги : свойства и функции // Иммунология 2009 г. , №6 с. 241 - 242, 246 - 247.
9. Ариэль Б.М. Взаимодействие микроорганизмов с клетками хозяина в процессе фагоцитоза / Б.М. Ариэль // Архив патологии. 1976. - № 1. - С. 80-88.

10. Ю.Барсуков А.А. Анализ функциональной активности макрофагов при адгезии / А.А. Барсуков, В.М. Земсков, С.А. Безносенко // Журн. микробиол. 1986. -№ 1. - С. 3-8.
11. Бондаренко В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса / В.М. Бондаренко // Там же. 1999. - № 5. - С. 34-39.
12. Ткаченко Б.И. Основы физиологии человека. Учебник для высших учебных заведений, в 2-х томах, под редакцией акад. РАМН 1994. Т.1 — 567с, т.2 С 413.
13. Хаитов Р.М., Иммунология// М. 2000г., том3. с. 61 - 67.
14. 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)
15. Винник Ю.С. Савченко А.А. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа/Ю.С. Винник А.А. Савченко //Сибирское медицинское обозрение -2006 №3 -С 42-44
16. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестн. РАМН. - 1998. - №7. - С. 43-51.
17. Дамбаева, С.В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека / С.В. Дамбаева, Д.В. Мазуров, Б.Г. Пинегин // Иммунология.- 2001. - №6. - С. 58-60.



18. Blazheevskly M. Ye., Bondarenco N. Yu. Chemiluminescence-based kinetic determination of drug / M. Ye. BlazheevsklyN. Yu. Bondarenco// Методы химического анализа, 2011, т6, №3. С124-142.
19. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток//Клиническая лабораторная диагностика.-2008.-№2.-С54-55.
20. Владимиров Ю.А. Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция : под редакцией / Ю.А. Владимиров Е.В. Проскурнина – Москва : Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, 2009, С.341-388.
21. Дмитриева Н.Ю. Савченко А.А. Вычислительное моделирование динамики хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов / Н.Ю. Дмитриева А.А. Савченко // JournalofSiberianFederalUniversity. Mathematics&Physics 2008, 1(4). С 435-442.
22. I.V. Obraztsov<sup>1</sup>, M.A. Godkov - Federal Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow,Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow
23. Monocytes in the development and destabilization of atherosclerotic plaques D.N. Nozadze, A.V. Rvacheva, E.I. Kaznacheeva, I.V. Sergienko Russian Cardiology Research Complex, Moscow
24. Parham, P. (2005). The Immune System, " Garland Science Publishing, New York, NY.
25. Champion J.A., Walker A., Mitragotri S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres // Pharm. Res. — 2008. — Vol. 25, N 8. - P. 1815-1821.

26. DeLeo F.R., Diep B.A., Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* - 2009. -Vol. 23, N 1.
27. Lekstrom-Himes J.A., Gallin J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes // *The New England Journal of Medicine.* - 2000. - Vol. 343, N 23. - P. 1703-1714.
28. Quie P.G., Cates K.L. Clinical conditions associated with defective polymorphonuclear leukocyte chemotaxis // *Am. J. Pathol.* - 1977. -Vol. 88, N 3. - P. 711-725.
29. Anthony L.D. Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages / L.D. Anthony, R.D. Burke, F.E. Nano"// *Infect. Immun.* 1991. - Vol. 59, N 9. - P. 3291-3296.
30. Beaman L. In vitro response of alveolar macrophages to infection with *Coccidioides immitis* / L. Beaman, C.A. Holmberg // *Infect. Immunol.* 1980. - Vol. 28, N2.-P. 594-600.
31. D. Harmsen, A. Rakin et al. // *J. Clin. Microbiol.* 1998. - Vol. 36, N 9. - P. 2557-2564.
32. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal actions of neutrophils / K. Ruckdeschel, A. Roggenkamp, S. Schubert, J. Heesemann // *Infect. Immun.* 1996. - Vol. 64, N 3. - P. 724-733.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«18» июня 2018 г.

### БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ОТВЕТ НА  
ВОЗДЕЙСТВИЕ ШТАММОВ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,  
*Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*

Руководители



д. б. н., доцент

Коленчукова О. А.



к.б.н., доцент

Сарматова Н. И.

Выпускник



Пятаева А. Д.

Красноярск 2018